



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Mise au point du criblage immunologique d'une banque de peptides aléatoire sur phages

Godfroid, Fabrice

*Award date:*  
1993

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTE DES SCIENCES**

---

**Mise au point du criblage immunologique d'une  
banque de peptides aléatoire sur phages**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques  
par**

**GODFROID FABRICE  
1993**



## Liste des abréviations

A	angström
aa	acide aminé
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	antigène
APS	persulfate d'amonium
bp	paire de bases
BSA	serum albumine bovine
DNAase	désoxyribonucléase
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FCS	foetal calf serum
g	gramme
gp	glycoprotéine
hGH	human growth hormone
IDR	intradermoréaction
Ig	immunoglobuline
kDa	kilodalton
LPS	lipopolysaccharide
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
nm	nanomole
NS	non sélectionné
OMP	outer membrane protéine
OPD	ortho 1,2 phénilène diamine
PCR	amplification en chaîne par polymerase
PEG	polyéthylène glycol
R	rough
RF	forme réplivative
rpm	tour par minute
S	smooth
SDS-PAGE	gel de polyacrylamide en présence de dodécyl-sulfate de sodium
SV	sans virion
Tc	tétracycline
TEMED	NNN'N'tétraméthylène diamine
TU	unité de transformation
V	volt
°C	degré Celsius
µg	microgramme
µl	microlitre

## AMINO ACIDS

### ABBREVIATIONS AND MOLECULAR WEIGHTS

Amino Acids	3-Letter Abbreviation	1-Letter Symbol	Molecular Weight
Alanine	Ala	A	89
Arginine	Arg	R	174
Asparagine	Asn	N	132
Aspartic acid	Asp	D	133
Asparagine or aspartic acid	Asx	B	—
Cysteine	Cys	C	121
Glutamine	Gln	Q	146
Glutamic Acid	Glu	E	147
Glutamine or glutamic acid	Glx	Z	—
Glycine	Gly	G	75
Histidine	His	H	155
Isoleucine	Ile	I	131
Leucine	Leu	L	131
Lysine	Lys	K	146
Methionine	Met	M	149
Phenylalanine	Phe	F	165
Proline	Pro	P	115
Serine	Ser	S	105
Threonine	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosine	Tyr	Y	181
Valine	Val	V	117



## Mise au point du criblage immunologique d'une banque de peptides aléatoires sur phages

GODFROID Fabrice

### Résumé

Nous avons mis au point les techniques de criblage d'une banque de peptides aléatoires sur phages. Les hexapeptides aléatoires sont exprimés à la surface des phages, en fusion à l'une de leurs protéines d'enveloppes, la protéine PIII. La sélection des phages, portant les peptides mimant l'épitope étudié (mimotopes), est réalisée par "biopanning", une technique de sélection par affinité basée sur la forte réaction de fixation de la biotine sur la streptavidine. La séquence des peptides sélectionnés peut être déterminée par séquençage du génome des phages portant l'insert oligonucléotidique codant pour le peptide aléatoire exprimé en surface. Dans un premier temps, après avoir vérifié le caractère aléatoire de la banque, nous l'avons testée en la criblant avec la streptavidine. Ceci a été réalisé sur base de données publiées dans la littérature où ont été identifiées des séquences peptidiques mimant la biotine. Par la suite, nous l'avons criblée avec un anticorps monoclonal spécifique des épitopes A du LPS de *Brucella* en vue de l'identification d'un peptide mimant cet épitope. Le séquençage des clones phagiens sélectionnés n'a permis dans aucun des deux cas de déterminer de réelle séquence consensus. Par différents moyens analytiques nous avons néanmoins essayé de mettre en évidence des séquences motifs. Il est probable que des conditions trop douces d'élution des phages sélectionnés nous aient empêché de mettre en évidence les clones de haute affinité qui seraient eux porteurs de la réelle séquence consensus.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Novembre 1993

Promoteurs : Profs. J.J Letesson

Co-promoteur : Profs. J Vandenhaute

Je voudrais remercier ici les personnes qui m'ont aidé pendant ce travail de fin d'étude.

Je remercie tout d'abord J.J. Letesson pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir fourni de judicieux conseils.

Je remercie également B. Lichtfouse qui m'a accompagné tout au long de ce mémoire et qui m'a initié aux techniques de biologie moléculaire.

Ma reconnaissance va tout spécialement à **A. Tibor** et à **Ph. Denoel** pour leur disponibilité et leur aide précieuse.

Je remercie également tout le personnel du laboratoire d'immunologie ainsi que les autres étudiants pour leur gentillesse et pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions



# Table des matières

A. Introduction .....	1
1. Cartographie d'épitopes .....	1
1.1 Identification des épitopes B.....	2
1.1.1 Pepsan et peptides chevauchants .....	3
1.1.2 Prédiction d'épitopes linéaires .....	3
1.2 Les mimotopes .....	4
1.2.1 Pepsan et peptides aléatoires .....	4
1.2.2 Librairies peptidiques sur billes.....	5
1.2.3 Librairies peptidiques sur phages.....	7
1.3 Les phages en tant que vecteurs d'expression de librairies peptidiques .....	8
1.3.1 Cycle de réplication des phages filamenteux .....	8
1.3.2 Les protéines d'enveloppe des phages filamenteux susceptibles de présenter un épitope.....	9
1.3.2.1 La protéine pVIII.....	9
1.3.2.2 La protéine PIII.....	9
1.3.2.3 Les différents systèmes d'expression sur phages filamenteux .....	10
1.3.2.3.1 Système d'expression de type 3 .....	10
1.3.2.3.2 Système d'expression de type 3+3.....	11
1.3.2.3.3 Systèmes d'expression de type 8.....	11
1.3.2.3.4 Systèmes d'expression de type 8+8.....	12
1.3.3 La librairie épitopique mise au point par Smith .....	12
1.3.3.1 Caractéristiques des phages fUSE 5 .....	12
1.3.3.2 Epitopes reconnus grâce à la librairie de Smith .....	13
2. La Brucellose .....	15
2.1 Historique.....	15
2.2 Manifestations cliniques de la brucellose et mode de contamination bactérienne.....	16
2.2.1 La brucellose humaine .....	16
2.2.2 Les brucelloses animales .....	16
2.3. Les Brucella .....	17
2.3.1 Généralités .....	17
2.3.2 Caractérisation de la paroi .....	18
2.3.3. La membrane externe .....	18
2.3.3.1 Les protéines de la membrane externe .....	18
2.3.3.2 Le LPS et sa structure .....	19
2.4 Diagnostic.....	20
2.4.1 L'examen bactériologique .....	21
2.4.2 Epreuve allergique.....	21
2.4.3 Diagnostic sérologique.....	21
2.5 Intérêt de l'approche des mimotopes .....	22
2.5.1 Antigène de diagnostic.....	23
2.5.2 Antigènes protecteurs .....	24
B. But du travail.....	25
C. Matériel et méthodes .....	26
1. Production, purification, concentration et couplage de l'Ac anti-LPS .....	26
1.1 Production de l'Ac en surnageant de culture.....	26
1.2 Précipitation des immunoglobulines contenues dans le surnageant de culture avec du sulfate d'ammonium.....	27



1.3 Purification des immunoglobulines sur colonne de protéine A-sépharose .....	27
1.4 Biotinylation de l'Anticorps monoclonal purifié .....	28
2. Criblage immunologique de la banque.....	29
2.1. Création de la banque de peptides aléatoires (Parmley and Smith, 1988).....	29
2.2. Sélection des phages par affinité ou "Biopanning" .....	31
2.3 Sensibilisation des boîtes de pétri avec la streptavidine .....	32
2.4 Le panning.....	32
2.4.1 1er cycle ou P+LS ("Phage+ligate-streptavidine") .....	33
2.4.2 2ème et 3ème cycle ou PL+S("Phage-ligate+streptavidine" .....	33
2.4.3 Elution des phages .....	34
2.4.4 Amplification de l'éluat .....	35
2.4.4.1 Concentration du 1er éluat sur centricons .....	35
2.4.4.2 Amplification de l'éluat.....	35
2.4.4.3 Titration des phages.....	37
2.4.5 Biopanning contre l'Ac anti-LPS.....	38
2.4.6 Biopanning contre la streptavidine .....	38
3 Production et caractérisation des clones individuels .....	38
3.1 Propagation individuelle des clones .....	38
3.2 Mise au point d'un test ELISA .....	39
3.3 Séquençage des clones sélectionnés.....	41
3.3.1 Extraction de l'ADN .....	41
3.3.2 Réaction de séquençage.....	42
3.3.3.1 "Annealing".....	43
3.3.3.2 "Labelling réaction" .....	44
3.3.3.3 Réaction de terminaison .....	44
3.3.4 Préparation et utilisation du gel d'électrophorèse.....	46
4. Production d'un anticorps polyclonal anti fUSE 5.....	47
4.1 Production d'un phage fUSE 5 en grande quantité.....	47
4.2 Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose .....	49
4.3 Inoculation au lapin .....	51
4.4 ELISA de contrôle .....	51
4.4.1 ELISA anti-coli .....	51
4.4.2 ELISA anti-phages .....	53
D Résultats et analyses .....	54
1. Mise en évidence du caractère aléatoire de la banque .....	54
1.1 Mise au point du séquençage .....	54
1.2 Analyse de la séquence des clones non sélectionnés.....	55
1.2.1 Séquence nucléotidique des clones non sélectionnés.....	55
1.2.2 Séquence en aa des clones non sélectionnés .....	56
1.2.3 Analyse de la fréquence des codons.....	57
1.2.4 Analyse de la fréquence des aa.....	57
2. Sélection par affinité de phages contre la streptavidine .....	58
2.1. Titration des biopannings contre la streptavidine.....	58
2.2 Séquençage des clones sélectionnés contre la streptavidine.....	59
2.2.1. Séquence nucléotidique des clones streptavidine .....	59
2.2.2. Séquence en aa des clones streptavidine.....	60
3. Sélection par affinité des phages contre l'anticorps monoclonal 4F9 .....	61
3.1 Titration des biopanning contre l'anticorps monoclonal 4F9 .....	61
3.2 Test de fixation des phages sélectionnés sur l'anticorps monoclonal 4F9.....	62
3.3 Séquençage des clones sélectionnés contre le 4F9 .....	62
3.3.1 Séquence nucléotidique des clones 4F9 .....	63
3.3.2 Séquence en aa des clones 4F9 .....	63

4. Analyse des séquences des clones sélectionnés contre la streptavidine et le 4F9.....	64
4.1 Fréquence des Acides Aminés.....	64
4.1.1 Comparaison de la fréquence en aa dans les clones streptavidine et dans une banque aléatoire.....	65
4.1.2 Comparaison de la fréquence en aa dans les clones 4F9 et dans une banque aléatoire .....	65
4.1.3 Comparaison de la fréquence en aa dans les clones non sélectionnés, streptavidine et 4F9.....	65
4.2 Position des aa selon leurs caractéristiques physico-chimiques dans les clones non sélectionnés, streptavidine et 4F9 .....	66
4.2.1 Clones non sélectionnés .....	66
4.2.2 Clones streptavidine.....	67
4.2.3 Clones 4F9.....	67
4.3 Analyse de la position des acides aminés .....	68
4.4 Fréquence des dipeptides .....	68
5. Analyse des résultats concernant la production d'un anticorps polyclonal dirigé contre les phages fUSE 5 .....	70
5.1 Electrophorèse en gel d'agarose.....	70
5.2 Confirmation de la production de l'anticorps polyclonal anti fUSE 5.....	70
E. Discussion.....	72
F. Conclusions et perspectives .....	75
G. Bibliographie .....	79

# Introduction



## A. Introduction

### 1. Cartographie d'épitopes

L'identification correcte de sites antigéniques ou épitopes et la synthèse de peptides mimant ceux-ci pourrait grandement aider la vaccination et le diagnostic de nombreuses maladies. Les problèmes encourus lors de la production et de l'utilisation des vaccins dit traditionnels, font qu'à l'heure actuelle il n'en existe pas encore pour de nombreuses maladies parasitaires, virales ou bactériennes. Une alternative très explorée est l'utilisation de peptides synthétiques pour la vaccination. Ces vaccins synthétiques sont constitués d'un ou plusieurs peptides courts constituant les épitopes majeurs d'un organisme et induisant une réponse immune protectrice. Cependant, ces peptides, généralement de taille inférieure à 15 résidus, sont peu immunogènes et doivent être couplés à des carrier (protéines, érythrocytes, liposomes,...) et administrés avec des adjuvants ( Quil A, Freund,...) (Arnon and Van Regenmortel, 1992).

Les peptides synthétiques sont également de plus en plus utilisés pour remplacer les protéines entières lors des épreuves diagnostiques. La sensibilité des tests est augmentée car la densité épitopique est plus importante que dans les lysats viraux ou bactériens. Mais la qualité principale des peptides synthétiques réside dans leur grande spécificité. Dans certaines infections virales, le type d'anticorps (Ac) produit reflète le caractère précoce ou tardif de la maladie. Or de tels Ac peuvent être mis en évidence spécifiquement grâce à des peptides synthétiques portant les épitopes appropriés. Cette spécificité peut également être d'un grand secours lorsqu' on assiste à des réactions croisées par exemple dans la détection d'infections bactériennes (Leinikki et al, 1993).

Historiquement, le mapping d'épitopes protéiques relevait de l'identification des fragments conservant la spécificité épitopique après clivage enzymatique ou au bromure de cyanogène de la protéine. Par la suite, l'amélioration des techniques de synthèse peptidique et de biologie moléculaire ont permis d'aller beaucoup plus loin dans la recherche des épitopes.

Deux types d'épitopes peuvent être mis en évidence, ceux reconnus par les cellules T ou par les cellules B. Pour un lymphocyte T un antigène est toujours de nature protéique, en outre la reconnaissance d'un antigène par ceux-ci ne concerne pas la

protéine mature mais nécessite le processing et la présentation d'un peptide linéaire. Celui-ci doit, de plus, être présenté en surface d'une cellule présentatrice de l'antigène par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC). Les acides aminés bordant l'épitope ont, dans le cas des épitopes T, une grande importance car ils influencent le processing, la fixation au MHC et la présentation (Horsfall et al, 1991). Les épitopes T ne sont donc pas définis par la seule séquence linéaire des peptides mais impliquent le MHC. La mise en évidence de ces épitopes commence par la reconnaissance grossière de la région reconnue par les lymphocytes T. Par la suite, les séquences d'intérêts sont déterminées par synthèse et sélection de peptides se chevauchant.

Les épitopes des lymphocytes B posent un problème supplémentaire car environ 90% de ceux-ci sont conformationnels (Horsfall et al, 1991). En outre, ils peuvent concerner des structures non protéiques. Nos expériences se situant dans le cadre de la mise en évidence d'épitopes B, nous allons décrire plus en détail les procédures d'identification de ceux-ci.

### **1.1 Identification des épitopes B**

Bien que la composition chimique des épitopes B ne soit pas uniquement protéique, la majorité des techniques d'identification et de prédiction ne concerne que ceux-ci. Les épitopes B de nature protéique peuvent être continus ou discontinus. Les épitopes continus sont des fragments peptidiques linéaires tandis que les discontinus sont constitués de groupes de résidus rapprochés par la conformation de la chaîne polypeptidique.

Les travaux de Merrifield (1963) sur la synthèse peptidique en phase solide rendant possible la production de courts fragments polypeptidiques, et l'augmentation des connaissances au niveau de la séquence en aa des protéines ont permis de développer le concept de recherche des épitopes linéaires d'une protéine. Mais c'est au cours des années 1980 que le groupe de Geysen a mis au point le Pepscan ou cartographie d'épitopes à l'aide de peptides se chevauchants (Geysen et al., 1986, 1987). Se développent également, à l'heure actuelle, des méthodes de prédiction des épitopes linéaires.



# Pepscan

Many peptides per synthesis  
 Cleavable peptides allow T-cell work  
 Peptides can be reused

B-cell peptides often give high noise levels  
 Costly for initial screening of large proteins

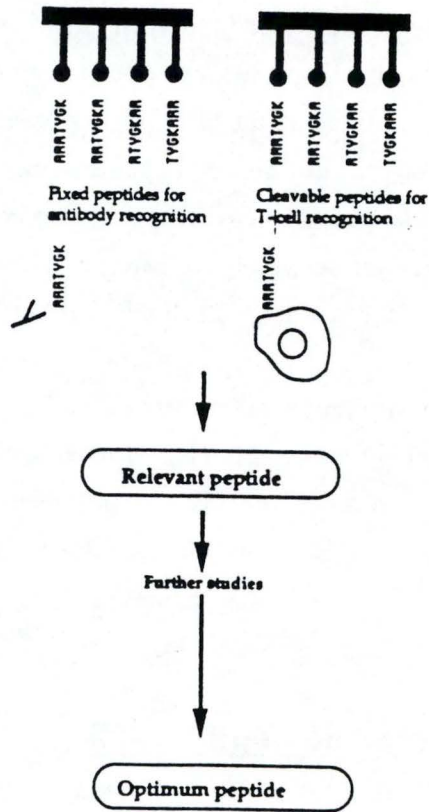
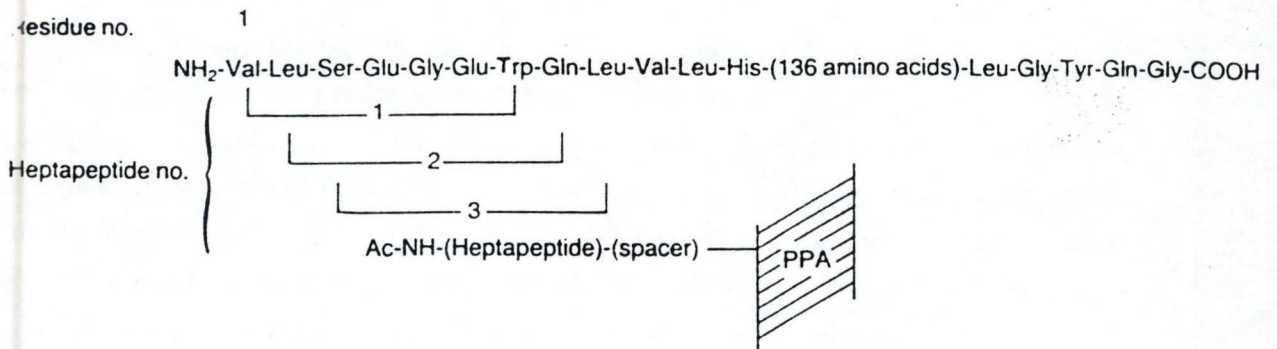


Figure 1  
 Le pepscan  
 (Horsfall et al, 1991)



### Strategy for the identification of sequential epitopes.

The amino acid sequence of the protein under study (swMlb in the above example) is subdivided into peptide units (heptapeptides are shown). Each is synthesized on a separate polyacrylic acid/polyethylene support (PPA)<sup>2</sup> in the orientation shown, and with a spacer ( $\beta$ -alanine-hexamethylene diamine) as shown. Peptides are numbered according to the position of the amino-terminal residue within the protein sequence.

Figure 2  
 Stratégie d'identification d'épitopes séquentiels par synthèse de peptides chevauchants  
 (Geysen, 1985)

### **1.1.1 Pepsan et peptides chevauchants**

Cette technique repose sur la méthode de synthèse peptidique en phase solide (Merrifield, 1963), sur l'ELISA (Engvall and Perlmann, 1971) et sur la connaissance de la séquence en aa de la protéine étudiée. Le pepsan consiste tout d'abord en une synthèse systématique sur support solide (figure 1), de tous les courts peptides se chevauchant sur la séquence protéique et couvrant l'entièreté de celle-ci (Figure 2). La réactivité de tous les peptides avec les différents Ac dirigés contre la protéine est ensuite testée par ELISA. Des quantités minimales de peptides (pmol ou nmol) sont suffisantes tandis que la concentration en Ac semble être importante dans la détection par ELISA d'un peptide. Les peptides ainsi identifiés sont resynthétisés et leur capacité de fixation à l'Ac est confirmée.

Des méthodes d'investigation plus approfondies, telles que le "remplacement set analysis", permettent de mettre en évidence les résidus directement impliqués dans les interactions avec l'Ac. Celle-ci implique la synthèse systématique de séries de peptides analogues, chacun différant des peptides originaux par un résidu. Si la fixation de l'Ac est perdue lorsque le résidu original est remplacé, cela signifie que ce dernier intervient directement dans l'interaction avec l'Ac (Geysen et al., 1987).

Les principaux inconvénients de cette méthode sont les suivants :

- son coût est élevé.
- le couplage du peptide à un support solide peut affecter de manière significative sa présentation, et masquer des résidus potentiellement réactifs avec l'Ac utilisé.
- les épitopes identifiés sont de type continu (Geysen et al., 1986).
- Elle n'est applicable qu'aux protéines dont la séquence peptidique est connue.

### **1.1.2 Prédiction d'épitopes linéaires**

Les méthodes de prédiction actuelles, sont basées sur la structure primaire des protéines et ne permettent donc que la mise en évidence des épitopes linéaires. Les paramètres d'hydrophilicité intrinsèque sont à la base des méthodes de prédiction les plus communes.

Celles-ci postulent que (Hopp and Woods, 1983) :

L'Ac se lie à 5-8 aa. séquentiels.

Les épitopes sont à la surface de la protéine.



Les séquences d'aa. les plus hydrophiles sont localisées à la surface des protéines dans leur conformation native.

Il a été suggéré que les segments de la séquence protéique ayant la plus haute valeur moyenne d'hydrophilicité correspondent aux épitopes linéaires (Hopp and Woods, 1983). D'autres méthodes de prédiction ont été proposées, basées sur la prédiction de la flexibilité de la chaîne principale (Karplus and Schulz, 1985) et sur les valeurs antigéniques de chaque acide aminé (Welling et al., 1985). Néanmoins ces méthodes restent très aléatoires et elles ne seront sans doute jamais essentielles pour la découverte des épitopes. Leur utilité actuelle est de fournir des pistes de recherche pour les techniques utilisant les peptides synthétiques.

Les deux approches précitées ne sont applicables que si la séquence en aa de la protéine antigénique est connue. Elle ne permet ni l'identification d'épitopes non protéiques ni celle d'épitopes discontinus. Pour pallier à ces lacunes, la mise au point de nouvelles techniques s'avère nécessaire. Celles-ci reposent sur le concept des mimotopes.

## **1.2 Les mimotopes**

Les récents développements dans l'utilisation des peptides synthétiques en tant qu'outil diagnostique ou vaccinal nécessite l'identification des épitopes continus ou discontinus sans la connaissance préalable de la séquence en aa, voire même d'épitopes non protéiques; la création des bibliothèques peptidiques aléatoires, pouvant être criblées avec des Ac permet l'identification de ces épitopes. Les peptides mis en évidence par ces méthodes miment l'épitope étudié et sont appelés des mimotopes. Deux grands types de bibliothèques peptidiques ont été créés jusqu'à présent, les bibliothèques sur base de la synthèse chimique et celles sur base de la synthèse biologique.

### **1.2.1 pepscan et peptides aléatoires**

L'utilisation des techniques de Pepscan avec des peptides aléatoires, permet de se détacher de la structure primaire des protéines et par le fait même, autorise la mise en évidence d'épitopes conformationnels. Les peptides aléatoires sont synthétisés sur support solide avant d'être testés par ELISA avec l'Ac ou la protéine d'intérêt. Tester une banque de peptides aléatoires, où chacun de ceux-ci est individualisé (set complet

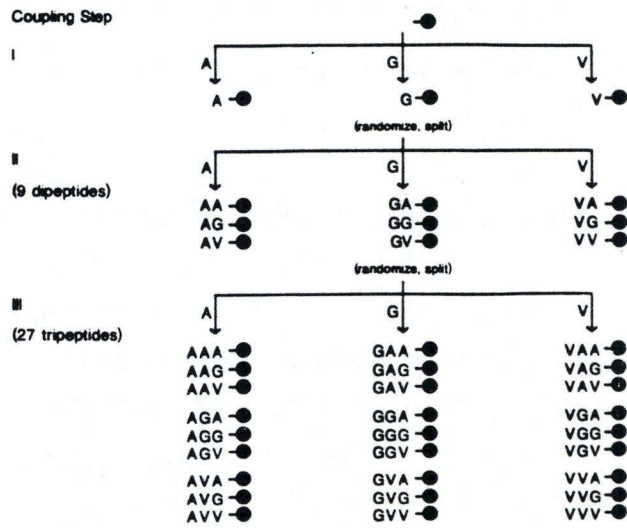


Figure 3  
Schéma de synthèse des peptides, exemple ne faisant intervenir que 3 acides aminés différents  
(Lam et al, 1991)

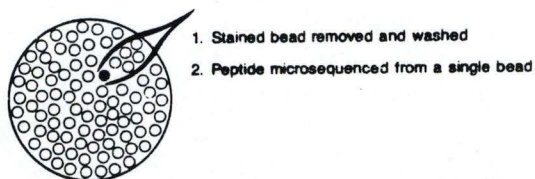
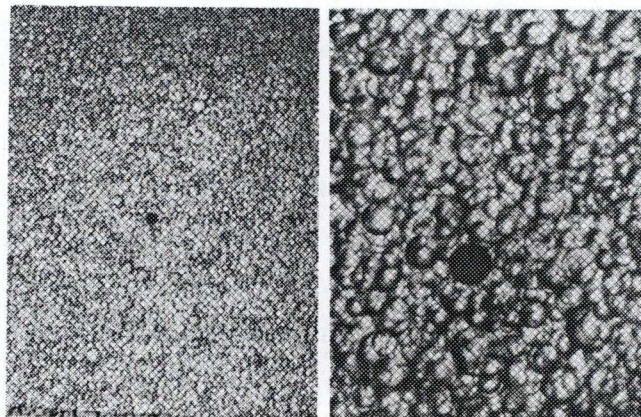


Figure 4  
Identification des billes en vue du microséquençage  
(Lam et al, 1991)



d'hexapeptides dérivé des 20 aa= $6,4 \times 10^7$ ), paraît impossible. C'est pour cette raison que l'on teste des mélanges de peptides dégénérés fixés sur le même support solide (Geysen et al, 1986). La stratégie pour tester un répertoire complet d'hexapeptides basés sur les aa. communs est de synthétiser 2000 mélanges, comprenant chacun 160000 peptides différents (revue *pinacle*, Avril 1992). La première étape de la sélection consiste à déterminer le mélange contenant le plus grand nombre de peptides positifs. Ensuite, d'autres cycles de synthèse et de sélection interviennent. A chaque cycle, la dégénérescence des peptides est diminuée conduisant ainsi à la sélection du peptide adéquat. Les avantages de la méthode sont le large éventail de peptides pouvant être screenés ainsi qu'une liberté d'insertion due à la méthode de synthèse chimique (acides aminés D, résidus à chaînes latérales modifiées, etc.). Néanmoins cette méthode est d'une utilisation complexe et de coût élevé.

Une autre méthode utilisant la synthèse peptidique sur phase solide pour mettre en évidence des épitopes continus, est celle des dipeptides. Cette technique est basée sur la propriété des Ac à se fixer de manière stable à un peptide de deux aa. La première étape est de sélectionner, dans une banque de dipeptides, celui ou ceux ayant la plus forte affinité pour l'Ac. La deuxième étape consiste à synthétiser à partir de ce ou ces peptides, des tripeptides dont la répartition des aa en troisième position est aléatoire. Intervient ensuite une nouvelle étape de sélection. Les étapes de synthèse et de sélection s'enchaînent pour obtenir en définitive le peptide dont la séquence mime au mieux l'épitope de l'Ac étudié (Geysen et al, 1986). La réalisation de cette technique est assez aisée mais induit un biais lors de la sélection, le nombre de peptides criblés étant relativement faible.

### **1.2.2 Librairies peptidiques sur billes**

Il est possible d'obtenir une banque constituée de plusieurs millions de peptides différents fixés chacun sur différentes billes de résine grâce à une stratégie de synthèse semblable à celle de Merrifield (Merrifield et al, 1963). La résine est répartie en 20 lots correspondant aux 20 acides aminés. Après la fixation du premier résidu, la totalité des billes est rassemblée et redistribuée aléatoirement en 20 nouveaux lots pour fixer le résidu suivant. Les opérations sont répétées jusqu'à l'obtention de peptides de longueur voulue (Figure 3). Lorsque la banque est terminée, la phase de criblage de celle-ci intervient. Cette phase a pour but de reconnaître et isoler le ou les peptides capables de se fixer à une molécule acceptrice particulière.

La reconnaissance des peptides relevant se fait grâce à la molécule acceptrice couplée à un système de révélation (peroxydase, phosphatase alcaline,...) que l'on incube avec la banque de peptides. Les billes mises en évidence sont isolées, permettant ainsi le microséquençage des peptides et l'identification définitive de la séquence reconnue par la molécule acceptrice (Figure 4).

Les avantages de cette méthode sont qu'elle est simple et rapide, que la synthèse peptidique est bien au point et que l'on dispose de nombreuses potentialités chimiques (on peut introduire des acides aminés D, des structures secondaires spécifiques ou des résidus inexistant dans la nature). Cette méthode comporte néanmoins quelques désavantages. Tout d'abord, elle est assez coûteuse. Ensuite tous les acides aminés ne peuvent être représentés. En effet, la cystéine (formation de ponts disulfures) et le tryptophane (encombrement stérique important) posent des problèmes lors de la synthèse. Et enfin, les billes sélectionnées sont définitivement exclues de la banque et donc produisent un épuisement progressif de celle-ci. Cette méthode a pourtant fait ses preuves; en effet, en 1991, Lam et al ont étudié un Ac monoclonal spécifique de la  $\beta$ -endorphine ayant une haute affinité pour la séquence épitopique **YGGFL** ( $K_i = 17.5 \text{ nM}$ ). Parmi les deux millions de billes de la banque de pentapeptides, six se sont révélées positives. Un de ces peptides sélectionnés, ayant pour séquence **YGGFQ**, avait une affinité très proche de l'épitope natif ( $K_i = 15.0 \text{ nM}$ ). Lam et al ont également utilisé leur banque de pentapeptides pour déterminer le site de liaison de la streptavidine; ils ont obtenu une séquence consensus de trois acides aminés: **HPQ** (Lam et al., 1991).



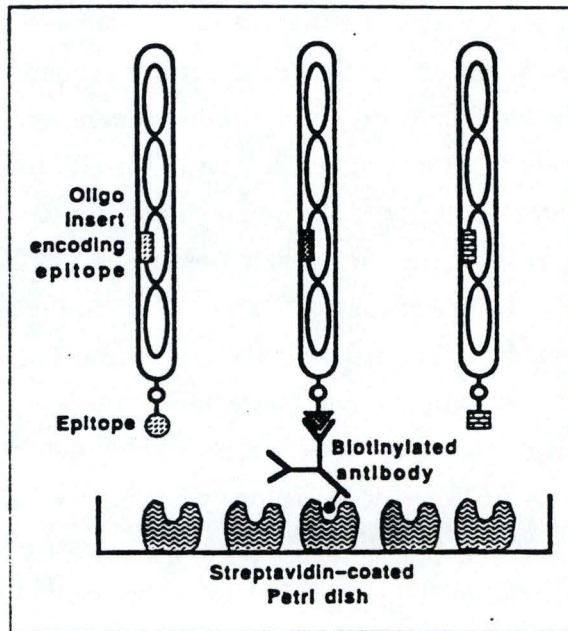


Figure 5  
Schéma du biopanning  
(Scott, 1992)

### **1.2.3 Librairies peptidiques sur phages**

L'étude des systèmes d'expressions biologiques est intervenue pour faciliter la production de grandes librairies de séquences peptidiques aléatoires. Les premières librairies utilisaient des phages du type  $\lambda$ gt11 et exprimaient  $4 \times 10^6$  séquences peptidiques aléatoires de 15 résidus (Devlin J., 1990). Les librairies utilisant des phages filamenteux ont été développées afin d'augmenter le nombre de séquences pouvant être criblées (Smith et al, 1990). Ces phages filamenteux ou phages de fusion exposent un peptide étranger à leur surface, exprimé en fusion à une de leurs protéines d'enveloppe (Parley and Smith, 1988). Ces phages sont obtenus par insertion d'une séquence oligonucléotidique aléatoire dans le gène de la protéine d'enveloppe choisie. Un phage exprimant un peptide qui est un bon ligand pour un Ac ou une autre protéine de liaison, peut être sélectionné dans la banque grâce à une purification par affinité ou biopanning (Figure 5). Les phages sont tout d'abord mis en présence de l'anticorps biotinylé à étudier. Ces Ac vont alors se fixer aux phages exprimant le peptide correspondant à leur épitope. Pour la récupération de ces phages, les complexes Ac biotinylé-phage sont immobilisés grâce à la streptavidine adsorbée sur une surface solide (Parley and Smith, 1988). Les phages sélectionnés de la sorte sont élués sans modifier leur infectivité et la séquence peptidique responsable de la liaison est déduite par séquençage de leur génome au niveau de l'insert oligonucléotidique ( Smith and Scott , 1993). Les phages candidats peuvent être testés par ELISA ou tout autre épreuve immunologique. De la même manière, les peptides synthétiques dont la séquence est déterminée dans les expériences précédentes peuvent être testés pour la fixation en l'absence du phage "carrier" (Scott, 1992; Smith and Scott, 1993).

Les avantages des librairies peptidiques sur phages sont :

- un moindre coût vis à vis des techniques de synthèse chimique
- la possibilité d'expression de résidus tel que la cystéine et le tryptophane
- une utilisation plus simple due à l'association génotype/phénotype

Ses désavantages sont :

- seules les structures synthétisables biologiquement peuvent être exprimées
- les peptides étant exposés en fusion à une protéine, ils peuvent subir des contraintes diminuant ou empêchant la reconnaissance par la molécule acceptrice.



- II - Synthesis of phage ss and ds DNA
- V - Ss DNA binding protein
- VII - Minor coat protein
- IX - Minor coat protein
- VIII - Major coat protein (2700 copies)
- III - Minor coat protein (5 copies)
- VI - Minor coat protein
- I - Morphogenesis
- IV - Morphogenesis
- IS - Intergenic space, origine of replication

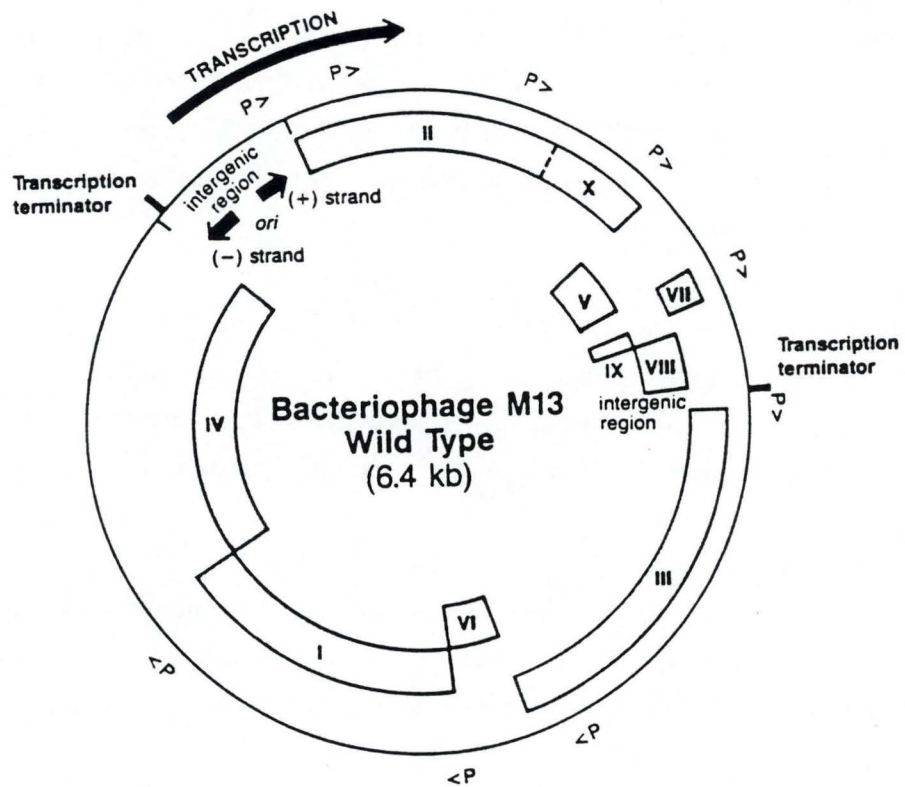


Figure 6  
 Carte génomique du bactériophage M13 et fonction des différents gènes  
 (Maniatis, 1989)

### **1.3 Les phages en tant que vecteurs d'expression de librairies peptidiques**

Depuis quelques années, les phages filamenteux sont très utilisés en tant que vecteurs pour la création de librairies épitopiques. Ces bactériophages sont spécifiques d'*Escherichia coli*, les plus connus et utilisés sont M13, f1 et fd. Le génome de ces phages est monocaténaire, circulaire et a une taille d'environ 6400 nucléotides. Leur génome comporte 9 gènes dont les produits sont impliqués dans la réplication de l'ADN phagien, l'assemblage des phages et la synthèse de la capsid (Marvin and Hohn, 1969)(Figure 6).

#### **1.3.1 Cycle de réplication des phages filamenteux**

Les cycles de réplication des différents phages filamenteux sont très proches. Le cycle décrit ici est celui des phages M13 (Figure 7). Les particules virales sont uniquement capables d'infecter les souches bactériennes exprimant le pili sexuel encodé par le facteur F. Les virions se fixent à l'extrémité de ces pili et tandis que leur ADN monocaténaire pénètre dans le corps de la bactérie, leur enveloppe protéique est abandonnée. L'ADN monocaténaire infectant les bactéries ou brin (+) est converti par les enzymes cellulaires en une forme double brin circulaire appelée la forme réplivative (RF). Commencent alors la transcription des gènes viraux et l'amplification du génome viral. Cette amplification survient lorsque le produit protéique du gène 2 provoque une coupure en un site spécifique du brin (+) de la forme réplivative (Meyer et al. , 1979). Les ADN polymérases de la bactérie, en allongeant l'extrémité 3' terminale, vont progressivement déplacer le brin (+) original du brin (-) de la matrice circulaire. Lorsque la fourche de réplication a effectué un tour complet, le brin (+) déplacé est clivé par le produit du gène 2 et est ensuite circularisé. Pendant les 15-20 premières minutes de l'infection, tous les brins (+) sont transformés en forme réplivative bicaténaire qui servent de matrice à la synthèse de nouveaux brins (+). Durant ce laps de temps, la production de protéine de fixation à l'ADN monocaténaire est suffisante pour réprimer le gène 2 (Model et al, 1982) et pour empêcher la conversion des brins (+) en forme réplivative (Mazur & Zinder, 1975). L'assemblage des particules virales ne se fait pas intracellulairement; en effet, le génome viral est encapsidé lors de son extrusion à travers la membrane des cellules infectées.



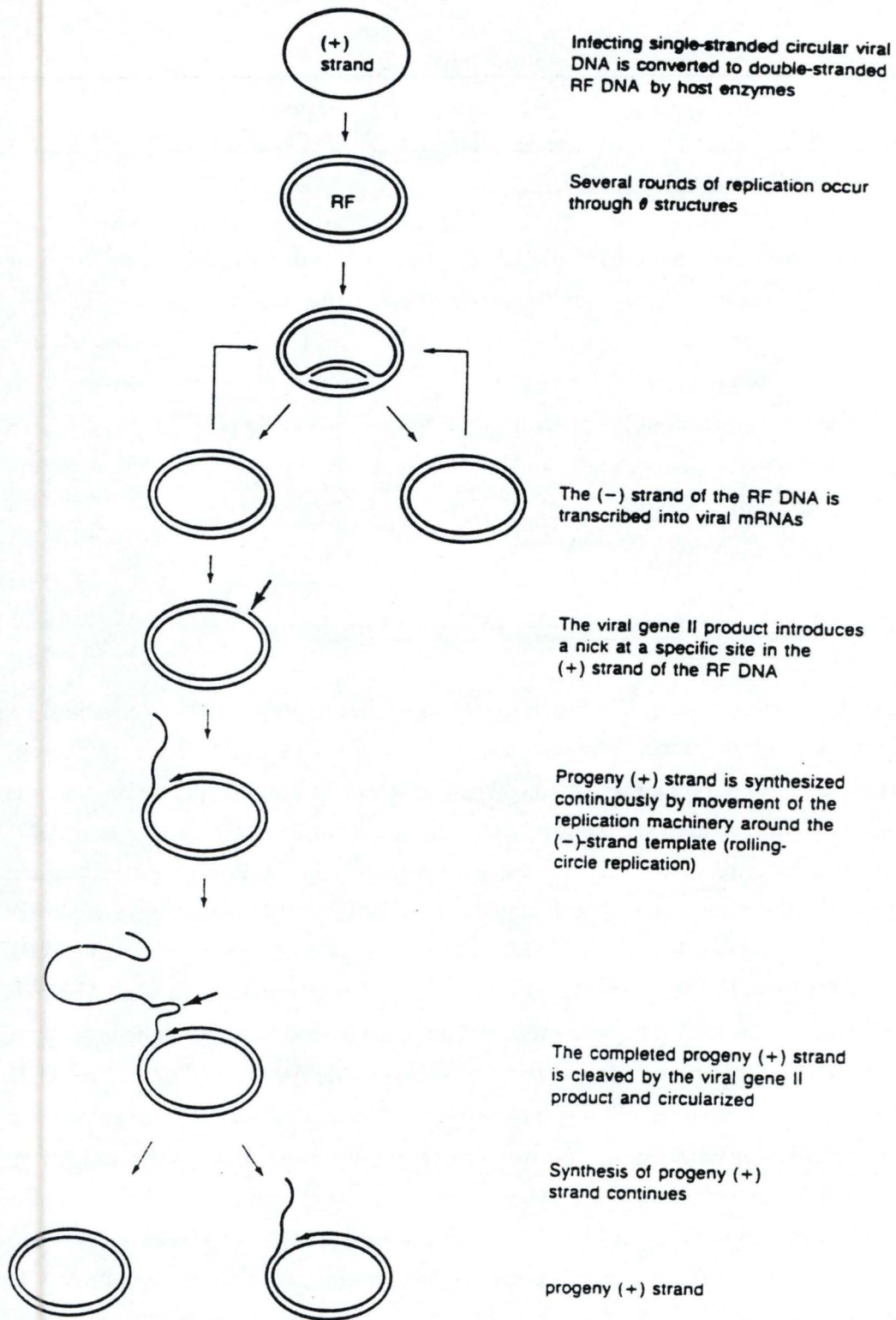


Figure 7  
 Cycle de répliation du bactériophage M13 dans une bactérie infectée  
 (Maniatis, 1989)

### **1.3.2 Les protéines d'enveloppe des phages filamenteux susceptibles de présenter un épitope**

La protéine pIII ou protéine d'enveloppe mineure et la protéine pVIII ou majeure ont toutes deux été utilisées pour présenter des épitopes (figure 8). Elles sont synthétisées avec une courte séquence signal qui leur permet d'être transportées jusqu'à la membrane interne de la bactérie, où elles sont clivées par une signal peptidase pour former la protéine mature. Les protéines matures sont ajoutées à l'enveloppe virale où elles s'assemblent et émergent de la membrane interne (Smith and Scott, 1993 ; Scott, 1992). Dans ces deux protéines d'enveloppe, l'épitope est inséré à l'extrémité amino terminale, ou à quelques résidus de celle-ci. Cette disposition est choisie car l'extrémité des protéines est plus flexible et plus exposée que les autres parties. Ceci permet à l'épitope inséré d'être non seulement toléré mais également accessible. De plus, l'influence structurelle des protéines d'enveloppe sur l'insert est moindre que si il était localisé plus à l'intérieur de la séquence (Smith and Scott, 1993 ; Scott, 1992).

#### **1.3.2.1 La protéine pVIII**

Cette protéine forme le core du phage. Sous sa forme mature, elle possède 50 résidus et comporte trois domaines. Le nombre de protéines formant le phage (2700-3000) dépend de sa taille, elle-même étant déterminée par la grandeur de l'ADN phagien (Scott, 1992). L'insertion de peptides dans la pVIII s'accompagne cependant d'une limitation importante : dans les virions contenant uniquement des protéines d'enveloppe mutantes, il est difficile d'incorporer des inserts de plus de 6 aa. La raison la plus probable de ce défaut est que de grands inserts interagissent entre eux ou avec les protéines d'enveloppe adjacentes (gpIX et gpVII) et empêchent ainsi l'assemblage du virus ou compromettent fortement sa stabilité (Makowski, 1993).

#### **1.3.2.2 La protéine pIII**

La protéine d'enveloppe mineure, représentée seulement à quelques exemplaires, est constituée de 424 aa dont 18 sont enlevés à l'extrémité N-terminale lors de l'insertion dans la membrane et possède deux domaines. Le polypeptide mature de 406 aa est attaché au virion via des interactions avec une autre protéine d'enveloppe mineure: la pVI (Makowski, 1993). La structure de la protéine III est flexible et apparaît en micrographie



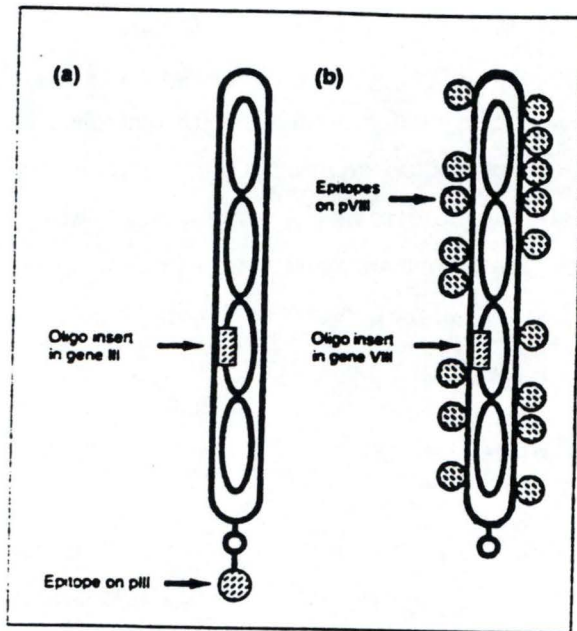


Figure 8  
 Bactériophages filamenteux exprimant des épitopes peptidiques en fusion à la protéine PIII (a), à la protéine PVIII (b)  
 (Scott, 1992)

électronique comme étant un cylindre de 60 à 80 Å portant à son extrémité aminotermine une structure étendue terminée par une boursouflure (Makowski, 1993; Gray et al., 1981). Cette protubérance est indispensable à l'infection des cellules d'*E.coli* mâles par liaison avec le pili F. Le domaine carboxy-terminal est, quant à lui, nécessaire à l'assemblage viral. Bien que plusieurs sites d'insertion aient été utilisés avec succès, ce sont les sites distants de quelques aa de l'extrémité N-terminale qui ont une influence minimale sur les fonctions de la protéine III. La protéine III se révèle donc être un candidat excellent pour les applications ne nécessitant pas un grand nombre de copies par phage (Makowski, 1993).

Exprimées par PIII ou PVIII, les régions variables, constituées de séquences en aa différentes, sont le plus souvent entourées par deux régions invariables permettant de limiter les interactions de l'insert avec la protéine.

### **1.3.2.3 Les différents systèmes d'expression sur phages filamenteux**

Seules deux des protéines d'enveloppe sont concernées par l'insertion de peptides étrangers, la protéine majeure encodée par le gène VIII et la protéine mineure encodée par le gène III. Néanmoins, il existe à l'heure actuelle six systèmes pour exprimer des peptides à la surface de phages (Figure 9). Les quatre systèmes les plus employés sont les systèmes de type 3, type 3+3, type 8 et type 8+8 (Smith, 1993).

#### **1.3.2.3.1 Système d'expression de type 3**

Les vecteurs de type 3 ont un seul gène 3 recombinant, portant un insert d'ADN étranger. Toutes les protéines PIII portent donc le peptide étranger encodé par l'insert. Dans le cas de ce type de vecteur, tous les autres gènes sont normaux (Smith, 1993). En criblant une banque d'hexapeptides avec la concanavaleine A, Scott et al. (1992) ont identifié des peptides mimant le site de fixation du méthyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside sur cette lectine. Hoess et al. en utilisant une librairie d'octapeptides, ont mis en évidence l'épitope de l'Ac monoclonal B3 dirigé contre un antigène de surface des cellules adénocarcinomeuses. (Hoess et al., 1993)



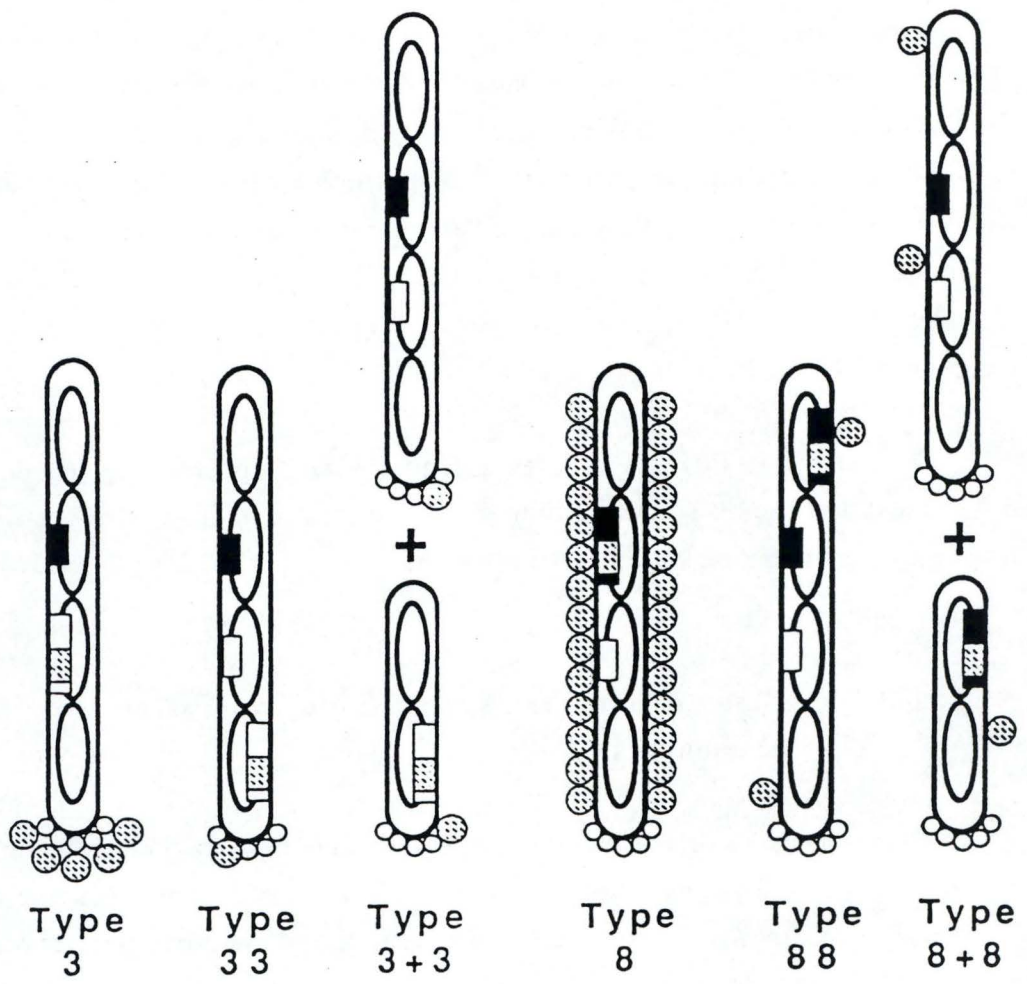


Figure 9  
 Classification des vecteurs d'expression phagiens  
 (Smith, 1993)

### 1.3.2.3.2 Système d'expression de type 3+3

Certains peptides ne sont pas tolérés dans les vecteurs de type 3 Ceci survient lorsque le peptide étranger est de trop grande taille et qu'il modifie les fonctions de la protéine PIII. Ce type de problèmes est évité dans le cas des vecteurs de type 3+3 en mettant en présence deux gènes III. Le gène recombinant est porté par un phagemide, c'est à dire un plasmide qui contient, en plus de son origine de réplication et d'un gène de résistance à un antibiotique, la région intergénique du phage filamenteux. Lorsque les cellules contenant le phagemide sont superinfectées avec un phage helper, la réplication phagienne et la machinerie d'assemblage, agissant sur les signaux cis-activateurs de la région intergénique, permettent l'empaquetage du génome du phagemide et de celui du phage helper. Les cellules infectée sécrètent donc deux types de particules, helper et phagemide, exprimant chacune un mélange de protéines PIII recombinantes et sauvages. Les particules phagemides peuvent être indépendamment titrées et propagées, puisqu'elles confèrent une résistance à un antibiotique aux cellules qu'elles infectent (Smith, 1993). Lowman et al. ont utilisé le type de vecteur 3+3 pour mettre en évidence des mutants d'hormone de croissance humaine (hGH), ayant une augmentation d'affinité et de spécificité pour leurs différents récepteurs. Les mutations aléatoires du gène hGH ont été réalisées à 12 sites connus pour moduler la fixation de l'hormone sur ses récepteurs. Les différentes hormones mutantes ont été exprimées, de manière monovalente, en fusion au produit du gène 3 des phages filamenteux. Elles ont ensuite été sélectionnées par affinité et Lowman et al. ont remarqué que 50% des mutants sélectionnés avaient une affinité 8 fois supérieure à celle de l'hormone sauvage (Lowman et al., 1990).

### 1.3.2.3.3 Systèmes d'expression de type 8

Les systèmes d'expression de types 8 sont identiques à ceux de types 3, si ce n'est le fait que le peptide étranger est exprimé en fusion du produit du gène VIII plutôt qu'en fusion du produit du gène III (Smith, 1993). Greenwood et al. ont montré qu'il est effectivement possible d'exprimer des peptides de taille inférieure à 6 résidus au niveau de la protéine d'enveloppe majeure des phages filamenteux (Greenwood et al., 1992). Néanmoins, il est impossible d'exprimer des peptides de taille supérieure à ce niveau. Sans doute les insertions de cette ampleur disruptent-elles le processus d'assemblage des phages.



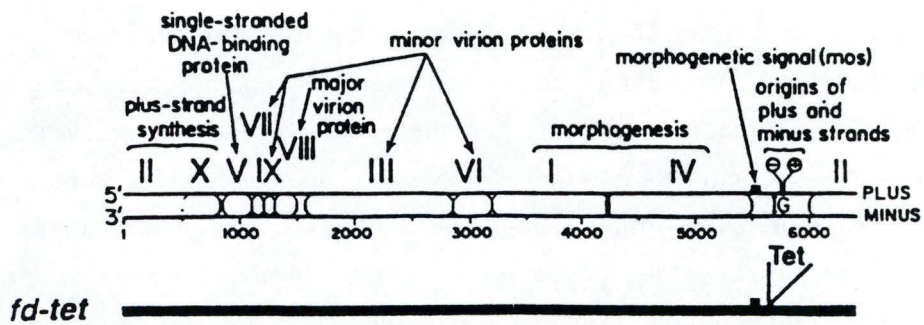


Figure 10  
 Carte génétique des phages fd-tet  
 (Smith, 1988)

#### 1.3.2.3.4 Systèmes d'expression de type 8+8

Lorsque les peptides étrangers ont une taille supérieure à 6 résidus et que l'on veut les insérer dans le produit du gène VIII, il faut recourir à un système qui utilise des particules phagiennes hybrides. Ces particules hybrides sont obtenues de la même manière que dans le cas des systèmes d'expression de type 3+3 (Smith, 1993). Greenwood et al. ont montré la possibilité d'expression de peptides de 12 résidus au niveau de la protéine PVIII, dans le cas de systèmes 8+8 (Greenwood et al., 1991). Felici et al. ont utilisé un système d'expression de type 8+8 dont les inserts peptidiques étaient des nonapeptides aléatoires. Ils ont montré de la sorte qu'il est possible d'isoler des clones spécifiques, interagissant avec un Ac monoclonal reconnaissant un épitope conformationnel de la PTX (Toxine de *Bordetella pertussis*) (Felici et al., 1992).

Bien qu'étant moins utilisés, il existe deux autres types de système d'expression. Ils sont dénomés type 33 et 88 (Figure 9). Dans les deux cas, deux gènes 3 ou 8 sont présents dans le génome des phages. Ceux-ci expriment donc un mélange de protéines recombinantes et sauvage (Smith, 1993).

### **1.3.3 La librairie épitopique mise au point par Smith**

La librairie de Smith est celle que nous avons utilisée lors de nos expériences. Elle est de type 3 et utilise les phages filamenteux comme vecteur d'expression. Le peptide étranger est exprimé à l'extrémité N-terminale des protéines PIII, les phages portant le gène de cette protéine de fusion au niveau de leur génome. Les phages utilisés sont du type fUSE 5 (DNAss) et sont dérivés des phages du type fd-tet portant le gène de la résistance à la tétracycline (Figure 10) (Smith, 1985 et 88).

#### **1.3.3.1 Caractéristiques des phages fUSE 5**

Ces phages présentent des caractéristiques particulièrement intéressantes pour la création d'une banque de peptides:



- 1) Les inserts étrangers ne modifient pas significativement la protéine PIII, ni lors de la morphogénèse quand elle est incorporée aux virions, ni durant l'infection quand elle se lie au pili sexuel des bactéries.
- 2) Puisque ce vecteur porte le gène de la résistance à la tétracycline (Tc) et que, contrairement à certains autres phages filamenteux, il ne tue pas son hôte, une infection suffit pour donner des clones transductants détectables (Tc-résistants).
- 3) Une mutation "frameshift" au niveau du site de clonage rend la souche fUSE 5 non infectieuse. La phase de lecture du gène de la protéine PIII ne peut être rétabli que par un insert de taille adéquate ne portant pas de codon stop. Ainsi seuls les phages contenant un insert forment les particules infectieuses de la librairie.
- 4) La propagation et l'isolement de l'ADN des phages fUSE sont identiques à celles des autres phages filamenteux (Scott and Smith, 1990 ).

### 1.3.3.2 Epitopes reconnus grâce à la librairie de Smith

Le criblage de la librairie construite par Smith et al. a permis d'identifier les épitopes et les séquences consensus suivants:

Scott et Smith ont mis en évidence l'épitope reconnu par des Ac dirigés contre la myohemerythrine, la séquence peptidique reconnue étant DFLEWL (Scott & Smith, 1990).

Scott et al. ont sélectionné quelques peptides se liant avec la concanavaleine A. Les différentes séquences étant ...YPY, MYWYPY, LYWYPY, IAWYPY (Scott et al., 1992).

Smith et al grâce à leur librairie, ont sélectionné des clones exprimant des peptides se liant avec la protéine-S (un fragment de ribonucléase pancréatique bovine); la séquence motif des peptides étant : (F/Y)NF(EV)(IV)(LV).(Smith et al., 1993)

Roberts et al. ont découvert des peptides capables de se lier à la streptavidine. Ils ont mis en évidence deux séquences consensus: GDWVFI et PWPWLG (Roberts et al., 1993). Il est à noter que ces deux peptides ne correspondent pas à la

---

séquence consensus (HPQ) mise en évidence précédemment grâce à d'autres systèmes (Lam et al, 1991; Devlin et al, 1990; McLafferty et al, 1993).

Ces différents travaux montrent la potentialité des bibliothèques peptidiques et des méthodes de sélection par affinité, pour la mise en évidence d'épitopes ou de sites de fixation.



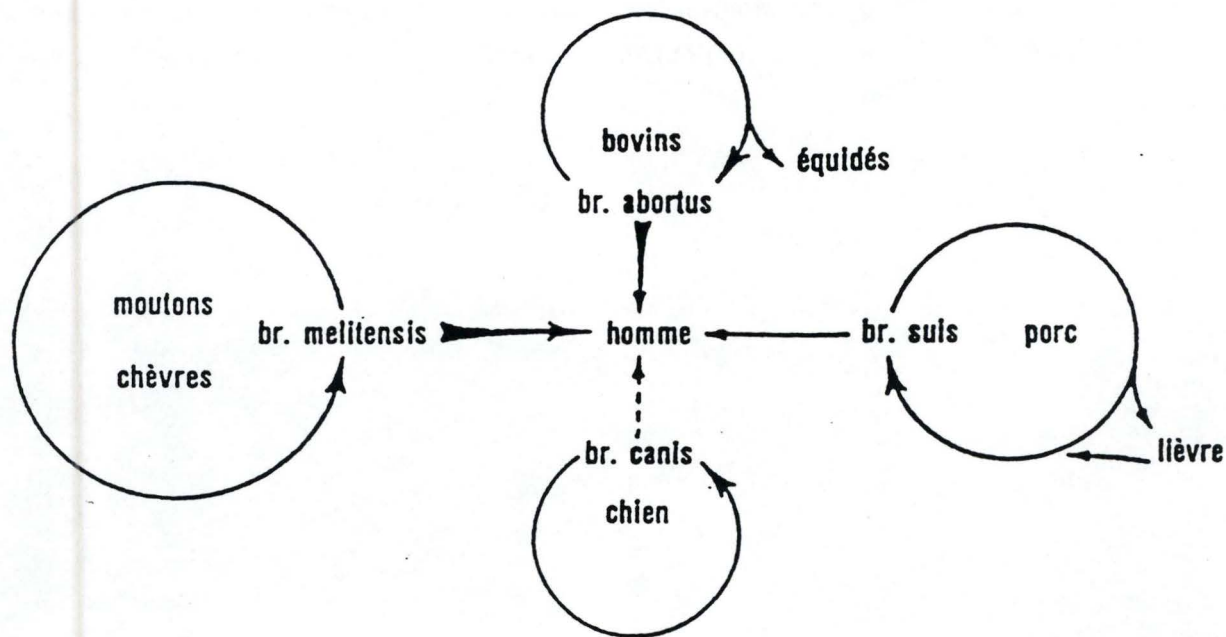


Figure 11  
Schéma épidémiologique de la brucellose

## **2. La Brucellose**

caractérise principalement par l'avortement chez la femelle, mais également par l'infection des glandes sexuelles chez le mâle. Les *Brucella* sont des parasites intracellulaires facultatifs capables de survivre et de se multiplier dans les cellules du système réticuloendothélial. La transmission naturelle se fait par ingestion ou contact avec des organismes présents dans les produits de l'avortement ou de la mise bas (foetus et ses annexes, placenta et sécrétions vaginales) et dans le lait. Les *Brucella* peuvent également pénétrer à travers les muqueuses, les conjonctives et les érosions de la peau. La brucellose est une maladie essentiellement rurale, les animaux jouant le rôle de réservoir microbien. Bien qu'en nette régression dans nos contrées, sa prévalence est en nette recrudescence dans les pays du bassin Méditerranéen et plus particulièrement au Proche-Orient où 25 pays relèvent la présence de la maladie. Dans seulement six de ceux-ci, plus de 90000 nouveaux cas par an de Brucellose humaine sont répertoriés. (World Health Organisation, 1993)

### **2.1 Historique**

La brucellose est une maladie qui existe depuis déjà très longtemps. En effet, on retrouve des traces de celle-ci dans la Bible ainsi que dans les écrits d'Hippocrate, 450 ans avant Jésus-Christ (Publication anonyme, 1977). Il faut cependant attendre 1859 pour que Marston, un chirurgien anglais, la décrive de manière précise. Elle est alors appelée fièvre de malte ou fièvre ondulante (Mazaré, 1971). C'est en 1887 que le major D. Bruce isole l'agent infectieux de cette fièvre à partir de la rate d'un soldat décédé. Il s'agit d'un bacille gram-négatif, il le nomme "*Micrococcus melitensis*" (Bruce, 1887). En 1905, Horrocks découvre la cause de la contamination des habitants de l'île de Malte en mettant en évidence la même bactérie dans le lait de chèvres maltaises. Celles-ci constituent donc le réservoir de la maladie (Horrocks, 1905). L'agent causal de l'avortement contagieux chez les bovins, *Bacterium abortus*, a été découvert par Bang en 1897 (Bang, 1897), mais ce n'est qu'en 1918 qu'Alice Evans suggère l'identité bactériologique et immunologique de *Micrococcus melitensis* et de *Bacterium abortus* (Brocard, 1955). Il faut encore attendre 1920 pour que Meyer et Shaw apportent la confirmation des dires de celle-ci. Ils proposent alors le nom de "Brucella" pour le germe



(Mazaré, 1971). Après la découverte par Traum en 1914 de *Brucella suis*, Huddelson sépare les *Brucella* en trois espèces: *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis* (Publication anonyme, 1977). Depuis lors, trois nouvelles espèces ont été identifiées : *B. canis*, *B. ovis* et *B. neotomae* .

## **2.2 Manifestations cliniques de la brucellose et mode de contamination bactérienne.**

Symptomatologiquement, la brucellose est une des affections les plus variées, la forme septicémique aiguë est l'aspect le plus typique mais non le plus courant. Trois symptômes associés y sont notables: la fièvre avec ses ondes successives, les sueurs très abondantes et les douleurs diffuses. Les formes cliniques sont très nombreuses et la phase aiguë passée, la brucellose peut devenir chronique; le microbe s'est alors implanté dans des gîtes viscéraux, difficilement accessibles à la thérapeutique antibiotique.

### **2.2.1 La brucellose humaine**

La brucellose humaine appelée également fièvre de Malte ou fièvre ondulante est due à *B. abortus*, *B. suis* ou *B. melitensis* dont la virulence est la plus importante. La transmission se fait le plus fréquemment par ingestion, contact direct, inhalation ou inoculation accidentelle. L'évolution de la maladie comporte trois stades : la prime infection brucellique, la brucellose aiguë et la brucellose chronique (Mazaré, 1971 et Frottier, 1979).

### **2.2.2 Les brucelloses animales**

La brucellose bovine est due dans quelques rares cas à *B. melitensis* et *B. suis* mais l'agent le plus souvent rencontré est *B. abortus* . L'infection se traduit par des avortements ou des naissances prématurées. La cause majeure de transmission de la maladie est la transmission horizontale par contact direct. Lors d'un avortement, des milliards de bactéries sont expulsées mais l'excrétion de *Brucella* se fait également par le lait. Chez le mâle, des *Brucella* sont rencontrées dans les testicules et organes génitaux annexes mais quoique l'excrétion puisse se faire dans le sperme, il ne constitue pas un mode majeur de contamination chez les bovins. Les symptômes chez la femelle sont une

Tests	<i>Brucella</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O9
Morphologie	petit coccobacille	petit coccobacille	forme en virgule	diplocoque	diplocoque	bâtonnet
Mobilité à 37°C	-	+	+	-	-	-
Mobilité à 20°C	-	-	-	-	-	+
Fermentation du lactose sur agar Mac Conkey	-	-	-	va	v	-
Production d'acide sur gélose glucosée	-b	-	-	-	v	+
Hémolyse sur gélose au sang	-	+	-	v	v	-
Catalase	+	+	+	v	+	+
Oxydase	+c	+	+	+	-	-
Uréase	+d	+	-	v	v	+
Réduction des nitrates	+e	+	+	v	-	+
Utilisation du citrate	-	+	-	-	v	-

a Espèces positives et négatives à l'intérieur du genre

b *B. neotomae* peut présenter une certaine fermentation

c Sauf *B. ovis*, *B. neotomae* et occasionnellement des souches de *B. abortus*

d Sauf *B. ovis* et occasionnellement *B. abortus*

e Sauf *B. ovis* qui ne réduit pas les nitrates en nitrites

Tableau 1  
Caractéristiques différenciant les *Brucella* d'autres bactéries gram négatif  
(Alton et al, 1988)



inflammation articulaire, une placentite ainsi que des altérations vasculaires, une ischémie et une dérégulation hormonale conduisant à l'avortement. Chez le mâle, on remarque une inflammation articulaire mais également une diminution du taux de fécondation et une épидидymite.

Il est à noter que la brucellose produit des symptômes semblables chez les ovins, caprins, porcins et d'autres espèces animales (chien, cerf, ...).

## **2.3. Les *Brucella***

### **2.3.1 Généralités**

Ce sont de petits coccobacilles, gram-négatifs, non mobiles, aérobies et asporulés (Tableau 1). Actuellement, 6 espèces sont reconnues selon les variations antigéniques, les hôtes primaires, les propriétés biochimiques et la sensibilité aux bactériophages : *Brucella melitensis* (chèvre et mouton), *B. abortus* (bovin), *B. suis* (porc), *B. ovis* (mouton), *B. neotomae* (wood rat) et *B. canis* (chien) (Grimont, 1992). *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. neotomae* sont normalement observées sous la forme dite lisse (S pour smooth). Par contre, *B. canis* et *B. ovis* apparaissent toujours en phase rugueuse (R pour rough). La différenciation de ces deux types de colonies se fait en transillumination oblique, les colonies S sont rondes lisses et bleues tandis que les colonies R sont jaunes et granuleuses. Des variations antigéniques et de virulence ont été mises en rapport étroit avec des transitions de phase S en phase R (Krieg, 1984). Tous ces organismes diffèrent dans leurs hôtes primaires, dans leur degré de virulence, dans leurs antigènes de surfaces et dans leur empreinte d'ADN génomique, néanmoins, ils appartiennent bien à un seul et même genre ( tableau 2 ).

Bien que les mécanismes immunitaires mis en jeu soient encore assez mal connus, il est un fait certain que l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale agissent de concert pour lutter contre la maladie. Il existe, à l'heure actuelle, principalement deux vaccins vivants contre la brucellose (B19 et REV 1), mais aucun de ceux-ci n'est totalement satisfaisant.

Espèces	Morphologie colonies	Besoin en sérum	Lyse par les phages			Oxydase	Uréase	Hôte préférentiel
			Tb		R/C			
			DCE	10 <sup>4</sup> x DCE	DCE			
<i>B. melitensis</i>	smooth	-	-	-	-	+	+ <sup>a</sup>	mouton, chèvre
<i>B. abortus</i>	smooth	- <sup>b</sup>	+	+	-	+ <sup>c</sup>	+ <sup>d</sup>	bovin biovar 1 : porc biovar 2 : lièvre, porc
<i>B. suis</i>	smooth	-	-	+	-	+	+ <sup>c</sup>	biovar 3 : porcs biovar 4 : renne biovar 5 : rongeur sauvage
<i>B. neotomae</i>	smooth	-	- <sup>f</sup>	+	-	-	+ <sup>e</sup>	rat du désert
<i>B. ovis</i>	rough	+	-	-	+	-	-	bélier
<i>B. canis</i>	rough	-	-	-	+	+	+ <sup>e</sup>	chien

<sup>a</sup> Réaction intermédiaire, quelques souches rapides

<sup>b</sup> Sauf *B. abortus* biovar 2 qui a généralement besoin de sérum pour sa croissance lors d'un isolement primaire

<sup>c</sup> Sauf *B. abortus* biovar 3 isolé au Sénégal et Guinée Bissau, qui sont négatives

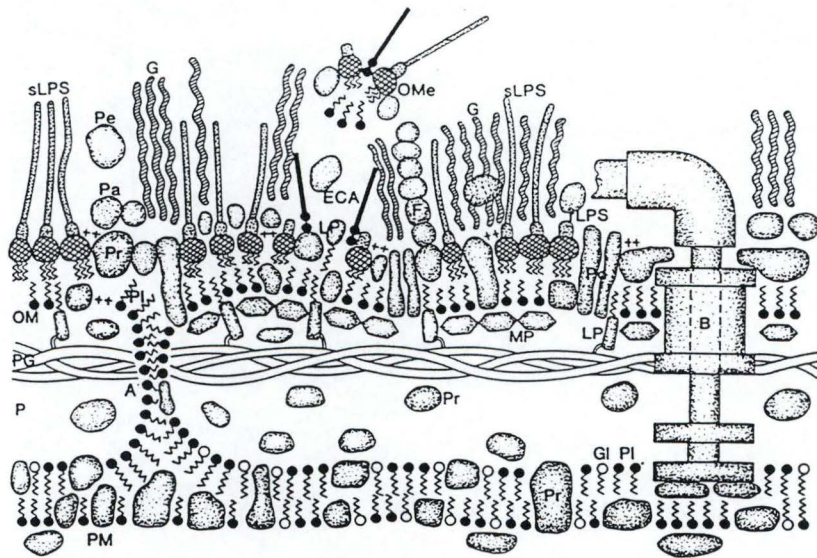
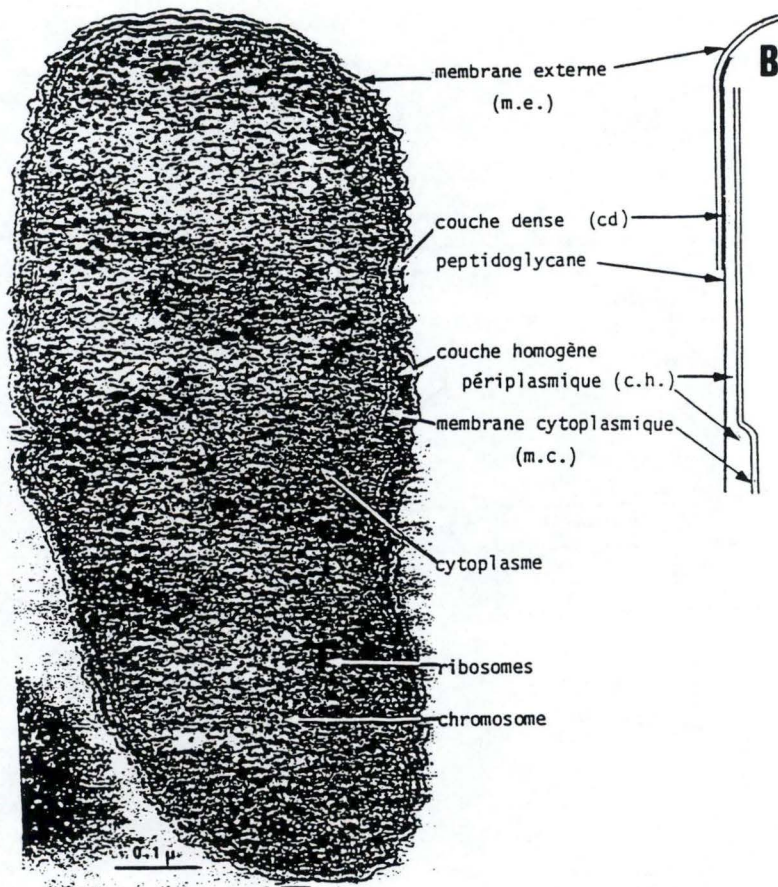
<sup>d</sup> Réaction intermédiaire sauf pour la souche de référence 544 et quelques souches du terrain qui sont négatives

<sup>e</sup> Réaction rapide

<sup>f</sup> Plages de lyse minuscules

Tableau 2  
Différentiation des espèces du genre *Brucella*  
(Alton et al, 1988)





OM : membrane externe ; PG : peptidoglycane ; P : espace périplasmique ; PM : membrane plasmique interne ; A : points d'attachement ; B : flagelle ; PI : phospholipides ; GI : glycolipides ; Pr : protéine ; sLPS : LPS en phase S ; rLPS : LPS en phase R ; ECA : antigène commun aux entérobactéries ; ++ : cations divalents ; LP : lipoprotéine ; MP : protéine matricielle ; Po : porine ; F : fimbriae ; Pa : protéine extrinsèque ; Pe : protéine extracellulaire ; OMe : fragments de membrane externe excrétés ; G : polyside capsulaire.

Figure 12  
a. Représentation schématique de l'organisation de la paroi des bactéries gram négatif (Wicken, 1985)  
b. Anatomie de la cellule de *Brucella* (Dubray, 1981)

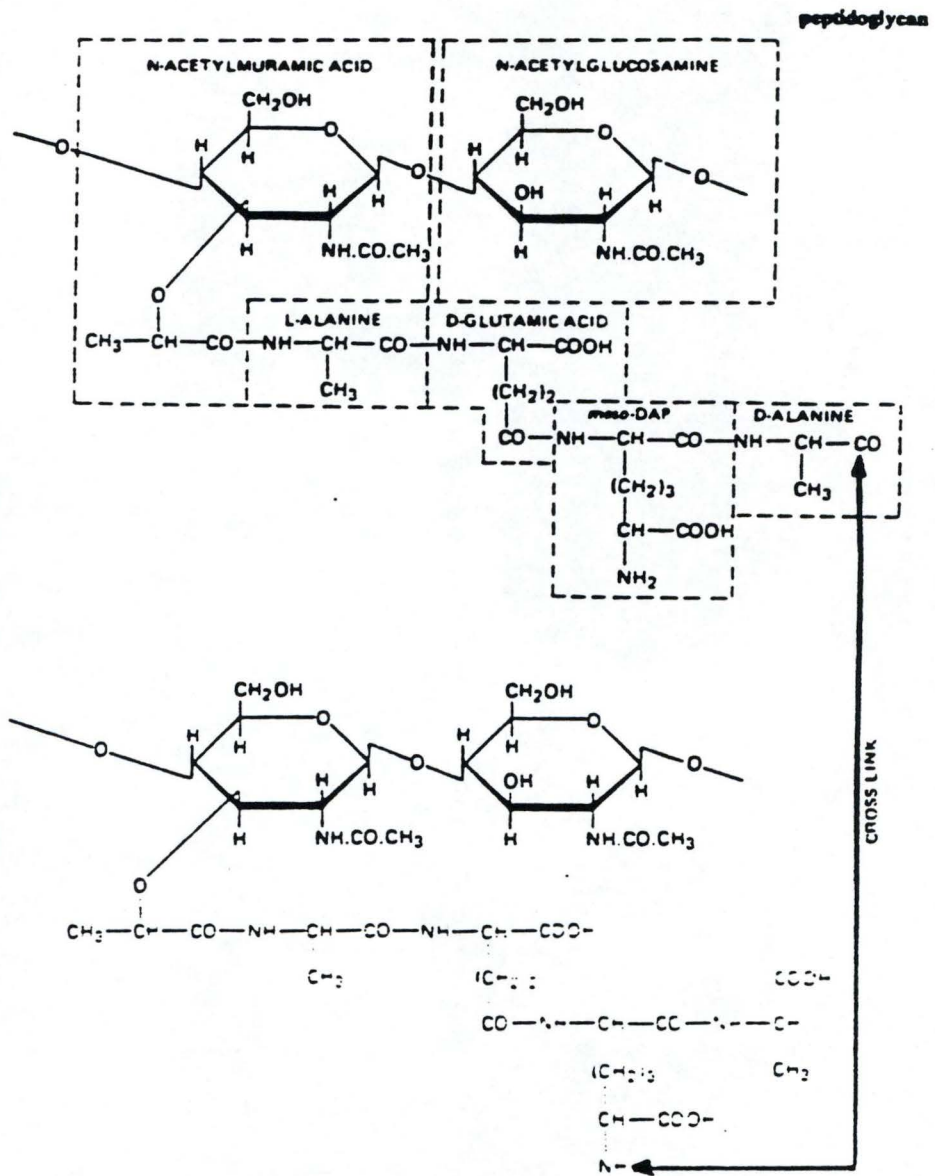


Figure 13  
Structure du peptidoglycane des parois bactériennes gram négatif



### **2.3.2 Caractérisation de la paroi**

Tout comme celle des autres bactéries gram-négatives, la paroi des *Brucella* est constituée d'une membrane plasmique, d'un espace périplasmique, d'une couche dense de peptidoglycane et d'une membrane externe (Figure 12). Les *Brucella* diffèrent cependant des autres bactéries gram-négatives par le fait que la membrane externe est étroitement liée à la couche dense de peptidoglycane (Moriyon, 1987).

La membrane plasmique se caractérise par une structure classique en double couche lipidique. Des agrégations granulaires adjacentes à cette membrane marque la présence de complexes polyribosomiaux (Dubray, 1972). Les bactéries gram-négatives, par opposition aux bactéries Gram-positives, montrent un espace entre la membrane cytoplasmique et les enveloppes externes. La taille de cet espace peut varier selon l'osmolarité du milieu extérieur. De nombreuses enzymes ont été mises en évidence dans cet espace, entre autres des enzymes impliquées dans le transfert et la transformation des nutriments et des enzymes de synthèse et de destruction de la paroi (Krieg and Holt , 1984).

Le peptidoglycane est considéré comme étant le squelette de la bactérie car il est responsable de sa forme et de sa rigidité. Ce peptidoglycane est constitué de filaments polysaccharidiques unis entre eux par des tétrapeptides. Ces filaments sont des polymères de sucres aminés et acétylés, la N-acétyl-glucosamine et l'acide N-acétyl-muramique (figure 13).

### **2.3.3. La membrane externe**

Dans la couche lipidique externe sont implantées les molécules de lipopolysaccharides(LPS) ainsi que de nombreuses protéines telles que les porines.

#### **2.3.3.1 Les protéines de la membrane externe**

Les récentes découvertes en biologie moléculaire ont attiré l'attention sur le rôle des protéines de la membrane externe (Outer Membrane Proteins : OMP ) en tant qu'antigènes protecteurs dans le développement de vaccins synthétiques plus sûrs et plus efficaces. Dubray et Bezard (1980) ont les premiers réussi à isoler trois antigènes de la

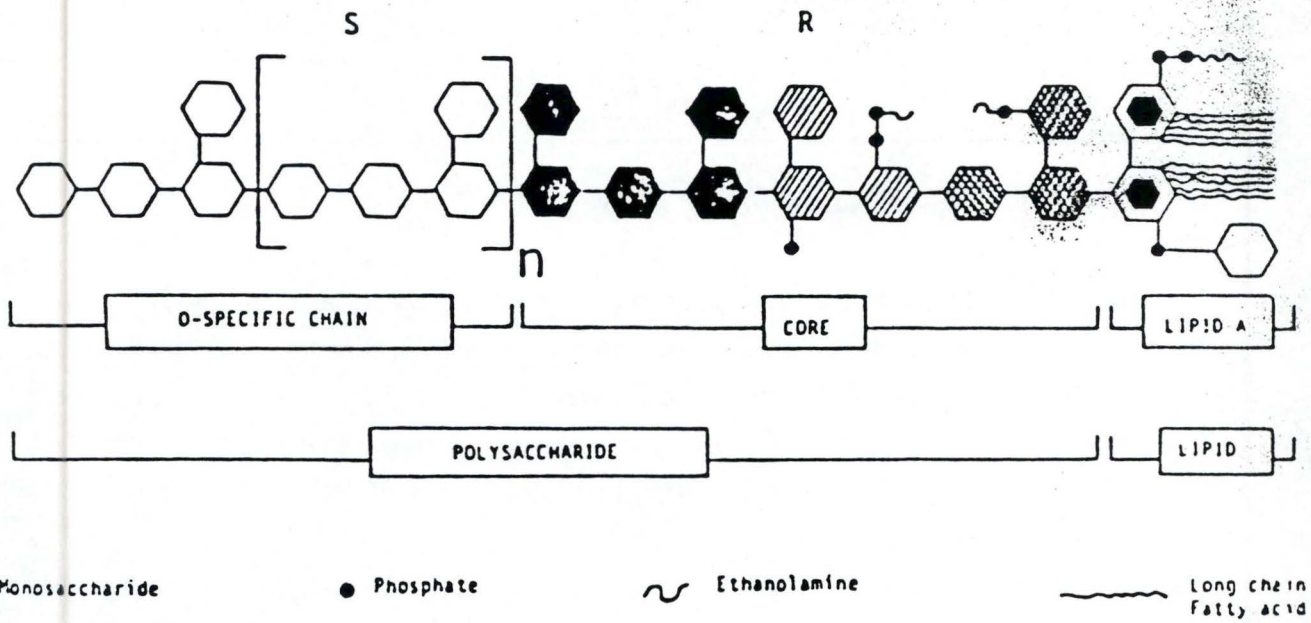
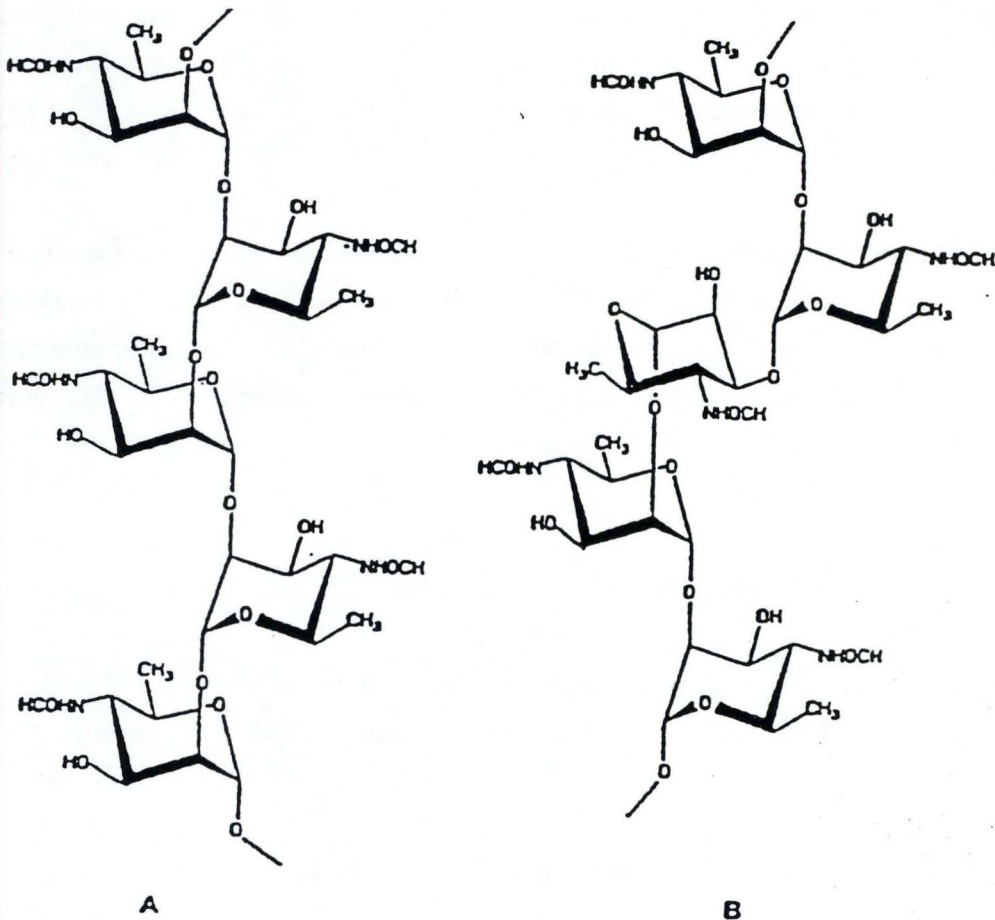


Figure 14  
Structure du LPS



- A. A>M : homopolymère de 4,6-didéoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyles unis par des liaisons  $\alpha$ -1,2.
- B. M>A : polymère linéaire d'unités répétitives composées de 4,6-didéoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyles dont quatre liaisons sont du type  $\alpha$ -1,2 et une du type  $\alpha$ -1,3.

Figure 15  
Structures chimiques des chaînes O des souches A>M (a) et M>A (b)  
(Dubray, 1981)



membrane externe de *Brucella abortus* présentant une masse moléculaire de 37, 25 et 15 kDa, ces protéines étant classées respectivement dans les groupes 1, 2 et 3. Verstrate et al (1982) ont mis en évidence trois groupes majeurs d'OMP de *Brucella abortus* ayant des similitudes structurelles avec celles d'*Escherichia coli*. Par SDS-PAGE de cellules traitées au lysozyme et extraites au N-laurylsarcosinate et un détergent ionique, ils ont démontré la présence de trois groupes d'OMP ayant une masse moléculaire apparente de 94, 41-43 et 30 kDa. Moriyon et Berman (1983) ont observé que contrairement aux autres bactéries Gram-négatives, les *Brucella* résistent à la formation de sphéroblastes en présence d'EDTA et de lysozyme. Ensuite, Dubray et Charriaut (1983) ont décrit la présence de bandes protéiques majeures de 43, 36-38, 25-27 kDa et d'une bande mineure de 31 kDa dans *Brucella abortus*. Les groupes de 36 à 38 et de 25 à 27 ont été décrits comme étant des glycoprotéines. Douglas et al (1984), ont démontré *in vitro* l'activité de porine des protéines de masse moléculaire de 37-42 kDa et l'absence de cette activité chez les protéines de masse moléculaire apparente de 26 kDa. Santos et al (1984) ont décrit la taille des OMP de *B. abortus*, *B. ovis* et de *B. canis* et ont formé trois groupes : groupe 1 : 88-94 kDa, groupe 2 : 35-39 kDa et groupe 3 : 25-31 kDa. Gomez-Miguel et Moriyon (1986) ont décrit chez *B. abortus* une lipoprotéine de 8 kDa liée de manière covalente au peptidoglycane et ayant une composition chimique similaire à la lipoprotéine de Braun isolée chez *E. coli*. Plus récemment, Cloeckert (1990), grâce à des Ac monoclonaux, a mis en évidence plusieurs protéines dites mineures n'étant pas liées au peptidoglycane. Ces protéines ont des masse moléculaire de 10, 16.5, 19 et 89 kDa. A l'heure actuelle, les données concernant les OMP de *B. abortus* sont encore quelque peu conflictuelles; en effet, bien que certains déclarent que les OMP majeures soient étroitement liées au peptidoglycane (Winter, 1987), d'autres rapportent que seules les lipoprotéines se lient de manière covalente à ce dernier (Gomez-Miguel et Moriyon, 1986; Moriyon et al, 1987).

### 2.3.3.2 Le LPS et sa structure

Le LPS est le mieux défini des facteurs de virulence exprimés par *Brucella*. Il est le constituant majeur de sa membrane externe. Selon sa structure, les différentes souches sont qualifiées S ou R (smooth ou rough). Le LPS intervient dans l'interaction phagocyte/bactérie et dans la survie intraphagocytaire, peut être en augmentant la résistance aux mécanismes oxydatifs de la cellule infectée (Ficht, 1990) Le LPS est constitué de trois parties (Figure 14) :

-Le lipide A: un glycolipide inséré dans la membrane et responsable de la toxicité du LPS. Des différences de structure sont observées chez *Brucella* par rapport

Méthode	Précocité	Persistance	Faux positifs	Faux négatifs	Effecteurs immunologiques				Antigènes
					IgG1	IgG2	IgM	IgA	
R.T.	+++	+++	rares	rares	±	±	+	+	LPS-S
E.A.T.	+++	+++	rares	très rares	+	-	+	-	LPS-S
S.A.W.	+	+	fréquents	fréquents	-	+	+	-	LPS-S
F.C.	++	++	très rares	très rares	+	-	+	-	LPS-S (PG, Bru) <sup>a</sup>
ELISA	+++	+++	ND <sup>b</sup>	ND	+	+	+	+	LPS-S
Identification bactériologique	variable selon le stade de l'infection		jamais	non rares					
IDR	+++	+++	jamais sur troupeau non vacciné	existent	-	-	-	-	Bru (PG)

<sup>a</sup> PG : peptidoglycane ; bru : brucelline

<sup>b</sup> ND : non déterminé

d'après Plommet, 1984b.

Tableau 3  
Epreuves de diagnostic en brucellose animale : fiabilité, effecteurs immunologiques, antigènes impliqués (Plommet 1984)



aux autres bactéries gram-négatives. Ainsi les acides laurique (C12), myristique (C14) et  $\beta$ -hydroxymyristique sont remplacés par les acides palmitique (C15), stéariques (C18) et 27-hydroxyoctacosanique (Martin et Hancock).

-Le core : il est constitué de D-glucose, D-mannose et de 2-amino-2,6-didéoxy-D-glucose (Martin and Hancock). Le 2-céto-3-didésoxyoctanate (KDO) relie le core au lipide A.

-La chaîne polysaccharidique ou chaîne O spécifique : ces chaînes sont des polymères de résidus 4,6-didéoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyle ( $\alpha$ -D-Rhap NFO) (Carroff et al., 1984). Les souches ne portant pas cette chaîne polysaccharidique sont dites R et les souches la possédant sont dites S. La chaîne O comporte deux types d'épitopes majeurs de *Brucella*, les antigènes A et M. La densité des antigènes A et M varie selon les espèces (A>M chez *B. abortus* et *B. suis*, M>A chez *B. melitensis*) (Cléments et al, 1990). C'est en fait cette chaîne O qui détermine la spécificité A ou M. Cette expression antigénique A ou M est à mettre en relation avec la proportion de liaisons  $\alpha$ 1,2 ou  $\alpha$ 1,3 présente dans la chaîne O (Meikle et al., 1989) Des analyses par SDS-PAGE du LPS et l'utilisation analytique d'anticorps monoclonaux de spécificité A ou M permettent de distinguer les souches A>M des souches M>A. La spécificité A réside essentiellement dans une séquence de résidus liés  $\alpha$ 1,2 avec un maximum de liaison  $\alpha$ 1,3 de 2%. Les souches M dominantes comportent 1 liaison  $\alpha$ 1,3 pour 4 liaisons  $\alpha$ 1,2 (Figure 15). Les réactions croisées entre le polysaccharide O du LPS des *Brucella* et le LPS de *Yersinia enterocolitica* 0:9, *E. coli* O157, *E. hermannii*, *Vibrio cholerae* et *Pseudomonas maltophilia* 555 peuvent être mises en relation avec l'occurrence de dérivés N-acétylés de résidus  $\alpha$ -D-RhapN présents dans leurs chaînes O respectives (Caroff et al, 1984).

## **2.4 Diagnostic**

Le diagnostic clinique des brucelloses est toujours difficile et insuffisant. Le recours au laboratoire s'avère donc indispensable. Le diagnostic est basé sur l'examen bactériologique (méthode directe), la recherche d'anticorps ou les épreuves allergiques (méthodes indirectes) (Tableau 3).

### **2.4.1 L'examen bactériologique**

La mise en évidence de *Brucella* vivantes dans des échantillons de tissus ou de fluides tel que le lait est la méthode la plus exacte pour la détection d'infection de *Brucella*. Dans la plupart des situations diagnostiques, la contamination est possible et il est donc recommandé d'utiliser plus d'un milieu sélectif. La culture sur des milieux appropriés permet la détermination de la souche et est la seule méthode de diagnostic irréfutable. Néanmoins, cette méthode est peu utilisée car les *Brucella* croissent lentement et les manipulations sont relativement dangereuses (Mayfield, 1990).

### **2.4.2 Epreuve allergique**

Les *Brucella* peuvent entraîner des réactions d'hypersensibilité de type immédiat (HSI) ou retardée (HSR), encore appelées réactions allergiques, chez les individus préalablement sensibilisés à l'agent infectieux brucellique. L'allergène utilisé à l'heure actuelle, appelé brucelline, est préparé à partir de la souche R de *B. melitensis* B115 (Jones et al., 1973). L'allergène est inoculé par voie intradermique (IDR). Son injection ne provoque ni réactions faussement positives ni formation d'Ac détectables par les épreuves sérologiques ni sensibilisation de l'organisme. De plus, la réaction cutanée induite par la brucelline est spécifique du genre *Brucella*. Elle est utilisée dans certains cas de réactions sérologiques croisées entre *Brucella* et *Yersinia* (Dubray, 1981).

### **2.4.3 Diagnostic sérologique**

Cet examen repose sur la détection d'anticorps dans le sang ou le lait (Mac Millan, 1990; Alton et al, 1988; Garin-Bastuji, 1993). Les Ac détectés sont presque exclusivement dirigés contre le LPS-S des *Brucella*.(Phillips et al, 1989)

Plusieurs tests sont utilisés :

-Séroagglutination lente en tube : les bactéries sont agglutinées par les anticorps présents dans les dilutions de sérums suspects; l'agglutination est observée à l'oeil nu.



-Test de Coombs : ce test repose sur la détection d'anticorps non agglutinants, c'est à dire capable de se fixer sur l'antigène mais non de provoquer une agglutination. La présence de ces anticorps est révélée par agglutination en ajoutant d'autres anticorps dirigés contre ceux-ci.

-Test du rose bengale : il s'agit d'une agglutination rapide sur lame de bactéries tuées colorées au rose bengale et à pH acide (Meikle et al, 1989).

-Test de fixation du complément : les anticorps sont détectés par leur capacité à activer le complément lorsqu'ils sont liés à leur antigène. Le sérum est incubé avec l'antigène (bactéries) et une source de complément à haute activité hémolytique. La révélation se fait par l'addition d'un système Ag-Ac constitué de globules rouges de moutons couverts d'Ac anti-globules rouges de mouton; en l'absence d'Ac dans le sérum, les globules rouges de mouton sont lysés par le complément resté libre.

-Ring test ou épreuve de l'anneau : ce test permet de détecter la présence d'anticorps dirigés contre les *Brucella* dans le lait. Une suspension de *Brucella* colorées est ajoutée au lait à tester. Le lait contenant des Ac anti-*Brucella* présente un anneau de crème coloré alors que le lait n'en contenant pas est uniformément coloré. Les Ac impliqués dans cette réaction sont les IgA associées aux IgM et plus rarement aux IgG.

-ELISA indirect (enzyme-linked immunosorbent assay) : l'Ag (LPS-S ou chaîne O purifiée) est adsorbé sur la surface des puits de la microplaque. Les Ac du sérum ou du lait se fixant sur l'Ag sont révélés par un anti-immunoglobuline couplé à une enzyme capable de transformer un substrat en un produit coloré. Toutes les classes d'immunoglobulines peuvent être détectées selon l'anti-immunoglobuline utilisé.

Ces tests se heurtent cependant à deux problèmes principaux :

- a) Il est difficile de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés car il existe une grande similitude entre les Ac persistants.
- b) Des réactions croisées sont observées entre *B. abortus* et *Yersinia enterocolytica* O:9. L'Ag responsable de ces réactions croisées est la chaîne O du LPS, en effet, il existe de grandes analogies de composition et de structure à ce niveau entre les deux espèces.

## **2.5 Intérêt de l'approche des mimotopes**

La problématique du diagnostic de la brucellose se situe au niveau de la spécificité des tests et comporte deux points. Tout d'abords des réactions croisées avec d'autres bactéries gram-négatives sont observées. De plus, ils ne permettent pas la distinction



entre les animaux vaccinés et les animaux infectés. La résolution de ces problèmes nécessite la détermination précise des épitopes du LPS. La complexité de la synthèse chimique des sucres rend cette étude très difficile. L'approche des mimotopes peut nous aider dans ce sens. Elle consiste en la mise en évidence de peptides mimant les épitopes du LPS. Ces peptides pourraient être utilisés comme antigènes lors d'épreuves diagnostiques ou lors de la vaccination. Le but est d'aboutir à un vaccin basé sur des antigènes protecteurs différents des antigènes de diagnostic, ces derniers devant à l'avenir être spécifiques de *Brucella*. Les outils qui seront exploités dans cette recherche sont les Ac monoclonaux anti-LPS qui ont été produits. Ils sont dirigés contre les épitopes A, M ou contre l'épitope C, commun au LPS-S des souches A et M de *Brucella*.

### 2.5.1 Antigène de diagnostic

Les réactions croisées sont principalement dues à des épitopes du LPS-S partagés entre *Brucella* et *Yersinia*. L'Ac 12G12 reconnaît un épitope spécifique de *Brucella*. Un test diagnostique basé sur la détection d'Ac dirigés contre cet épitope permettrait de résoudre ce problème de réactions croisées. La spécificité d'un ELISA de compétition utilisant l'Ac 12G12 a été évaluée au laboratoire (Dewale L., 1992). Le principe de ce test est le suivant : l'antigène immobilisé est du LPS-S de *Brucella*; il est mis en présence d'un mélange de sérum et d'Ac monoclonaux 12G12 couplé à la peroxydase. Le degré de compétition est évalué par mesure de l'absorbance du produit issu de la catalyse enzymatique par la peroxydase. En théorie, cette activité enzymatique ne sera diminuée par le sérum que lorsque celui-ci contient des Ac dirigés contre l'épitope reconnu par l'Ac monoclonal 12G12. En d'autres termes, une compétition entre l'Ac monoclonal marqué et des Ac sériques fait chuter l'activité enzymatique. Contrairement à ces attentes, ce test n'est toujours pas spécifique d'une infection brucellique. En effet, les séra d'animaux infectés par *Yersinia* inhibent la fixation de l'Ac monoclonal. Dans ce cas, les Ac n'entrent pas en compétition pour le même épitope mais se fixent à un épitope voisin de l'épitope spécifique, inhibant ainsi la fixation de l'Ac monoclonal par encombrement stérique. Il sera donc nécessaire de mettre en oeuvre à l'avenir un autre test. Un ELISA spécifique de *Brucella* nécessiterait l'utilisation comme antigène de l'épitope spécifique du LPS-S de *Brucella* purifié. Une telle purification à partir de la paroi bactérienne est inconcevable. La complexité de la synthèse des oligosaccharides freine son utilisation pour ce type d'application. L'approche mimotope présente donc un intérêt tout particulier. Elle consiste à isoler un peptide dont la conformation mime celle de l'épitope du LPS étudié. Ce peptide mimotope est sélectionné par sa capacité à fixer l'Ac monoclonal anti-



LPS correspondant. L'espérance est que la spécificité du test ELISA sera grandement améliorée par l'utilisation de ce peptide spécifique comme antigène.

### 2.5.2 Antigènes protecteurs

Des expériences de protections passives (injection d'Ac monoclonaux suivie d'une épreuve brucellique virulente) menées dans le modèle murin ont montré le pouvoir protecteur de deux Ac monoclonaux anti LPS-S : 12G12 et 4F9 (Limet et al., 1989 et Cloeckart et al., 1992). L'Ac monoclonal 12G12 étant spécifique du LPS (commun aux Ag A et M) de *Brucella*, son utilisation potentielle est située au niveau du diagnostic. L'Ac destiné à une utilisation vaccinale serait donc l'Ac monoclonal 4F9. Cet Ac monoclonal reconnaît également le LPS de *Yersinia enterocolytica* O:9. L'identification de peptides mimant ces épitopes de LPS peut être entreprise en criblant une banque d'expression de peptides aléatoires au moyen des Ac monoclonaux choisis. Les peptides mimotopes peuvent alors être produits et leur pouvoir protecteur testé dans le cadre d'un vaccin sous-unitaire. Si des mimotopes différents sont utilisés en protection et en dépistage, vaccination et diagnostic seront alors compatibles.

## B. But du travail

Le but de ce travail est la mise au point des conditions de manipulation et de criblage immunologique d'une banque de peptides aléatoires. Ces peptides sont exprimés à la surface de phages, en fusion à l'une de leurs protéines d'enveloppes. Dans un premier temps, afin d'évaluer la potentialité de la banque de peptides aléatoires, nous envisageons de la cribler avec la streptavidine pour laquelle quelques séquences peptidiques (mimotopes) peuvent se substituer à la biotine. Un fois ces mises au point terminées, nous nous proposons d'isoler un ou plusieurs peptides mimant un des épitopes de la chaîne oligosaccharidique du LPS de *Brucella*, en criblant la banque avec un anticorps monoclonal anti-LPS.



# Matériel et méthodes

## C. Matériel et méthodes

### **1. Production, purification, concentration et couplage de l'Ac anti-LPS**

Plusieurs Ac monoclonaux anti LPS sont à notre disposition, notre choix s'est porté sur l'Ac B6604F9M. C'est une immunoglobuline de type IgG2a qui est dirigée contre l'épitope A du LPS de Brucella. Des cellules du clone B6604F9M ont été mises en culture dans du milieu RPMI-FCS. Il s'agit de milieu RPMI 1640 (Gibco) auquel on a ajouté 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (Fetal Calf Serum). Ce milieu contient les aa, les sels et les vitamines nécessaires à la croissance des hybridomes. Les surnageants de cultures ont été précipités au sulfate d'ammonium puis purifiés sur colonne de protéine A-sépharose. Les protéines ainsi purifiées ont été concentrées sur mini-colonne centricon 30 (Amicon) jusqu'à 1 mg/ml.

#### **1.1 Production de l'Ac en surnageant de culture.**

##### Solutions :

RPMI 1640 pH 7,4 : Milieu en poudre RPMI stock pour 5 litres (GIBCO BRL)

NaHCO<sub>3</sub> 4,25 g

Hepes 23,85g

Sodium pyruvate (GIBCO BRL) 50 ml

Glutamine (GIBCO BRL) 50 ml

gentamycine 50 ml

FCS 10%

Porter à 5 litres avec de l'eau distillée

- 1) Dégeler les cryotubes contenant les hybridomes.
- 2) Transférer le contenu des cryotubes dans un tube stérile de 10 ml et centrifuger 10 minutes à 1200 rpm à température ambiante.
- 3) Resuspendre le culot et transférer dans un flacon stérile, ajouter 10 ml de RPMI-



FCS décomplémenté.

- 4) Incuber à 37°C, 3-5% de CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée.
- 5) Quand la densité cellulaire est suffisante, transférer dans un flacon de plus grande contenance.
- 6) Le surnageant des cultures est récupéré quand les cellules sont à la fin de leur phase de croissance exponentielle. Il est transféré dans un tube stérile de 50 ml et centrifugé 10 minutes à 4000 rpm à température ambiante. Le surnageant est ensuite récupéré et conservé à -20°C.

### **1.2 Précipitation des immunoglobulines contenues dans le surnageant de culture avec du sulfate d'ammonium**

#### Solutions :

-PBS : 8g NaCl

0,2g KCl

1,44g NaHPO<sub>4</sub>

0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Dans 1 litre d'eau pH7,4 avec HCl

-Tampon de liaison : 1,5M glycine, 3M NaCl, pH 8,9

- 1) Préparer de l'Ammonium Sulfate (AS) saturé, >5,8 M (>767 g/l).
- 2) Précipiter les protéines en ajoutant goutte à goutte, lentement, l'AS au surnageant de culture (le volume final représente 45% d'AS et 55% de surnageant de culture). Travailler sur glace et utiliser un agitateur magnétique. Une floculation apparaît à la fin de l'opération.
- 3) Incuber 10 minutes sur glace.
- 4) Centrifuger à 3000 g pendant 30 minutes à température ambiante et enlever prudemment le surnageant.
- 5) Resuspendre le culot dans 2,5 ml de PBS.

- 6) Dialyser 12 heures (membrane de dialyse spectrapore de cut-off de masse moléculaire de 10000) dans 3 litres de PBS ou le tampon de liaison (si une purification sur colonne protéine A sépharose est envisagée).

### **1.3 Purification des immunoglobulines sur colonne de protéine A-sépharose**

La protéine A a été isolée de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus*. Elle est capable de fixer une large variété d'immunoglobulines par leur fragment Fc. Les différents types d'immunoglobulines fixées sur la protéine A peuvent être éluées séparément par l'utilisation de tampons de pH différents.

Les IgG1 sont éluées avec un tampon d'éluion à pH 6.

Les IgG2a sont éluées avec un tampon d'éluion à pH 4,5.

Les IgG2b sont éluées avec un tampon d'éluion à pH 3.

#### Solutions :

- Tampon d'éluion : 0,1M tampon citrate (500ml) pH 6, 4,5 et 3.
- Tampon de liaison : 1,5M glycine, 3M NaCl, pH 8,9
- TRIS/HCl 0,5 M
- PBS NaN<sub>3</sub> 0,002%

- 1) Équilibrer la colonne avec du tampon de liaison jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit stable.
- 2) Déposer l'échantillon sur la colonne et laver avec du tampon de liaison. Le pic d'absorbance à 280 nm qui apparaît à ce stade comporte les protéines contaminantes non retenues sur la colonne.
- 3) Eluer les immunoglobulines en ajoutant successivement les tampons d'éluion pH 6, 4,5 et 3 (l'éluion est suivie par l'absorbance à 280 nm). Collecter séparément les échantillons.
- 4) Laver la colonne avec du tampon de liaison puis avec du PBS-NaN<sub>3</sub> 0,002% avant de la stocker. Le NaN<sub>3</sub> est un inhibiteur de la croissance cellulaire permettant



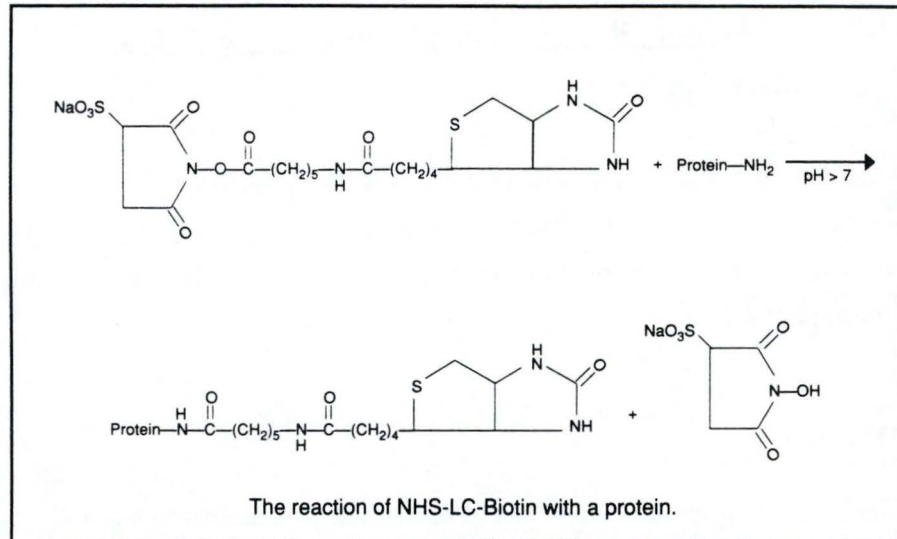


Figure 16  
 Réaction de la biotine avec une protéine

d'éviter toute contamination.

- 5) Réajuster le pH des échantillons à 7,4 avec du TRIS/HCL 0,5 M (pH 7,4). Dialyser les échantillons 12 heures contre du PBS (membrane de dialyse spectrapore de cut-off de masse moléculaire de 10000). Mesurer la concentration en protéine à une absorbance de 280 nm.

#### **1.4 Biotinylation de l'Anticorps monoclonal purifié**

L'anticorps monoclonal purifié va être utilisé dans une technique appelée le Biopanning (point 2.2). Cette technique de purification repose sur la fixation de la biotine sur la streptavidine. Les Ac que nous allons utiliser doivent donc être couplés à la biotine. La biotine est couplée au niveau des extrémités NH<sub>2</sub>-terminales des protéines (Figure 16).

##### Solutions :

-NaHCO<sub>3</sub> 1M

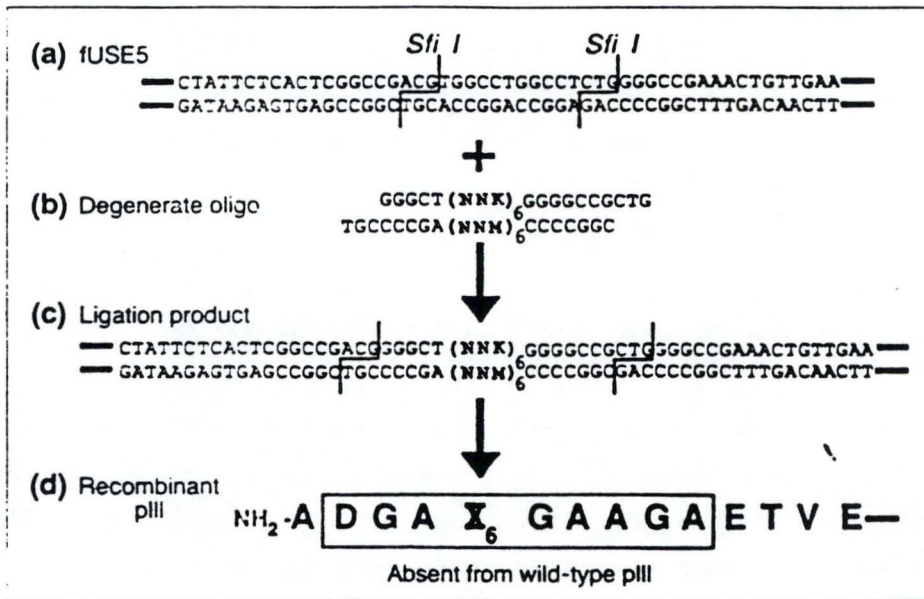
-NaOAc 2mM

-Tampon éthanolamine 1M pH 9 (HCl)

-TBS : 50mM Tris HCl pH 7,5 et 150 mM NaCl

- 1) Ajouter 4,4 µl de NaHCO<sub>3</sub> 1M à 40 µg d'Ac. Porter à 24 µl avec H<sub>2</sub>O.
- 2) Dissoudre 1 mg de biotine (Pierce NHS-LC-biotin) dans du NaOAc 2 mM (pH6) jusqu'à l'obtention d'une concentration de 0,9 mM. Ajouter cette solution à l'Ac dilué et laisser incuber 2 heures à température ambiante.
- 3) Ajouter ensuite 500 µl de tampon éthanolamine 1M (ajusté à pH9 avec de l'HCl) et incuber 2 heures à température ambiante. En réagissant directement avec les molécules de biotine restées libres, le tampon évite la biotinylation ultérieure de la BSA utilisée comme protéine porteuse (Sérum Albumine Bovine)(Sigma).
- 4) Ajouter 20µl de BSA (sigma) (50 mg/ml) et 1 ml de TBS.
- 5) Concentrer la solution sur une colonne Centricon 30 (Amicon). Laver 1 fois la colonne avec du TBS NaN<sub>3</sub> 0,02%. Récupérer la solution retenue et mesurer





**Figure 2**

Construction of a recombinant viral genome bearing epitope-encoding degenerate oligonucleotide inserts in pIII. (a) The DNA of the fUSE5 vector is cleaved with *Sfi* I then ligated with a similarly cleaved, double-stranded oligonucleotide bearing degenerate (NNK) codons (b) to form (c), a recombinant genome. The amino acid sequence of mature recombinant pIII, starting at the amino terminus of (d), the pIII fusion product (adapted from Ref. 11).

Figure 17  
Création de la banque  
(Scott, 1992)

l'absorbance à 280 nm (environ 1mg/ml). Les Ac biotinylés sont stockés à 4°C.

## 2. Criblage immunologique de la banque

### 2.1. Création de la banque de peptides aléatoires

Cette banque a été réalisée par ligation (avec la T4 ligase) d'un fragment d'ADN synthétique clivé par l'enzyme de restriction *Bgl* I dans le génome de phages de type FUSE 5. Le produit de ligation a été électroporé dans *E. Coli* (Figure 17)(Parmley and Smith 1988; Scott 1992). Ce fragment *Bgl* I contient la séquence codante dégénérée (NNK)<sub>6</sub> où N est un mélange équimolaire des déoxynucléotides G, A, T et C, et où K correspond uniquement à G et T en quantité équimolaire. Donc NNK représente 32 des 64 triplets du code génétique en quantité équivalente, incluant les codons pour les 20 acides aminés et le codon stop ambre.

Les inserts ont été préparés grâce à un synthétiseur d'ADN, chaque fragment comportant une séquence dégénérée encadrée par les régions invariables présentées ci-dessous.

5'HO-CTATTCTCACTCGGCCGACGGGGCT(NNK)<sub>6</sub>GGGGCCGCTGGGGCCGAAACTGTTGAA-3'

En utilisant des primers biotinylés complémentaires des régions invariables, les fragments ont été amplifiés par PCR.

3' BIO-GATAAGAGTGAGCCGGCTG

5'HO-CTATTCTCACTCGGCCGACGGGGCT(NNK)<sub>6</sub>GGGGCCGCTGGGGCCGAAACTGTTGAA-3'  
GACCCCGCTTTGACAACCTT-BIO5'

Après digestion avec *Bgl* I, les fragments restreints inintéressants (ne comportant pas la région aléatoire) ont été éliminés par fixation de la biotine sur une colonne contenant de la streptavidine conjuguée à de l'agarose.

Les fragments contenant la région dégénérée

5' GG-GCT-(NNK)<sub>6</sub>-GGG-GCC-GCT-G 3'  
3' TG-CCC-CGA-(NNK)<sub>6</sub>-CCC-CGG-C 5'

ont été ensuite clonés dans la forme répliquative (RF) de l'ADN des phages FUSE 5 préalablement clivés par *Sfi* I et débarrassés du fragment de 14 pb compris entre les deux sites *Sfi* I (Figure 17). Un phage possède dans son ADN un seul fragment *Bgl* I et exprime l'hexapeptide correspondant au niveau de ses protéines PIII juste après le site de



l'absorbance à 280 nm (environ 1mg/ml). Les Ac biotinylés sont stockés à 4°C.

## 2. Criblage immunologique de la banque

### 2.1. Création de la banque de peptides aléatoires

Cette banque a été réalisée par ligation (avec la T4 ligase) d'un fragment d'ADN synthétique clivé par l'enzyme de restriction *Bgl* I dans le génome de phages de type FUSE 5. Le produit de ligation a été électroporé dans *E. Coli* (Figure 17)(Parmley and Smith 1988; Scott 1992). Ce fragment *Bgl* I contient la séquence codante dégénérée (NNK)<sub>6</sub> où N est un mélange équimolaire des déoxynucléotides G, A, T et C, et où K correspond uniquement à G et T en quantité équimolaire. Donc NNK représente 32 des 64 triplets du code génétique en quantité équivalente, incluant les codons pour les 20 acides aminés et le codon stop ambre.

Les inserts ont été préparés grâce à un synthétiseur d'ADN, chaque fragment comportant une séquence dégénérée encadrée par les régions invariables présentées ci-dessous.

5'HO-CTATTCTCACTCGGCCGACGGGGCT(NNK)<sub>6</sub>GGGGCCGCTGGGGCCGAAACTGTTGAA-3'

En utilisant des primers biotinylés complémentaires des régions invariables, les fragments ont été amplifiés par PCR.

3' BIO-GATAAGAGTGAGCCGGCTG  
5' HO-CTATTCTCACTCGGCCGACGGGGCT (NNK)<sub>6</sub>GGGGCCGCTGGGGCCGAAACTGTTGAA-3'  
GACCCCGGCTTTGACAACCTT-BIO5'

Après digestion avec *Bgl* I, les fragments restreints inintéressants (ne comportant pas la région aléatoire) ont été éliminés par fixation de la biotine sur une colonne contenant de la streptavidine conjuguée à de l'agarose.

Les fragments contenant la région dégénérée

5' GG-GCT-(NNK)<sub>6</sub>-GGG-GCC-GCT-G 3'  
3' TG-CCC-CGA-(NNK)<sub>6</sub>-CCC-CGG-C 5'

ont été ensuite clonés dans la forme répliquative (RF) de l'ADN des phages FUSE 5 préalablement clivés par *Sfi* I et débarrassés du fragment de 14 pb compris entre les deux sites *Sfi* I (Figure 17). Un phage possède dans son ADN un seul fragment *Bgl* I et exprime l'hexapeptide correspondant au niveau de ses protéines PIII juste après le site de

clivage de la signal peptidase. Chaque hexapeptide est bordé du côté NH<sub>2</sub>-terminal par NH<sub>2</sub>-ADGA- et du côté COOH par -GAAGA-. Ces séquences bordantes permettent de minimiser l'influence de la protéine PIII sur la conformation épitopique.

La banque entière contient  $1,3 \times 10^{14}$  phages, représentant  $2 \times 10^8$  clones. Théoriquement, 69% des hexapeptides possibles sont représentés ( Smith and Scott , 1990 ; Scott , 1992 ).

## **2.2. Sélection des phages par affinité ou "Biopanning"**

Cette technique de purification repose sur la forte affinité de la streptavidine pour la biotine. La banque est mise en présence de l'Ac biotinyllé. Les phages exprimant un peptide ayant une affinité pour l'Ac sont ainsi captés via celui-ci sur un support solide recouvert de streptavidine. Les phages non captés sont éliminés par lavages successifs tandis que les phages captés sont récupérés par élution à l'acide (Parmley & Smith, 1988).

## **2.3 Sensibilisation des boîtes de pétri avec la streptavidine**

### Solutions :

-NaHCO<sub>3</sub> 1M

-TBS/Tween : 50mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl et 0,5% Tween  
20

-Solution de saturation : 0,1M NaHCO<sub>3</sub>; 5mg/ml BSA; 0,1 µg/ml  
streptavidine et 0,02% NaN<sub>3</sub>.

- 1 . Dans le fond d'une boîte de pétri de 35 mm (Falcon), déposer 900 µl d'H<sub>2</sub>O, 100 µl de NaHCO<sub>3</sub> 1M stérile (pH non ajusté). Dans cette solution, ajouter 10 µg de streptavidine (Pierce, immunopure streptavidine). Agiter pour mélanger la streptavidine et recouvrir l'entièreté de la boîte de pétri. Placer la boîte 1 nuit à 4°C dans une boîte en plastique humidifiée de préférence sur un agitateur.
- 2 . Enlever la solution de streptavidine et remplir la boîte de pétri avec la solution de saturation; laisser réagir au moins 1 heure au froid.



Remarque : La solution de saturation contient de la BSA pour éviter l'adsorption non spécifique de protéines sur le plastique.

- 3 . Enlever la solution de saturation et laver rapidement la boîte 6 fois avec du TBS/Tween 0,5%. Procéder immédiatement à la procédure de panning.

## **2.4 Le panning**

Classiquement, trois cycles de biopanning sont réalisés avant la propagation individuelle des clones (point 3.1). Ces pannings suivis d'amplifications intermittentes sont réalisés avec des concentrations décroissantes en Ac biotinylé afin de favoriser la sélection des clones de haute affinité. Les phages utilisés lors des biopannings proviennent de la banque réamplifiée, ceci pour éviter l'épuisement de la banque originale. Cette amplification a été réalisée par infection (de cellules de la souche E. coli K91Kan) et croissance cellulaire suivie par une purification des phages sur un gradient de chlorure de césium. La banque réamplifiée a un titre de  $10^{14}$  virions/ml.

### **2.4.1 1<sup>er</sup> cycle ou P+LS ("Phage+ligate-streptavidine")**

Le premier cycle favorise la sélection d'une large gamme de phages. Une quantité saturante d'Ac biotinylé est préincubée avec la streptavidine fixée sur le fond de la boîte. Les phages (environ  $10^{12}$  virions) sont ensuite ajoutés.

- 1 . Dans chaque boîte de pétri de 35mm (Falcon) sensibilisée à la streptavidine (pierce), ajouter 400  $\mu$ l de TBS/Tween 0,5% contenant 1 mg/ml de BSA dialysée (sigma) et 0,02 % de  $\text{NaN}_3$ .
- 2 . Ajouter l'Ac biotinylé à chaque boîte. Dans le premier round de biopanning la quantité d'Ac n'est pas suffisamment faible que pour être discriminante. Dans notre cas, nous avons utilisé environ 10  $\mu$ g. Agiter la boîte entre 2 et 12 heures dans une atmosphère humide à 4°C.
- 3 . Dans chaque boîte, ajouter 4  $\mu$ l de biotine (stérilisée par filtration) 10 mM; agiter une heure à 4°C. Cette étape permet de bloquer les derniers sites de fixation de la biotine sur la streptavidine immobilisée. Puisque la fixation de la biotine sur la

streptavidine est presque irréversible, aucun déplacement des complexes biotine-Ac fixés n'apparaît.

- 4 . Laver 6 fois comme précédemment (point 2.3 étape 4) et ajouter 400 µl de TBS/Tween 0,5% ainsi que 4 µl de biotine 10 mM.
- 5 . Ajouter les phages dans chaque boîte. Normalement, 5 µl de la banque originale ou 100 µl de l'éluat amplifié provenant des cycles de biopanning précédents. Agiter les boîtes 4 heures à 4°C dans une atmosphère humide.
- 6 . Procéder ensuite à l'élution des phages (voir point 2.4.3).

#### **2.4.2 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> cycle ou PL+S("Phage-ligate+streptavidine)**

Les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> cycles favorisent la sélection des ligands de haute affinité. L'Ac biotinylé est préincubé avec la solution de phages; la solution de départ du second panning (100 µl) correspond à la totalité de l'éluat amplifié et concentré après le premier panning. Par contre, la solution de départ du troisième panning (100 µl) correspond à une partie de l'éluat amplifié après le deuxième panning (voir point 2.4.4). Les complexes phages-Ac-Biotine sont ensuite captés par la streptavidine.

- 1 . Faire réagir 12 heures à 4°C l'Ac biotinylé et un volume approprié de phages (100 µl). Lors du second et du troisième panning, la quantité d'Ac ajoutée aux phages est respectivement de 1 et de 0,01 µg.
- 2 . Ajouter 400 µl de TBS/Tween 0,5% à la banque préincubée avec l'Ac biotinylé et l'introduire immédiatement dans une boîte de pétri sur laquelle de la streptavidine a été immobilisée. Agiter lentement à température ambiante pendant 10 minutes. Procéder immédiatement à l'élution des phages (point 2.4.3).



### **2.4.3 Elution des phages**

#### Solutions :

- Tampon d'éluat : 0,1 N HCl; 1mg/ml BSA et à,1 mg/ml rouge phénol
- Tris/HCl 1M pH9,1

- 1 . Eliminer les phages non captés.
- 2 . Laver la boîte 10 fois (Point 2.3 étape 4).
- 3 . Ajouter dans chaque boîte, 400 µl de tampon d'éluat et agiter lentement pendant 10 minutes.
- 4 . Transférer l'éluat dans un eppendorf contenant 75 µl de TRIS HCl 1M pH 9,1. Le pH final devrait être compris entre 7 et 8,5. La neutralisation de la solution contenant les phages est vérifiée en lui ajoutant du rouge phénol. La solution passe d'une coloration jaune à une coloration rose à pH 7-8.

### **2.4.4 Amplification de l'éluat**

La totalité du 1<sup>er</sup> éluat est concentrée puis amplifiée afin de servir de suspension de départ pour le 2<sup>ème</sup> panning; ceci permet de limiter la perte de clones pertinents mais qui seraient proportionnellement faiblement représentés. Seulement 21% (100 µl) du 2<sup>ème</sup> éluat sont amplifiés afin de servir de suspension de départ pour le troisième panning; 21% du 3<sup>ème</sup> éluat seront amplifiés et les clones étalés sur boîte. Ce sont ces clones, propagés individuellement, qui seront par la suite séquencés.

#### **2.4.4.1 Concentration du 1er éluat sur centricon**

Si l'on amplifie le premier éluat, il faut préalablement le concentrer sur colonnes centricon 30 (Amicon).

- 1 . Equilibrer la colonne centricon avec du TBS et transférer l'éluat dans la colonne.

- 2 . Centrifuger à 2000 rpm, 10 minutes à température ambiante .
- 3 . Récupérer la solution retenue (environ 50 µl) et la transférer dans un eppendorf.
- 4 . Rincer la membrane du Centricon avec 50 µl de TBS, mélanger et récupérer la solution. Ajouter la à la solution retenue précédemment (étape 3)(Volume final=100µl).

#### 2.4.4.2 Amplification de l'éluat

##### Solutions et milieu :

- PEG/NaCl : 100 g PEG 8000 et 116,9 g NaCl (475 ml H<sub>2</sub>O)
- milieu NZY : 10 g NZ amine A; 5 g d'extraits de levure et 5 g NaCl.  
Dissoudre dans 1 litre d'eau et ajuster le pH à 7,5 avec du NaOH.
- Tampon NAP : 80 mM NaCl; 50 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH ajusté à 7 avec NH<sub>4</sub>OH
- Milieu terrific broth : Pour 900 ml d'H<sub>2</sub>O : 12g Bactotryptone; 24 g d'extrait de levure et 4ml de glycérol.

Souche : La souche K91 est un dérivé  $\lambda^-$  de la souche K-38; ele est Hfr cavalli et a un génotype *Thi* (qui rend sa croissance dépendante de la présence de vitamine B1 dans son milieu de culture). La souche K91Kan que nous avons utilisé est une souche K91 portant l'élément "mini-Kan hopper". Cet élément est un transposon portant la résistance à la kanamycine mais ayant perdu son gène de transposase. Il a été inséré dans le gène *lacZ*.

##### -Préparation de "starved cells":

- 1 . Inoculer 20 ml de NZY. Agiter à 37°C jusqu'a l'obtention d'une absorbance de 0,45 à 600 nm.
- 2 . Agiter lentement 5 minutes supplémentaires pour permettre la régénération des pili F.
- 3 . Centrifuger les cellules à 2200 rpm 10 minutes à température ambiante.



4. Eliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 20 ml de NaCl 80 mM.
5. Agiter légèrement pendant 45 minutes à 37°C.
6. Centrifuger les cellules à 2200 rpm 10 minutes à température ambiante.
7. Resuspendre les cellules dans 1 ml de tampon NAP. Stocker les cellules à 4°C. Les cellules restent infectables pour 3 à 5 jours.

-Preparation de "Terrific broth cultures" :

1. Inoculer quelques ml de NZY contenant 100 µg/ml de Kanamycine avec des cellules K91Kan. Agiter 12 heures.
2. Utiliser 100 µl de cette culture pour inoculer 10 ml de milieu Terrific broth. Agiter à 37°C jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,25 à 600 nm et pour une dilution de 1/10. Diminuer l'agitation pour permettre la régénération des pili F.
3. Utiliser ces cellules endéant 1 heure.

Amplification de l'éluat :

1. A 100 µl d'éluat (garder un aliquot pour la titration), ajouter 100 µl de cellules, soit la souche K91Kan starved cells ou K91Kan terrific broth cells (ces dernières étant préférées pour l'amplification du premier éluat). Ces cellules comme leur nom l'indique portent la résistance à la Kanamycine. Agiter lentement pendant 30 minutes à 37°C pour permettre aux phages d'infecter les cellules.
2. Transférer la solution dans 20 ml de milieu NZY préchauffé contenant 0,2 µg/ml de tétracycline. Agiter vigoureusement à 37°C pendant 60 minutes.
3. Ajouter 20 mg/ml de tétracycline et agiter fortement 12 heures à 37°C.
4. Centrifuger la culture 10 minutes à 10000 rpm. Récupérer le surnageant et le recentrifuger 10 minutes à 10000 rpm. Prélever le surnageant et y ajouter 3 ml de PEG/NaCl induisant la précipitation des phages; mélanger par 100 inversions et laisser le tube au moins une heure à 4°C. Un précipité important apparaît.
5. Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm, récupérer les phages précipités au PEG. Eliminer le surnageant, recentrifuger et éliminer le surnageant. Resuspendre les phages dans 200 µl de TBS NaN<sub>3</sub> 0,02 %; centrifuger le tube 1 minute à

13000rpm pour éliminer les matières insolubles; transférer le surnageant dans un nouveau tube. Le surnageant contient l'éluat amplifié il doit avoir un titre de  $10^{12}$  TU/ml et une concentration de particules physiques de  $2 \times 10^{13}$  virions/ml.

#### 2.4.4.3 Titration des phages

Nos phages n'étant pas lytiques, la titration de ceux-ci se fait par comptage des cellules infectées et étalement sur milieu sélectif contenant de la tétracycline et de la Kanamycine. La résistance à la tétracycline est apportée par les phages tandis que celle à la Kanamycine est portée par les cellules.

Le résultat de la titration peut être exprimé grâce à deux unités distinctes : TU/ml ou Virions/ml. Le nombre de "Transducing units"/ml représentant le nombre de cellules infectées par ml de culture.

##### Solution :

TBS gélatine : 50mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl et 0,1 g de gélatine pour 100 ml de TBS

1. Avec l'échantillon prélevé au point 2.4.4.2 étape1, réaliser différentes dilutions en TBS/gélatine ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ).
2. A chaque dilution de phages (10  $\mu$ l), ajouter 10  $\mu$ l de K91Kan "Starved cells". Laisser incuber 10 minutes à température ambiante pour permettre aux phages d'infecter les cellules.
3. Ajouter 1 ml de milieu NZY contenant 0,2  $\mu$ g/ml de tétracycline. Incuber 20-40 minutes à 37°C.
4. Étaler 200  $\mu$ l de cellules infectées sur du milieu NZY solide contenant 40  $\mu$ g/ml de tétracycline et 100  $\mu$ g/ml de Kanamycine. Incuber les boîtes la nuit à 37°C.
5. Compter le nombre de colonies.

Les calculs de titration exprimés en TU/ml sont les suivants :

Avant infection :  $100 \times 5 \times$  nombre de colonies  $\times$  dilution



### **2.4.5 Biopanning contre l'Ac anti-LPS**

Pour l'Ac anti-LPS, conformément aux points 2.4.1 et 2.4.2, trois cycles de Biopanning ont été réalisés. Pour favoriser la sélection des clones de haute affinité, la concentration en Ac était décroissante dans les différents cycles. Le premier panning a été réalisé avec 10 µg d'Ac, le deuxième avec 1 µg et le troisième avec 0,01 µg.

### **2.4.6 Biopanning contre la streptavidine**

sont réalisés au lieu de trois. Les deux pannings sont réalisés en immobilisant 1 mg de streptavidine sur les boîtes de pétri. Le premier panning est réalisé en ajoutant 10 µl de phages de la banque originale; le deuxième en ajoutant l'entièreté de l'éluat amplifié après le premier panning.

## **3 Production et caractérisation des clones individuels**

### **3.1 Propagation individuelle des clones**

La titration du troisième panning permet de connaître le titre des phages élués, mais aussi la production de clones individuels pour diverses analyses, entre autre le séquençage. Pour leur utilisation, ces clones doivent être en quantité suffisante et sous une forme adéquate. Ils sont donc amplifiés et resuspendus dans du TBS.

- 1 . Inoculer 5 ml de NZY contenant 20 µg/ml de tétracycline avec une colonie (habituellement des colonies sur les plaques de titration du troisième panning). Agiter les tubes 16-24 heures à 37°C.
- 2 . Centrifuger les cellules 3 minutes à 13000 rpm et à température ambiante.
- 3 . Récupérer les surnageants et leur ajouter 210 µl de PEG/NaCl. Mélanger par 100 inversions et incuber de 4 à 12 heures à 4°C.
- 4 . Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm; éliminer le surnageant, recentrifuger et enlever le liquide résiduel.

5. Resuspendre le culot dans 400 µl de TBS.

Les phages ainsi obtenus sont assez purs pour être utilisés dans des tests de fixation de l'Ac tel que l'ELISA. Leur ADN peut être purifié et séquencé.

### **3.2 Mise au point d'un test ELISA**

Avant le séquençage, les clones individuellement propagés sont testés par ELISA. Ce test permet de confirmer la capacité des phages à fixer l'Ac étudié. La mise au point de ce test a nécessité l'essai de différents paramètres.

Les différents paramètres testés sont :

- a) Le volume de phages mis en contact avec les boîtes. Nous avons testé des volumes allant de 40 à 200 µl.
- b) Les conditions d'adsorption des phages sur les plaques; incubations à 4 °C et à 37°C, leur durée restant constantes et d'environ 12 heures.
- c) Les différentes conditions de lavage. Deux tampons de lavage ont été testés : le NaCl Tween et le TBS Tween, nous avons également comparé le lavage mécanique et manuel.
- d) Nous avons testé notre Ac anti-LPS couplé ou non à la peroxydase.
- e) Le support utilisé. Plaque ELISA à fond plat : normales (89620 de NUNC) ou maxisorp (NUNC-Immunoplate Maxisorp), ou encore à fond rond (Novolab).
- f) Un test comportant une étape de saturation (Blotto solution) après le coating des phages été réalisé.
- g) Nous avons également immobilisé l'Ac sur les plaques afin de mettre au point un ELISA de type sandwich.

L'optimisation du test a conduit à la sélection des conditions suivantes :



Solutions :

- Tampon de dilution de l'Ac : GBS 0,27 M; EDTA 50mM; Tween 20 0,1% et hydrolysate de caséine 1/25; pH 9,2.
- Tampon de révélation (OPD) : 1ml OPD (4mg/ml); 9 ml tampon citrate/phosphate pH5 et 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Tampon citrate phosphate : 0,1 M acide citrique et 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

1. Sensibilisation des plaques 96 puits à fonds plats avec 100  $\mu$ l de phages par puits (ce qui correspond à environ  $4 \times 10^{10}$  virions).
2. Incuber la nuit à 37°C.
3. Laver la plaque manuellement à 5 reprises avec du TBS Tween 0,05%.
4. Ajouter 100  $\mu$ l/puits d'Ac 4F9 couplé à la peroxydase et à une concentration de 3  $\mu$ g/ml.(Tampon de dilution de l'Ac=GBS-EDTA-Tween-Hydrolysate de caséine 1/25)
5. Incuber 1 heure à l'obscurité et à température ambiante.
6. Laver la plaque manuellement à 5 reprises avec du TBS Tween 0,05%.
7. Ajouter 100  $\mu$ l/puits d'OPD.
8. Laisser réagir 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité.
9. Fixer la réaction en ajoutant 25  $\mu$ l/puits d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.
10. Lire la plaque aux longueurs d'ondes de 490 et 630 nm.

Les clones obtenant un signal relativement important confirment leur spécificité vis à vis de l'Ac utilisé et peuvent être soumis au séquençage.

### **3.3 Séquençage des clones sélectionnés.**

Les clones sélectionnés après le dernier panning, sont isolés sur boîtes de pétri, amplifiés et resuspendus dans du TBS (point 3.1). Après avoir obtenu la confirmation de leur spécificité par un test ELISA, ils peuvent être séquencés.

#### **3.3.1 Extraction de l'ADN**

Solution :

-Phénol neutralisé : 9/10 phénol; 1/10 Tris/HCl 1 M pH 8,5

1. Prélever 400 µl de phages précipités au PEG/NaCl.(point 3.1)
2. Ajouter 400 µl de phénol neutralisé, agiter vigoureusement et centrifuger 1 minute à 13000 rpm pour séparer les deux phases. Le phénol permet de détruire l'enveloppe protéique des phages. par dénaturation des protéines. L'ADN chargé négativement va rester dans la phase aqueuse tandis que les protéines hydrophobes passent dans la phase organique.
3. Avec une pipette, enlever avec précaution la phase organique (phase inférieure).
4. Recentrifuger et prélever la phase aqueuse (supérieure).
5. Renouveler les étapes 2, 3 et 4 avec 400 µl de chloroforme. Celui-ci permet d'améliorer la séparation des protéines et de l'ADN.
6. A la phase aqueuse finale, ajouter 40 µl de NaOAc 1M et 1 ml d'éthanol. Laisser précipiter l'ADN au moins 1 heure sur glace.
7. Centrifuger 30 minutes à 13000 rpm; éliminer le surnageant; laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70%; enlever de nouveau le surnageant et sécher l'ADN.
8. Resuspendre le culot dans 10 µl d'H<sub>2</sub>O stérile. L'ADN extrait de la sorte peut être stocké à -20°C.



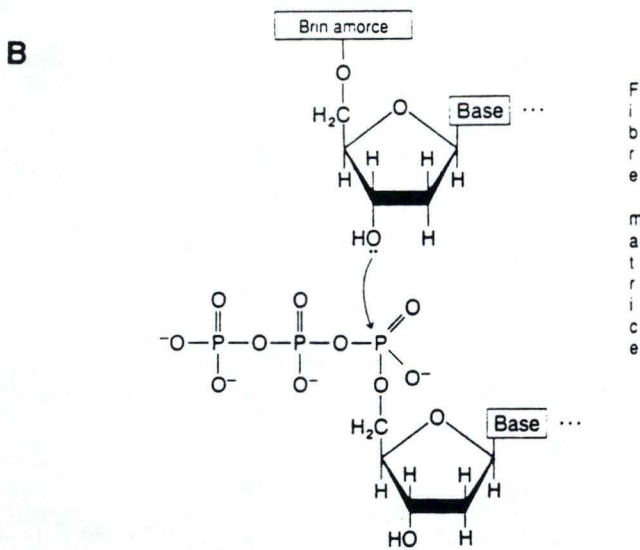
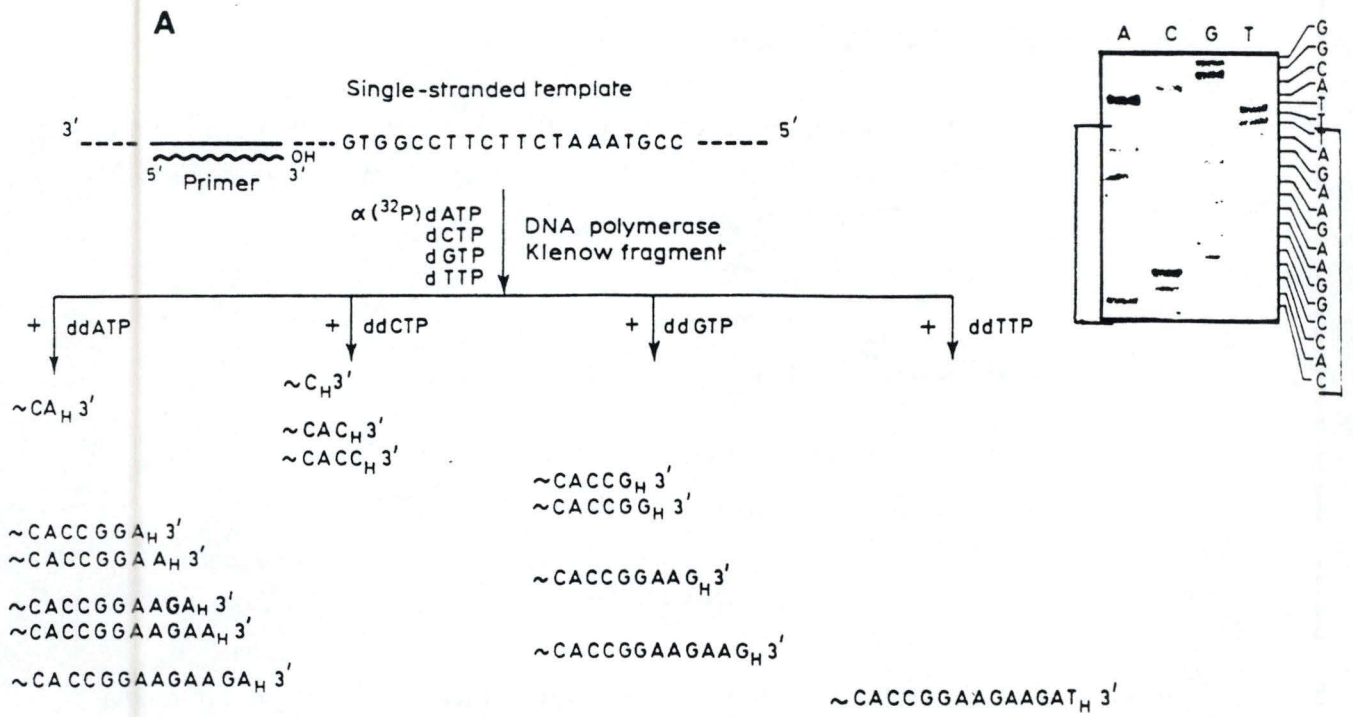


Figure 18

A. Principe du séquençage selon la méthode au didéoxynucléotide de sanger  
 B. Réaction d'élongation de la chaîne d'ADN catalysée par les ADN polyméras

### **3.3.2 Réaction de séquençage**

La méthode de séquençage que nous avons utilisée lors de ce travail a été mise au point par Sanger (1971) (figure 18). Le brin (+) de nos phages (le brin "template" ou matrice) est hybridé à un oligonucléotide de synthèse (le "primer" ou amorce). Celui-ci est en fait complémentaire d'une courte portion du brin à séquencer (10 à 50 bp) et est utilisé comme amorce pour l'ADN polymérase (Figure 18). L'ADN polymérase commence la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire au "template" à partir du "primer" et ce dans un mélange comprenant les quatre désoxynucléotides (A,C,G,T) dont un est radioactif (désoxyadénosine 5'- $\alpha$ -<sup>35</sup>S-triphosphates; Amersham) et un des quatre didésoxynucléotides. Lorsque l'ADN polymérase incorpore un didésoxynucléotide, elle s'arrête et bloque ainsi la synthèse; en effet, le didésoxyribonucléotide ne possédant pas d'hydroxyle en 3', ne peut former une liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant.



Quatre mélanges de polymérisation sont donc utilisés:

Mélange réactionnel	A	C	G	T
désoxyribonucléotides présents	dATP*	dATP*	dATP*	dATP*
	dCTP	dCTP	dCTP	dCTP
	dGTP	dGTP	dGTP	dGTP
	dTTP	dTTP	dTTP	dTTP
didésoxy. présents	ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP

\*marqué au  $^{35}\text{S}$

Dans chaque mélange, les proportions des constituants sont telles que statistiquement, on obtiendra l'arrêt prématuré de la synthèse d'au moins une molécule d'ADN (marquée radioactivement) pour chaque position dans la séquence "template" comportant un nucléotide complémentaire au didésoxyribonucléotide présent.

Pour chaque mélange, on dépose sur un gel de polyacrylamide les brins radioactifs synthétisés. Ils sont ensuite séparés suivant leur taille par électrophorèse.

L'analyse de l'autoradiographie du gel séché permet de déduire la séquence d'environ 250 nucléotides en aval de la portion complémentaire de l'amorce.

#### Solutions :

Toutes les solutions reprises ci-dessous sont comprises dans le kit de séquençage commercialisé par Pharmacia.

#### **3.3.3.1 "Annealing"**

Cette étape permet l'hybridation du "primer" sur le brin "template".

1. Au 10  $\mu\text{l}$  l'ADN purifié (point 3.3.1) ajouter 2  $\mu\text{l}$  de primer et 2  $\mu\text{l}$  d'annealing buffer.
2. Incuber 10 minutes à 60°C.
3. Laisser refroidir le tube à température ambiante au minimum 10 minutes.

4. Pendant cette incubation, dispenser 2,5 µl des quatre mélanges de séquençage (A, T, C, G) dans 4 tubes séparés.

### 3.3.3.2 "Labelling réaction"

C'est l'étape de marquage du brin néoformé. La T7 DNA polymérase commence la synthèse en présence des quatre désoxyribonucléotides, dont le dATP marqué, permettant la formation d'un court brin marqué (le primer et quelques dizaines de nucléotides).

1. Au tube contenant l'ADN et le primer, ajouter 3 µl de Labelling mix-dATP, 1 µl d'( $\alpha$ -35S) dATP $\alpha$ S et 2 µl d'ADN polymérase T7 diluée.
2. Incuber 5 minutes à température ambiante.
3. Pendant ce temps, placer les quatre mélanges de séquençage à 37°C durant au minimum 1 minute.

### 3.3.3.3 Réaction de terminaison

Lors de cette étape, l'ensemble T7 DNA polymérase et brin template avec le primer allongé sont mis en présence de dNTP et de ddNTP.

Dans quatre eppendorfs, on a 2,5 µl de:

"Short A" pour l'Eppendorf A (dNTP + ddATP)

"Short C" pour l'Eppendorf C (dNTP + ddCTP)

"Short G" pour l'Eppendorf G (dNTP + ddGTP)

"Short T" pour l'Eppendorf T (dNTP + ddTTP)

1. Après l'incubation de la réaction de marquage, transférer 4,5 µl de celle-ci dans chacun des tubes préchauffés (A, T, C, G). Mélanger doucement et laisser incuber 5 minutes à 37°C.
2. Ajouter 5 µl de solution stop dans chaque tube et agiter doucement.
3. Ces réactions de séquençage peuvent être stockées à -20°C.



### **3.3.4 Préparation et utilisation du gel d'électrophorèse.**

L'appareil utilisé lors de nos séquençages est de marque LKB. Deux types de plaques sont utilisées, une plaque thermostatique et une plaque en verre.

#### Solutions :

-TBE (10x) : 0,89 M Tris; 0,89 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 50 mM Na<sub>2</sub>.EDTA<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

-30% Acrylamide/Bisacrylamide (29/1) : 29 g acrylamide; 1 g  
Bisacrylamide porter à  
100ml avec H<sub>2</sub>O.

-6% Acrylamide/Bisacrylamide : 10,8 ml solution 30% acrylamide;  
6 ml TBE 10X; 21 g Urée; porter à  
50 ml avec H<sub>2</sub>O.

1. Laver les deux plaques avec du savon puis avec de l'eau distillée et enfin avec de l'éthanol, laisser sécher. Effectuer un dernier lavage avec de l'acétone, laisser sécher.
2. Traiter la plaque thermostatique avec du "Repel silane" pour éviter la fixation du gel sur celle-ci. Traiter la plaque de verre avec du "Bind silane" pour que le gel s'y fixe.
3. Appliquer de l'éthanol, laisser sécher et polir.
4. Placer les "spacers" afin d'obtenir un gradient d'épaisseur vers le bas du gel. Fixer les "spacers" à l'aide de clips. Placer également le peigne permettant l'obtention de puits.
5. Préparer 100 ml de solution 6% d'acrylamide Bis acrylamide, dégazer 5 minutes et ajouter 90 µl de TEMED et 300 µl d'APS 10% (persulfate d'ammonium). Couler le gel entre les deux plaques et laisser polymériser au minimum 2 heures.
6. Placer les plaques sur leur support, la plaque thermostatique vers l'extérieur.
7. Brancher la circulation d'eau à 55°C et remplir les cuves de l'appareil avec du TBE 1,2X.

8. Rincer les puits avec une seringue pour éliminer l'urée.
9. Préchauffer le gel 30 minutes à 1600 V.
10. Rincer à nouveau les puits et charger les échantillons (2,5-4,5  $\mu$ l) préalablement dénaturés par chauffage à 80°C.
11. Laisser migrer les échantillons (dans notre cas 2h15) à 2000V.
12. Arrêter la migration, vider les réservoirs et placer le gel 2 fois 15 minutes dans une solution d'acide acétique 10% pour fixer le gel.
13. Sécher le gel 2 heures au four à 60°C ou la nuit à 37°C.
14. Placer le gel sous film autoradiographique pour 24 heures ou plus.
15. Placer le film 5 minutes dans un bain révélateur (Kodak). Rincer à l'eau distillée.  
Passer le film révélé dans un bain de fixateur durant 10 à 15 minutes.  
Rincer abondamment le film avec de l'eau et sécher.

#### **4. Production d'un anticorps polyclonal anti fUSE 5**

L'utilité de la production de cet Ac se révèle double. Il a été produit pour faciliter la titration des phages et permettre une amélioration des tests ELISA. Fixer ces Ac sur un support, pourrait permettre l'obtention d'une orientation optimale des phages et une accessibilité accrue des peptides exprimés par ceux-ci.

##### **4.1 Production d'un phage fUSE 5 en grande quantité.**

1. Inoculer 100 ml de milieu Terrific broth avec 1 ml d'une culture de cellules de la souche K91Kan d'*E. coli*. Agiter fortement à 37°C jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0,2 pour une dilution 1/10.
2. Agiter lentement 5 minutes supplémentaires pour permettre la régénération des pilis



sexuels.

3. Ajouter 10  $\mu$ l du phage sélectionné au hasard pour l'amplification et agiter 5 minutes.
4. Inoculer avec cette culture deux Erlenmeyers contenant 500 ml de milieu NZY contenant 0,22  $\mu$ g/ml de tétracycline. Agiter 35 minutes à 37°C.
5. Ajouter 0,5 ml de tétracycline dans chaque cultures de 500 ml.
6. Agiter vigoureusement durant 12 à 24 heures à 37°C.
7. Centrifuger le milieu de culture à 5000 rpm, 10 minutes à 4°C.
8. Centrifuger le surnageant à 8000 rpm, 10 minutes à 4°C. Renouveler l'opération une seconde fois.
9. Ajouter 0,15 volume de PEG/NaCl. Agiter et laisser précipiter 12 heures à 4°C.
10. Centrifuger à 8000 rpm, 50 minutes à 4°C.
11. Eliminer le surnageant, recentrifuger à 8000 rpm, 10 minutes à 4°C puis éliminer le surnageant résiduel.
12. Resuspendre le culot dans 10 ml de TBS pour environ 500 ml de culture.
13. Centrifuger à 15000 rpm, 15 minutes à 4°C et récupérer le surnageant.
14. Ajouter 0,15 volume de PEG/NaCl, agiter et laisser précipiter 3 à 4 heures à 4°C.
15. Centrifuger à 15000 rpm, 15 minutes à 4°C.
16. Resuspendre le culot dans 10 ml de TBS.
17. Centrifuger à 15000 rpm 15 minutes à 4°C.
18. Récupérer le surnageant et y ajouter 0,15 volume de PEG/NaCl. Agiter et laisser

précipiter 3 heures à 4°C.

19. Centrifuger à 10-15000 rpm, 15 minutes à 4°C.

20. Resuspendre le culot dans 1,5 ml de TBS

21. Centrifuger à 10-15000 rpm, 15 minutes à 4°C pour éliminer toutes les matières insolubles pouvant rester dans la suspension de phages.

Le phage amplifié de la sorte est en suffisamment grande quantité que pour induire une réponse immunitaire et va être injecté à un lapin. Nous avons réalisé trois précipitations au PEG/NaCl afin d'assurer une purification optimale de notre phage. La vérification de la pureté de notre suspension de phage est assurée par une électrophorèse d'ADN en gel d'agarose.

#### **4.2 Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose**

Cette méthode de séparation des fragments d'ADN permet l'évaluation de la taille et de la quantité des fragments. Les groupements phosphates confèrent à l'ADN une charge globale négative. L'ADN migre donc vers l'électrode positive dans un champ électrique. Le rapport entre la charge et la masse des molécules d'ADN étant constant, il est nécessaire de réaliser cette électrophorèse dans un gel d'agarose pour séparer les molécules suivant leur taille, les pores du gel limitant la migration. Dès lors, la vitesse de migration des acides nucléiques dans le gel dépend des quatre facteurs suivants:

- Le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. En cas de voltage trop important, la résolution diminue.
- La concentration en agarose. Les gels à forte concentration (1,5-2%) permettent de séparer des molécules d'ADN de petite taille (100 à 1500 pb). Les gels à faible concentration (0,8-1%) permettent de séparer des molécules de taille supérieure (500 pb à plus de 10 kb).
- Le poids moléculaire des fragments d'ADN. Les molécules d'ADN double brin linéaires migrent à une vitesse inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.
- La conformation de l'ADN



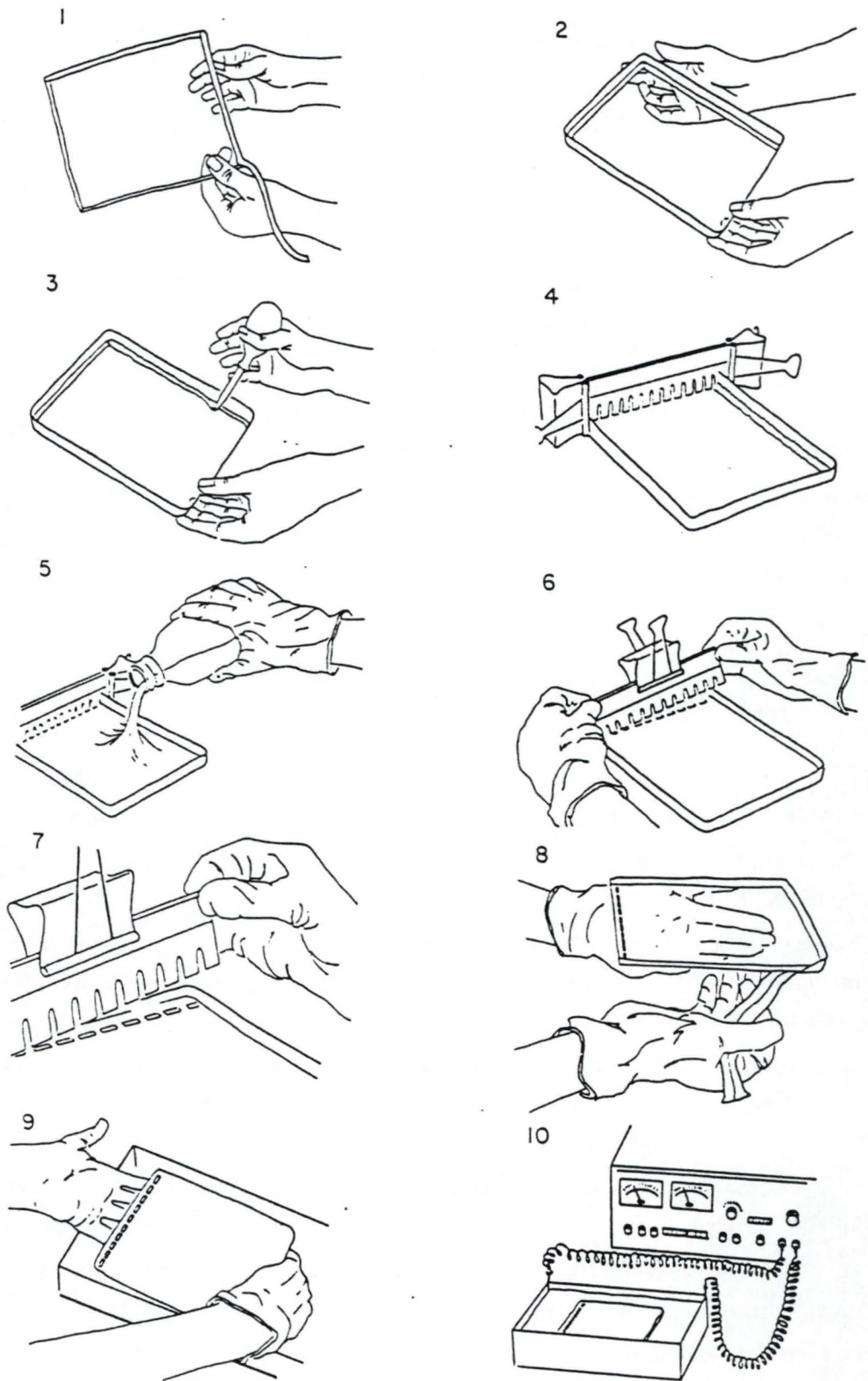


Figure 19  
Montage du gel pour électrophorèse en gel d'agarose

Le repérage des bandes se fera sous UV. Le bromure d'éthidium a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN (Il est par la même hautement mutagène et donc dangereux) et permet de repérer les bandes d'ADN car il fluoresce en rose-orange sous UV.

Solutions :

- Tampon de lyse :

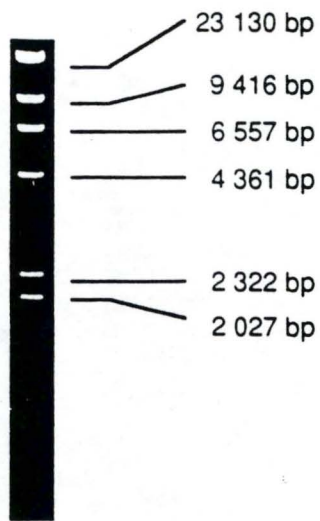
Bleu de bromophénol	40 mg
Glycérol	20 ml
GBB 40 X	2 ml
H <sub>2</sub> O	18 ml
SDS	2 g

-GBB 40 x :

Tris	142,4 g
NaOAc	45,94 g
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	18,83 g

- 1 . Ajouter l'agarose à du TBE et porter le tout à ébullition puis laisser refroidir à 50°C. Ajouter du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 mg/ml (solution stock à 10 mg/ml conservée à l'abri de la lumière).
- 2 . Couler le gel (encore liquide à cette température) dans un moule en plexiglas sur lequel on a placé un peigne permettant de former des puits dans le gel refroidi et solidifié (Figure 19). La taille des dents du peigne est choisie selon le volume des échantillons à déposer sur gel, le plus souvent 15 à 20 µl. Après solidification, retirer le peigne et placer le gel dans une cuve à électrophorèse remplie de TBE.
- 3 . Introduire l'échantillon d'ADN (mélanger 10 µl de tampon de lyse; 38 µl d'H<sub>2</sub>O et 2 µl de phages. Chauffer 10 minutes à 70°C). Le bleu de bromophénol contenu dans le tampon de lyse migre à la même vitesse que les plus petits fragments visibles sur le gel et permet ainsi de contrôler la migration.
- 4 . Appliquer une différence de potentiel de 40 à 100 volts aux extrémités de la cuve pendant 2 à 4 heures.
- 5 . Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur UV ( $\lambda=302$  nm) pour visualiser les





**Figure II.8:** Taille des fragments du marqueur  $\lambda$  restreint par *Hin* d III (les fragments de 564 bp et de 125 bp n'apparaissent pas sur la photo). Gel d'agarose 1%.

Figure 20

Taille des fragments du marqueur  $\lambda$  restreint par *Hin* d III (les fragments de 564 bp et 125 bp n'apparaissent pas sur la photo) gel d'agarose 1 %

bandes d'ADN et photographier.

Deux évaluations peuvent être réalisées:

- La taille des fragments. Dans un des puits du gel, on place un marqueur de taille qui est une molécule d'ADN coupée par un enzyme de restriction générant des fragments de taille connue. Nous avons utilisé l'ADN du phage  $\lambda$  restreint par *Hin* d III (gels agarose 1%) (Figure 20)

- La quantité d'ADN dans une bande. La fluorescence étant proportionnelle à la quantité de bromure d'éthidium intercalée dans l'ADN, elle sera d'autant plus intense que les fragments d'ADN d'une bande sont grands et nombreux. La quantité d'ADN du marqueur étant connue, il sera facile d'estimer par comparaison, la quantité d'ADN de l'échantillon étudié.

Une bande correspondant à 10 ng d'ADN peut être vue sur un gel d'agarose mais la faible luminosité de la bande dans ce cas ne permet pas à celle-ci de se marquer sur photo.

### **4.3 Inoculation au lapin**

La concentration protéique de la solution de phages obtenue au point 4.1 a été déterminée grâce à un test micro-BCA. Les phages adjuvantés en Quil A, ont ensuite été inoculés au lapin par des injections intramusculaires (500  $\mu$ g Quil A et 200  $\mu$ g de phage). Trois rappels distants de 15 jours ont été réalisés, chacun d'eux étant accompagnés d'une prise de sang. Les sérums ont été collectés par centrifugation du sang après coagulation de celui-ci. Une dernière prise de sang a été réalisée 15 jours après le dernier rappel.

### **4.4 ELISA de contrôle**

Deux tests ELISA sont effectués. L'un vise à contrôler l'absence d'Ac anti-*coli* qui pourraient contaminer notre sérum obtenu après immunisation du lapin. L'autre sert à démontrer la production d'Ac dirigés contre les phages.

#### **4.4.1 ELISA anti-*coli***

Solution :

-NaCl Tween : 0,15 M NaCl et 0,01% Tween 20



-Tampon de dilution de l'Ac : GBS 0,27 M; EDTA 50mM; Tween 20  
0,1% et hydrolysat de caséine 1/25;  
pH9,2

1. Sensibiliser les plaques ELISA avec un lysat de cellules d'*E.coli* resuspendues dans du PBS NaN<sub>3</sub> 0,02% (environs 10<sup>10</sup> cellules/ml), 1 nuit à 4°C.
2. Laver 6 fois avec du NaCl-Tween 0,01%.
3. Laver 6 fois avec du NaCl-Tween 0,01%.
4. Saturer avec de l'hydrolysat de caséine 1/10, 1 heure à 37°C.
5. Laver 6 fois avec du NaCl-Tween 0,01%.
6. Ajouter le sérum (50 µl/puits) et laisser incuber 1 heure à 37°C. Le sérum est dilué dans du GBS-EDTA-Tween 20.
7. Laver 6 fois avec du NaCl-Tween 0,01%.
8. Ajouter l'Ac anti Ig de lapin couplé à la peroxydase (Donkey anti-rabbit).
9. Laver 6 fois avec du NaCl-Tween 0,01%.
10. Ajouter 100 µl par puits de solution de révélation (OPD).
11. Fixer la réaction avec 25 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
12. Lire les absorbances à 490 et 630 nm.

#### 4.4.2 ELISA anti-phages

Ce test est réalisé de manière identique au test précédent. Si ce n'est que l'étape de sensibilisation s'effectue avec les phages. Les tests sont réalisés avec notre polysérum épuisé ou non en Ac anti-*coli*. Cet épuisement est réalisé par incubation des dilutions de notre polysérum avec une solution de lysat de *E.coli* 0,5 mg/ml.



# Résultats et Analyses

## D Résultats et analyses

Nous avons reçu une banque d'hexapeptides aléatoires sur phage (Smith, 1985). Le système utilisé est de type 3 et les peptides sont exprimés en fusion aux protéines PIII des phages. Les préliminaires à nos expériences ont été de vérifier le caractère aléatoire de la banque ainsi que de la tester. Le premier objectif a été réalisé en séquençant les inserts oligonucléotidiques d'une vingtaine de phages. Connaissant ces séquences nucléotidiques, il est possible de déterminer les séquences en aa des peptides exprimés par les phages et donc de comparer l'occurrence des aa par rapport à une répartition aléatoire. Pour tester la banque nous avons sélectionné des phages grâce à la streptavidine dont le site de fixation a été étudié à de nombreuses reprises et dont la séquence peptidique mimant le ligand (mimotope) est connue. Par la suite nous avons criblé la banque avec un Ac monoclonal dirigé contre le LPS de *Brucella* (4F9). Nous avons également produit un Ac polyclonal dirigé contre nos phages dans le but d'améliorer les tests ELISA et d'élaborer une méthode de titration aisée.

### 1. Mise en évidence du caractère aléatoire de la banque

L'étude du caractère aléatoire de notre banque nécessite la comparaison de la répartition des aa dans les inserts dégénérés contenu dans nos phages avec une répartition aléatoire. L'étude de la fréquence des codons peut également concourir à démontrer la bonne composition de notre banque. Ces deux analyses demandent la connaissance des séquences oligonucléotidiques des inserts étrangers, celles-ci étant déterminées par séquençage du génome des phages. Cette technique à nécessité une mise au point pour pouvoir être utilisée en routine.



### **1.1 Mise au point du séquençage**

La confirmation du caractère aléatoire de la banque ainsi que toutes les analyses des clones sélectionnés passent inévitablement par le séquençage. Il est donc primordial que cette technique soit parfaitement au point. Nos réactions de séquençage ont été réalisées grâce au kit de séquençage T7 mis au point et commercialisé par Pharmacia P-L Biochemicals. La technique utilisée est la méthode enzymatique de Sanger et al. (1977) et l'enzyme est l'ADN polymérase T7. Le  $^{35}\text{S}$  a été choisi comme isotope radioactif car son temps de demi vie est plus long que celui du  $^{32}\text{P}$  et qu'il permet une meilleure résolution. Trois oligos différents ont été testés: deux amorces de séquençage délivrés par Smith avec la banque de peptides et un oligo déterminé par nos soins grâce à la séquence oligonucléotidique de la protéine pIII des phages de type fd (respectivement amorce 1, 2 et 3). Notre choix s'est porté sur l'amorce de séquençage 3, seul de ces trois oligos donnant de très bons résultats. La figure 21 rend compte de la séquence et de la position des différentes amorces par rapport au site de clonage. La figure 22 montre la disposition de notre amorce vis à vis du site de clonage dans la séquence du gène de la protéine PIII.

Les phages destinés au séquençage sont préliminairement individualisés, amplifiés et purifiés (Mat. et Méth. point 3.1). Nos phages ont un ADN monocaténaire contenu dans une enveloppe protéique sous la forme du brin (+). Ces derniers sont extraits au phénol et au chloroforme (Mat et Méth point 3.3.1). Les brins (+) servent de matrice à la polymérase qui produit par complémentarité des fragments de brins (-). Ceux-ci sont séparés lors de l'électrophorèse et la séquence lue sur le gel est celle du brin (-) (Figure 23). Le brin (+) peut être réobtenu par complémentarité et nous permet de connaître la séquence en aa correspondante.

### **1.2 Analyse de la séquence des clones non sélectionnés**

Nous avons séquencé 22 clones pris au hasard dans notre banque, les résultats obtenus sont les suivants :

Primer 1 :

-30 5' TGAATTTTCTGTATGAGG 3'

Primer 2 :

-86 5' CCCTCATAGTTAGCGTAACG 3'

Primer 3 :

-170 5' CTCATTTTCAGGGAT 3'

Figure 21  
Localisation par rapport au site de clonage et séquences des primers 1, 2 et 3



Gene III

...GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTT GTT CCT

N terminus of mature pIII signal  
peptidase cleavage site

↓  
TTC TAT TCT CAC TCC GCT GAA ACT GTT GAA AGT TGT TTA GCA  
↑  
Engineered fUSE5  
cloning site

AAA CCT CAT ACA GAA AAT TCA TTT ACT AAC GTC TGG AAA  
GAC GAC AAA ACT TTA GAT CGT TAC GCT AAC TAT GAG GGC  
TGT CTG TGG AAT GCT ACA GGC GGT GTG GTT TGG ACT GGT  
GAC GAA ACT CAG TGT TAC GGT ACA TGG GTT CCT ATT GGG  
CTT GCT ATC CCT GAA AAT GAG GGT GGT GGC TCT...

TTC TAT TCT CAC TCC

Signal peptide

5'-CTC ATT TTC AGG GAT-3'

Primer

Figure 22  
Position de notre primer par rapport au site de clonage dans la séquence du gène de la protéine PIII

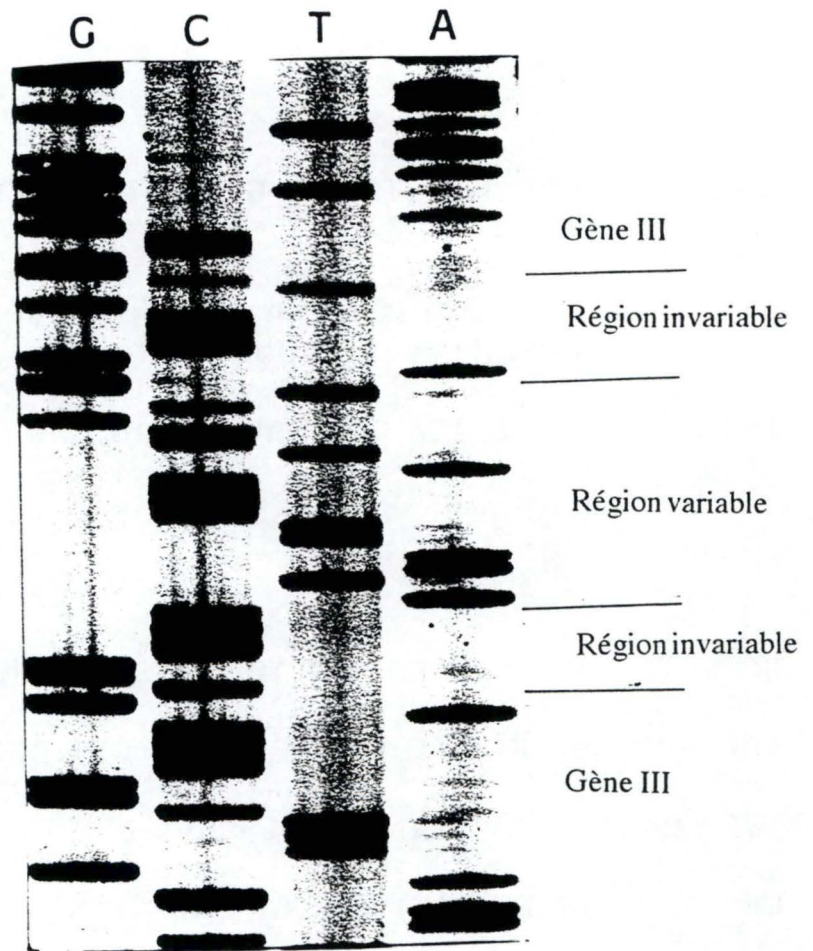


Figure 23  
Résultat d'une réaction de séquençage



**1.21 Séquence nucléotidique des clones non sélectionnés**

Les séquences présentées ici correspondent aux 18 bases de la région variable des inserts introduit dans le génome des phages. Ceci représente la séquence du brin (+).

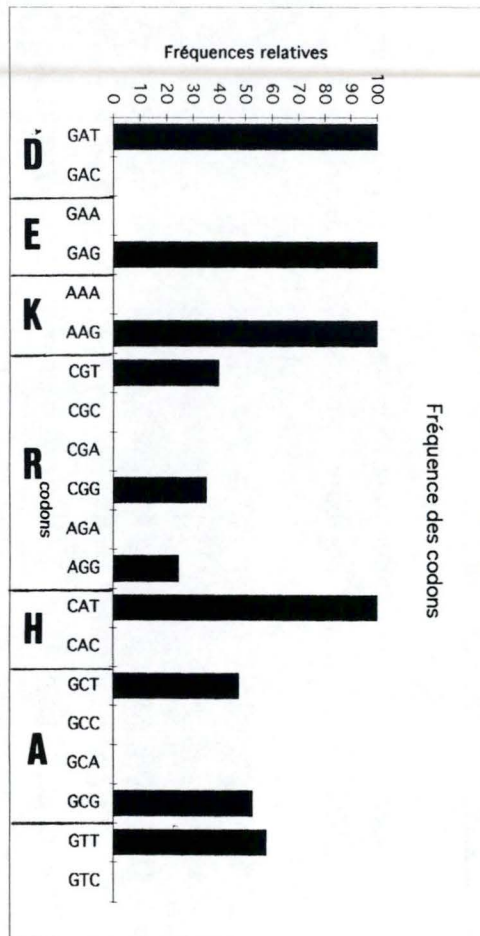
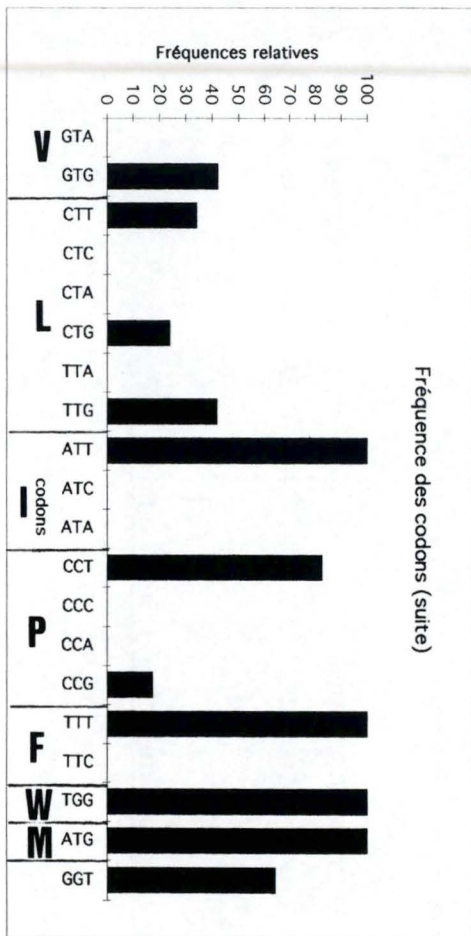
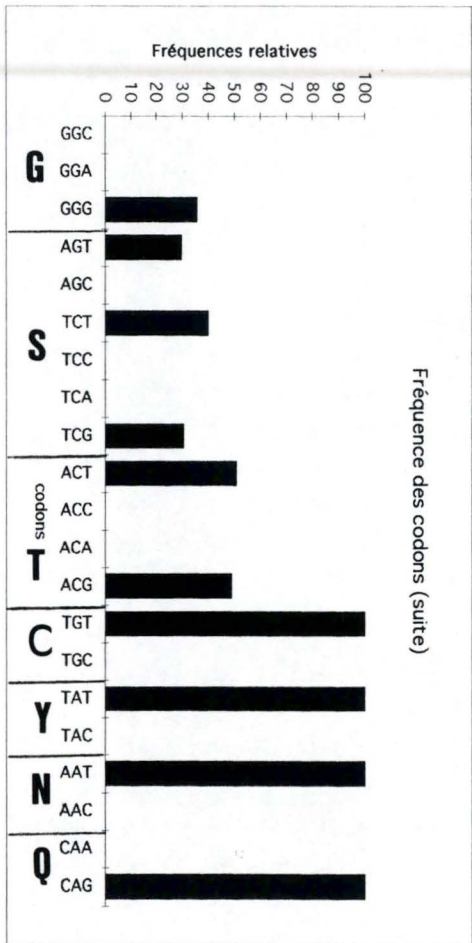
1	GGT CCT ACT ACG GGT CAT	12	GCT AGG GCT CCG GAG TCT
2	CCT GCG TCT AAT CTT GTT	13	GTT GAT ACG GGT ATG ACG
3	AAG GTG CTG TCT ACG AGT	14	TGG TTT GCT CTG GCT CCT
4	CCT TCG TTT CAG CGG TAT	15	AGT GTT TGT GCG CTT TGT
5	TGG GTG ATT TGG GAT TAT	16	TCG GTT AGT GAG GTG GTG
6	CCT CTG CCT AGG GCG ATT	17	CTG GCT GAT GCT GGG ATT
7	GTG TCT AAT TCG GTG CTT	18	ACG TTT CCT CCT GAG TAT
8	AAG GGT CAG TTT CTT TTG	19	GGG GTT TTG TAT GCG TTT
9	AGG ACG GGG AAT GGT ACG	20	GTT TCG TTT CTT GAG CGT
10	TTG ATT TTT CCG GAG ATT	21	AGT ATT GCG ATT CTT TAT
11	CGT AGT TTG CGT ACG GCT	22	GCT GCT TCG TTG ACG AGT

**1.2.2 Séquence en aa des clones non sélectionnés**

La séquence en aa est déduite de la séquence nucléotidique du brin (+) des inserts étrangers.

1	Gly Pro Thr Thr Val His	G P T T V H
2	Pro Ala Ser Asn Leu Val	P A S N L V
3	Lys Val Leu Ser Thr Ser	K V L S T S
4	Pro Ser Phe Gln Arg Tyr	P S F Q R Y
5	Trp Val Ile Trp Asp Tyr	W V I W D Y
6	Pro Leu Pro Arg Ala Ile	P L P R A I
7	Val Ser Asn Ser Val Leu	V S N S V L
8	Lys Gly Gln Phe Leu Leu	K G Q F L L
9	Arg Thr Gly Asn Gly Thr	R T G N G T
10	Leu Ile Phe Pro Glu Ile	L I F P E I
11	Arg Ser Leu Arg Thr Ala	R S L R T A
12	Ala Arg Ala Pro Glu Ser	A R A P E S
13	Val Asp Thr Gly Met Thr	V D T G M T
14	Trp Phe Ala Leu Ala Pro	W F A L A P

Tableau 4  
Fréquence des codons





15	Ser Val Cys Ala Leu Cys	S V C A L C
16	Ser Val Ser Glu Val Val	S V S E V V
17	Leu Ala Asp Ala Gly Ile	L A D A G I
18	Thr Phe Pro Pro Glu Tyr	T F P P E T
19	Gly Val Leu Tyr Ala Phe	G V L Y A F
20	Val Ser Phe Leu Glu Arg	V S F L E R
21	Ser Ile Ala Ile Leu Tyr	S I A I L Y
22	Ala Ala Ser Leu Ser Ser	A A S L S S

Ces différentes séquences nous permettent d'analyser la répartition des codons et des aa.

### 1.2.3 Analyse de la fréquence des codons

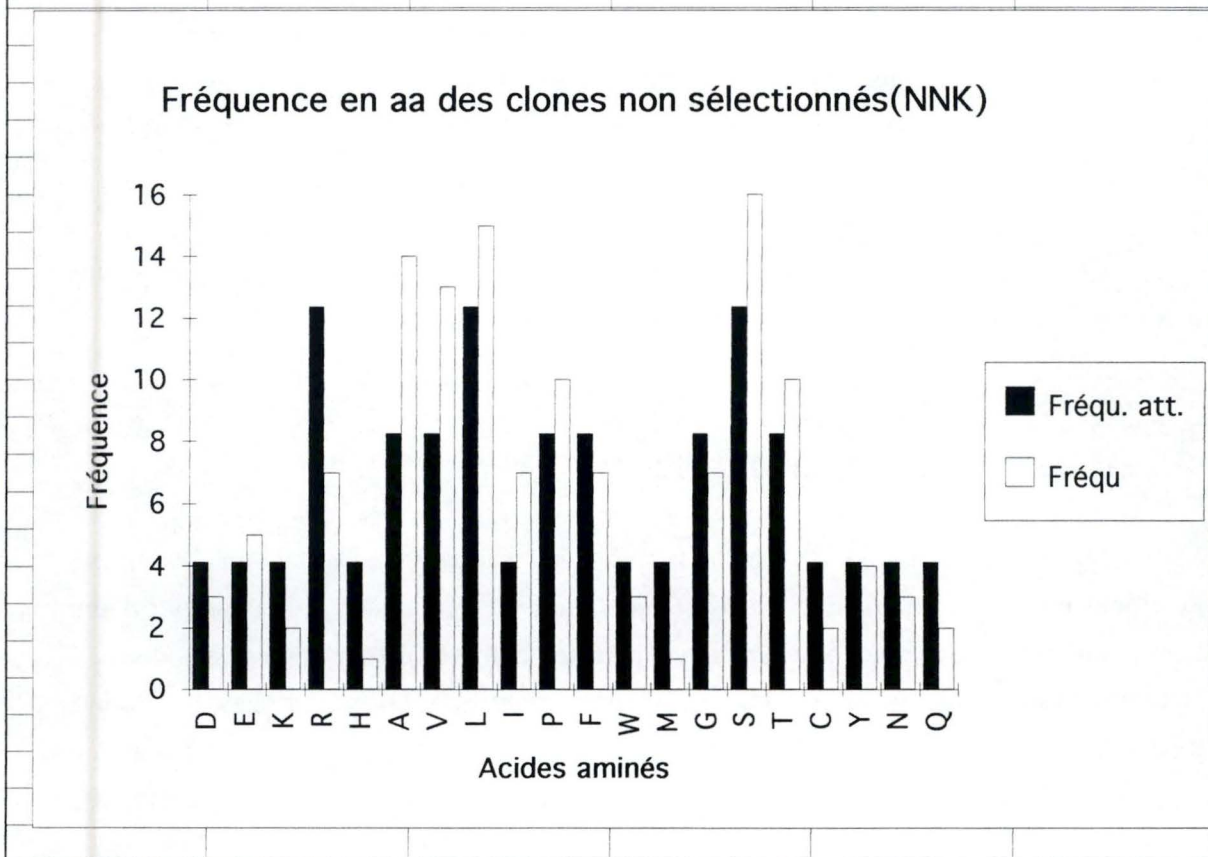
Pour obtenir un échantillon plus représentatif de la banque, la fréquence des codons n'étant pas influencée par la sélection des clones, nous avons utilisé la séquence nucléotidique des clones non sélectionnés mais aussi celles des clones streptavidine et 4F9. Le nombre de séquences se porte donc à 61. Le tableau 4 rend compte de la répartition des différents codons. La fréquence des codons a été répertoriée pour tous les aa séparément et a été exprimée en %. La fréquence des codons se terminant par C ou A est nulle, ceci nous confirmant le fait que notre banque est constituée d'hexapeptides dont les codons sont représentés par NNK ou K ne peut être que T ou G. Lorsque plusieurs codons correspondent au même aa, comme par exemple pour l'arginine, il n'y a pas large prédominance de l'un de ceux-ci, la répartition est homogène et semble donc correcte.

Ces résultats confirment nos attentes et montrent que notre banque n'est pas biaisée au niveau de la répartition des codons.

### 1.2.4 Analyse de la fréquence des aa

Dans ce test nous avons comparé la fréquence d'apparition des aa dans les inserts de clones non sélectionnés avec la fréquence attendue de ceux-ci si il s'agissait d'une banque aléatoire. La fréquence attendue est calculée comme suit : (nombre de codons de l'aa / nombre total de codon) x nombre d'aa de l'échantillon. Dans notre cas, le nombre total de codons n'est que de 32 puisque les bases A et C sont exclues de la troisième position des codons. La fréquence relative est calculée comme suit : (fréquence observée /

Fréquence en a.a dans les clones non sélectionnés			
Fréquence attendue pour une librairie (NNK) où N=G A T ou C et K=Gou T			
Nb de codons	a.a	Fréqu. att.	Fréqu
1	D	4,125	3
1	E	4,125	5
1	K	4,125	2
3	R	12,375	7
1	H	4,125	1
2	A	8,25	14
2	V	8,25	13
3	L	12,375	15
1	I	4,125	7
2	P	8,25	10
2	F	8,25	7
1	W	4,125	3
1	M	4,125	1
2	G	8,25	7
3	S	12,375	16
2	T	8,25	10
1	C	4,125	2
1	Y	4,125	4
1	N	4,125	3
1	Q	4,125	2
32	TOTAL		132



**Tableau 5**  
 Comparaison de la fréquence des acides aminés dans les clones non sélectionnés et dans une banque aléatoire



nombre d'aa de l'échantillon) x 100. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 5. Celui-ci comporte un graphique représentant les fréquences attendues et observées. L'histogramme nous montre que la distribution des aa dans les clones non sélectionnés est sensiblement différente de celle qui est attendue. Dix aa ont une fréquence observée proche de la fréquence attendue (D, E, P, F, W, G, T, Y, N et Q). Les aa restants présentent une augmentation de fréquence (A, V, L, I et S) ou une diminution de celle-ci (K, C et surtout R, H et M). Ceci correspond à une diminution de fréquence des aa Acide (R, K, H) et à une augmentation surtout des aa polaire (A, V, L, I).

La répartition des aa devrait être plus proche de la répartition aléatoire, mais cela ne veut pas dire que notre banque ne soit pas réellement aléatoire. En effet l'échantillon de clones par sa taille réduite n'offre sans doute pas une image tout à fait correcte de la banque. Ce test a également été réalisé par Degraaf et son équipe. Ceux-ci ont pu démontrer le caractère aléatoire de leur banque de décapeptides. Mais ils ont dû analyser 52 peptides ce qui représente 520 aa soit environ 5 fois ce que nous avons testé (Degraaf et al., 1993).

## **2. Sélection par affinité de phages contre la streptavidine**

Cette sélection contre la streptavidine s'avère être un test nous permettant d'évaluer et de nous familiariser avec le nouvel outil qu'est la banque de peptide. Deux cycles de biopanning ont été réalisés (Mat et Meth 2.2 et 2.4.6). Le premier biopanning étant suivi d'une amplification de l'éluat (Mat. et Meth. 2.4.4). Des titrations nous permettent de contrôler le bon déroulement des étapes de sélection et d'amplification (Mat. et Meth. 2.4.4.3).

## **2.1. Titration des biopannings contre la streptavidine**

Les différentes titrations permettent de vérifier si la sélection a bien eu lieu lors des pannings. Lorsqu'il s'agit du dernier panning, la titration sert également à individualiser les clones sélectionnés en vue des analyses subséquentes. Nos phages n'étant pas lytiques, les résultats de la titration ne sont pas des plages de lyse mais bien des colonies. Les cellules infectées sont étalées et misent en évidence sur milieu sélectif. Les résultats sont exprimés en TU/ml ou transducing units /ml. Sont titrés ici : les suspensions de départ des différents pannings, les suspensions de phages non retenus éliminés par lavage et la suspension des phages sélectionnés élués à PH acide. Les phages sélectionnés sont titrés et amplifiés pour les cycles de biopanning suivants. La suspension de départ du deuxième panning provient donc de l'amplification des clones sélectionnés lors du premier panning.

### **Panning 1 :**

Suspension de départ :	$10^{12}$ TU/ml
clones non retenus :	$2,27 \times 10^{11}$ TU/ml
Clones sélectionnés :	$5,39 \times 10^9$ TU/ml

### **Panning 2 :**

Suspension de départ :	$2,5 \times 10^{10}$ TU/ml
clones non retenus :	$1,73 \times 10^{10}$ TU/ml
clones sélectionnés :	$1,6 \times 10^7$ TU/ml

Dans le cadre de ce contrôle streptavidine, les résultats nous montrent une diminution de titre à chaque étape de sélection nous indiquant que celle-ci a bien eu lieu. Ceci nous permet de penser que les clones phagiens isolés lors du second panning se sont fixés de manière spécifique à la streptavidine et portent donc des peptides mimant la biotine. Quelques clones prélevés au hasard parmi les clones sélectionnés ont donc été séquencés.



## 2.2 Séquençage des clones sélectionnés contre la streptavidine

Le séquençage de ces clones a été réalisé de manière identique à celui des clones non sélectionnés. Vingt clones ont été séquencés, les résultats sont les suivants :

### 2.2.1. Séquence nucléotidique des clones streptavidine

De nouveau ces 18 bases correspondent aux inserts oligonucléotidiques dégénérés des phages séquencés.

1	TTG GTT CCT GCT TTT CGG	11	ACT CTT CCT CGG CCT GTT
2	TTG GTT CCT GCT TTT CGG	12	ACG CAT TCG GGT TAT TGG
3	GAG TTG TTT GCT CGT GTT	13	TTG GAG CGG GCG ATT TCT
4	TCT ACG TAT CAT CGG GGT	14	TGG GAG ACG TAT TTG ACT
5	GGT TCG AAG TCG AGG GTG	15	TTT CTT ATT TCT TTT CCT
6	CAT TTT ACG TAT CAG TGG	16	TCT ATG AGG GAT TCT CTT
7	AGG CCG CGG TTT AGT TTT	17	TTG TCG AGT GCG GTT CGG
8	CCT GCG ATT ATT ATT ACT	18	TTG GAG CGG GCG ATT TCT
9	TGT AGG GGG TGT CGT AAT	19	AAT CAG TTT TAT CTG GGT
10	GTT GAT TTT AGG GCG TTT	20	GCT AGT TGG CGT TAT CCT

### 2.2.2. Séquence en aa des clones streptavidine

Ces séquences ont été déduites des séquences oligonucléotidiques précédentes :

1	Leu Val Pro Ala Phe Arg	L V P A F R
2	Leu Val Pro Ala Phe Arg	L V P A F R
3	Glu Leu Phe Ala Arg Val	E L F A R V
4	Ser Thr Tyr His Arg Gly	S T Y H R G
5	Gly Ser Lys Ser Arg Val	G S K S R V
6	His Phe Thr Tyr Gln Trp	H F T Y Q W
7	Arg Pro Arg Phe Ser Phe	R P R F S F
8	Pro Ala Ile Ile Ile Thr	P A I I I T
9	Cys Arg Gly Cys Arg Asn	C R G C R N
10	Val Asp Phe Arg Ala Phe	V D F R A F
11	Thr Leu Pro Arg Pro Val	T L P R P V

12	Thr His Ser Gly Tyr Trp	T H S G Y W
13	Leu Glu Arg Ala Ile Ser	L E R A I S
14	Trp Glu Thr Tyr Leu Thr	W E T Y L T
15	Phe Leu Ile Ser Phe Pro	F L I S F P
16	Ser Met Arg Asp Ser Leu	S M R D S L
17	Leu Ser Ser Ala Val Arg	L S S A V R
18	Leu Glu Arg Ala Tyr Ser	L E R A Y S
19	Asn Gln Phe Tyr Leu Gly	N Q F Y L G
20	Ala Ser Trp Arg Tyr Pro	A S W R Y P

Ces données sont analysées au point 4.

### **3. Sélection par affinité des phages contre l'anticorps monoclonal 4F9**

Cet Ac monoclonal est dirigé contre le LPS de *Brucella*. Lors des biopanning, l'Ac est fixé à la surface solide par l'intermédiaire de la réaction streptavidine-Biotine. Nos Ac ont donc dû être biotinylés (Mat. et Méth. 1.4). La biotinylation de nos Ac a été vérifiée grâce à un test ELISA. Du LPS a été adsorbé dans les puits d'une multiplaque et nous avons déposé l'Ac biotinylé. Après lavage, nous avons ajouté un complexe avidine-peroxidase permettant la mise en évidence des Ac fixés. Trois pannings ont été réalisés, chacun séparés par une amplification de l'éluat ainsi que des titrations. Toutes ces étapes ont été menées de la même façon que dans le cas du contrôle streptavidine (point 2.1).

#### **3.1 Titration des biopanning contre l'anticorps monoclonal 4F9**

La sélection des clones a été assurée par trois pannings successifs avec une concentration en Ac décroissante permettant d'assurer une sélection de plus en plus forte des clones de haute affinité. Le comptage des colonies sur milieu solide sélectif nous permet d'estimer le titre en TU/ml ou "Transducing Units"/ml. Une amplification apparaît de nouveau entre chaque étapes de panning.



Résultats de l'ELISA classique des clones sélectionnés contre le 4F9	
N° des clones	Absorbance
1	0,142
2	0,115
3	0,089
4	0,149
5	0,113
6	0,155
7	0,19
8	0,155
9	0,183
10	0,099
11	0,099
12	0,091
13	0,088
14	0,19
15	0,158
16	0,176
17	0,145
18	0,149
19	0,113
20	0,098
21	0,121
22	0,146
23	0,142
24	0,123
25	0,117
26	0,182
27	0,203
28	0,16
29	0,192
30	0,239
31	0,232
32	0,203
33	0,199
34	0,273
35	0,197
36	0,213
37	0,248
38	0,167
39	0,135
40	0,157
41	0,177
42	0,202
43	0,197
44	0,157
45	0,192

46	0,153
47	0,216
SV	0,065
AK	0,076
NS	0,089
A89	0,076

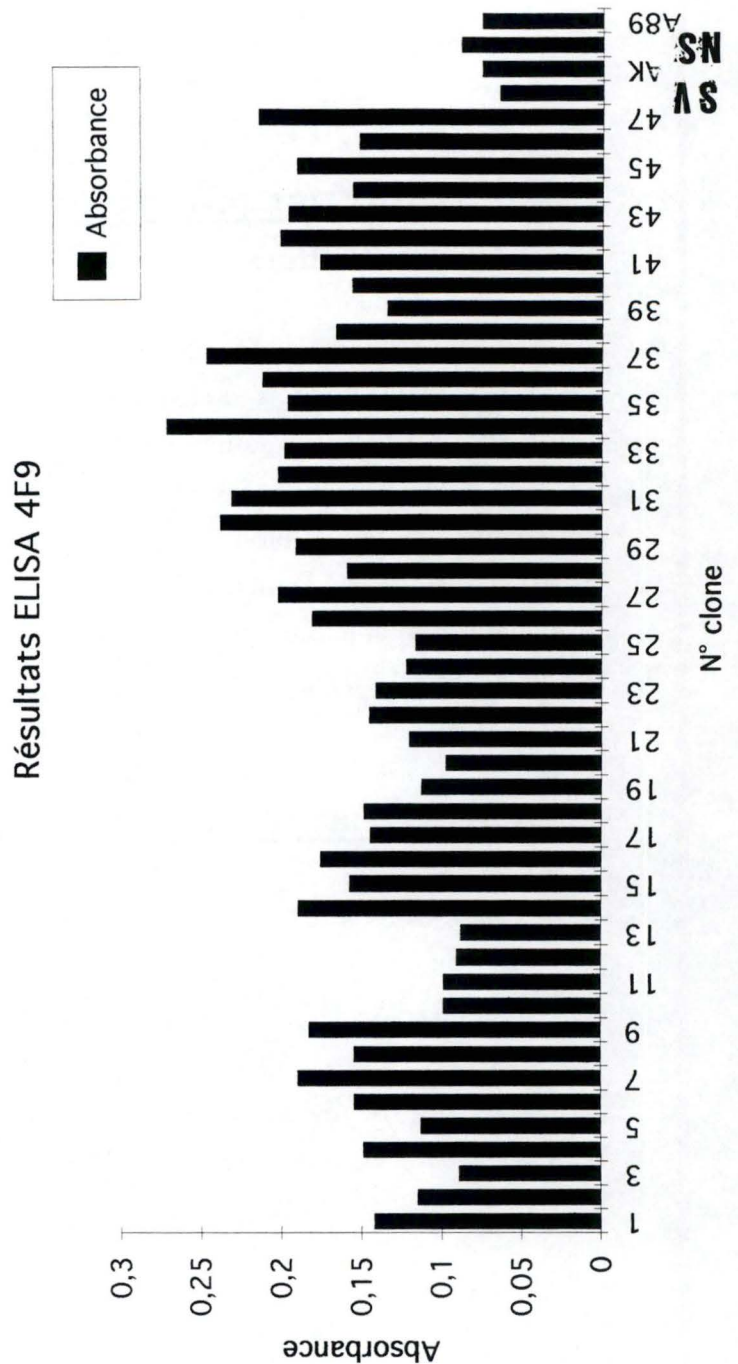


Tableau 6  
Résultats de l'ELISA

**Panning 1 :**

Réalisé avec 10 µg de 4F9

Suspension de phage de départ :  $10^{12}$  TU/ml

Clones sélectionnés :  $3,86 \cdot 10^7$  TU/ml

**Panning 2 :**

Réalisé avec 1 µg de 4F9

Suspension de phage de départ :  $9,08 \cdot 10^{10}$  TU/ml

Clones sélectionnés :  $2,0 \cdot 10^8$  TU/ml

**Panning 3 :**

Réalisé avec 0,01 µg de 4F9

Suspension de phage de départ :  $8,36 \cdot 10^9$  TU/ml

Clones sélectionnés :  $2,5 \cdot 10^5$  TU/ml

Comme pour le contrôle streptavidine, nous assistons bien à une diminution du titre lors des différents pannings suggérant une sélection des phages selon leur affinité pour l'Ac utilisé. Les clones individualisés lors du panning final, ont été soumis à des tests de fixation (ELISA) et les parties de leur génome portant l'insert ont été séquencées.

### **3.2 Test de fixation des phages sélectionnés sur l'anticorps monoclonal 4F9**

Ce test a été réalisé dans le but de confirmer la spécificité des phages sélectionnés vis à vis de l'Ac monoclonal et de choisir ceux devant subir le séquençage. Le test utilisé est un ELISA direct employant le 4F9 couplé à la peroxydase, la révélation s'opérant grâce à l'OPD. Les résultats obtenus sont consignés dans la Tableau 6. Cette figure comprend l'absorbance obtenue par les 47 clones testés ainsi que celle des contrôles négatifs. Les différents contrôles sont respectivement les suivants : sans virions (SV), virions + AC non relevant (AK13A2) (AK), clones non sélectionnés + 4F9 (NS) et enfin des clones sélectionnés contre une protéine de membrane externe de *Brucella* (89 Kda) + 4F9 (A89). Pour des raisons pratiques, le témoin positif en l'occurrence du LPS n'est



pas représenté sur le graphique. Son absorbance étant de 2,386. Les résultats nous montrent que la plupart des clones sélectionnés ont une absorbance supérieure aux témoins négatifs. Ceci signifiant qu'il y a bien reconnaissance et fixation de l'Ac sur ces clones. Ne pouvant séquencer tous les clones, nous avons sélectionnés pour cette opération ceux dont l'absorbance était la plus importante. Ceci tout en sachant que l'absorbance n'est pas uniquement le reflet de l'affinité pour l'Ac mais dépend aussi du titre des phages mis à son contact. Ce biais n'a pu être évité car nous ne possédons pas de méthode de titration rapide et efficace des phages.

### **3.3 Séquençage des clones sélectionnés contre le 4F9**

Le séquençage a été réalisé de la même manière que pour les clones non sélectionnés et streptavidine.

Dans ce cas 19 clones ont été séquencés, les résultats sont les suivants :

#### **3.3.1 Séquence nucléotidique des clones 4F9**

1	ATG GCT CTG TTT CCT ATG	11	GTT TTT CAG TTG GGTGCG
2	CGG TTG AAG GGT GGT GTG	12	GAG CTG AAT CTT TCT G AT
3	TCT GGG CAG CCT CTT GCT	13	GCT TCG CGT CAT ATT CTT
4	AAT GTG GGG ATT CGT TGG	14	CGT ACT AAT TAT GCG CGT
5	CAG CGG ATG GGG AAT TAT	15	AAG CTG GTT CGG TTT AGT
6	TTG CGG CCG CTG GGT CGG	16	TAT GGT AAT GCG GTG GAG
7	GCG TTG TGG GCG GGG GAT	17	CAG AGT GAT CGT AAG TTT
8	CTG AAT GAG ATT GTT AAT	18	AAG CGT TCT CGT GTG TCG
9	CAT TCT GCG CAG CCT TAT	19	TTT CTT ATT TCT TTT CCT
10	CTT GGG GTG TCG GGT ATT		

Les séquences en aa correspondant à ces séquences nucléotidiques sont les suivantes :

#### **3.3.2 Séquence en aa des clones 4F9**

1	Met Ala Leu Phe Pro Met	M A L F P M
2	Arg Leu Lys Gly Gly Val	R L K G G V

3	Ser Gly Gln Pro Leu Ala	S G Q P L A
4	Asn Val Gly Ile Arg Trp	N V G I R W
5	Gln Arg Met Gly Asn Tyr	Q R M G N Y
6	Leu Arg Pro Leu Gly Arg	L R P L G R
7	Ala Leu Trp Ala Gly Arg	A L W A G R
8	Leu Asn Glu Ile Val Asn	L N E I V N
9	His Ser ALa Gln Pro Tyr	H S A Q P Y
10	Leu Gly Val Ser Gly Ile	L G V S G I
11	Val Phe Gln Leu Gly Ala	V F Q L G A
12	Glu Leu Asn Leu Ser Asp	E L N L S D
13	Ala Ser Arg His Ile Leu	A S R H I L
14	Arg Thr Asn Tyr Ala Arg	R T N Y A R
15	Lys Leu Val Arg Phe Thr	K L V R F T
16	Tyr Gly Asn Ala Val Glu	Y G N A V E
17	Gln Ser Asp Arg Lys Phe	Q S D R K F
1	Lys Arg Ser Arg Val Ser	K R S R V S
19	Phe Leu Ile Ser Phe Pro	F L I S F P

Ces séquences brutes, comme dans le cas des clones streptavidine, n'amènent que peu de résultats et tout du moins aucunes conclusion ne peuvent en être tirées. Certaines analyses sont donc nécessaires. Celles qui ont été réalisées dans le cadre de ce mémoire sont les suivantes (Degraaf et al., 1993) :

Fréquence des acides aminés

Positions des types d'aa.

Fréquence de la position des aa.

Présence de dipeptides indépendants

Les résultats de ces analyses doivent cependant être interprétés de manière très prudente car un biais est introduit par la taille réduite des échantillons.



Fréquence en aa dans les clones sélectionnés contre la streptavidine(NNK)			
Nb codons	aa	Fréqu. att.	Fréqu.
1	D	3,75	2
1	E	3,75	4
1	K	3,75	1
3	R	11,25	16
1	H	3,75	3
2	A	7,50	9
2	V	7,50	7
3	L	11,25	11
1	I	3,75	5
2	P	7,50	8
2	F	7,50	11
1	W	3,75	4
1	M	3,75	1
2	G	7,50	5
3	S	11,25	13
2	T	7,50	7
1	C	3,75	2
1	Y	3,75	7
1	N	3,75	2
1	Q	3,75	2
32	Totaux	120,00	120

Fréquence en aa dans les clones streptavidine (NNK)

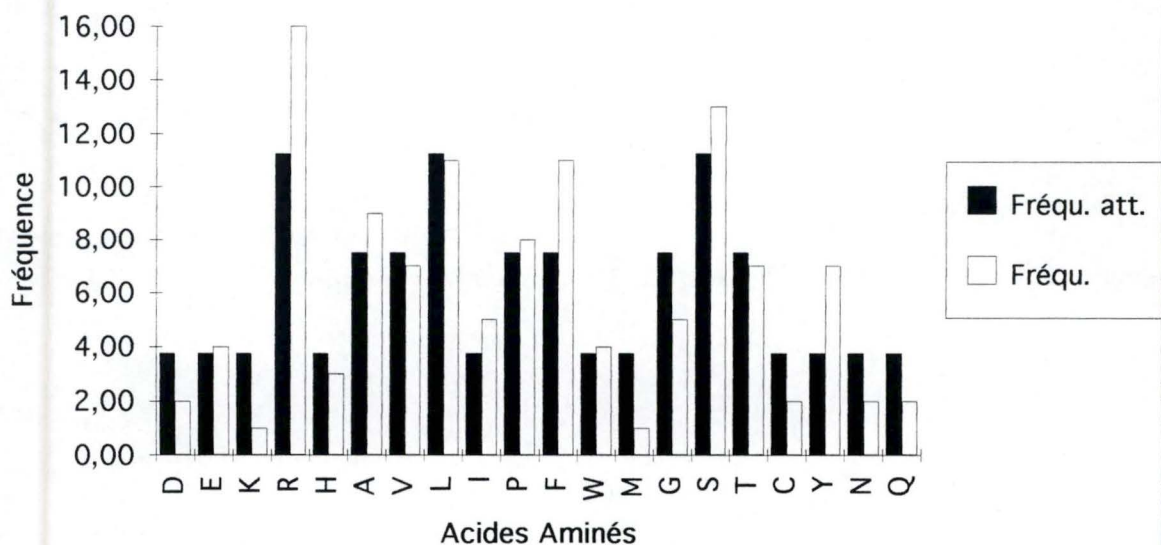


Tableau 7  
 Comparaison de la fréquence en aa dans les clones sélectionnés contre la streptavidine et une banque aléatoire

## **4. Analyse des séquences des clones sélectionnés contre la streptavidine et le 4F9**

### **4.1 Fréquence des Acides Aminés**

Dans ce test nous avons comparé la fréquence d'apparition des aa dans les différents clones (strepta. et 4F9) avec la fréquence attendue de ceux-ci si il s'agissait d'une banque aléatoire. Nous avons également comparé la fréquence des aa dans ces deux catégories de clones avec celle obtenue dans les clones non sélectionnés. La fréquence attendue est calculée comme suit : (nombre de codons de l'aa / nombre total de codon) x nombre d'aa de l'échantillon. Dans notre cas, le nombre total de codons n'est que de 32 puisque les bases A et C sont exclues de la troisième position des codons.

#### **4.1.1 Comparaison de la fréquence en aa dans les clones streptavidine et dans une banque aléatoire.**

Comme nous l'attendions la répartition des aa dans nos clones streptavidine est différente de la répartition aléatoire (tableau 7). Certains aa ont une fréquence inférieure à celle attendue dans le cas d'une répartition aléatoire : D, K, M, G, C, N et Q. D'autres montrent une tendance inverse : R, F, S et y. Enfin certains aa ont fréquence semblable à celle attendue : E, H, A, V, L, I, N, P, W et T. Les types d'aa (polaire, non polaire, acide et basique) étant répartis de manière aléatoire dans les trois groupes.

#### **4.1.2 Comparaison de la fréquence en aa dans les clones 4F9 et dans une banque aléatoire**

Pour les clones 4F9, la différence avec la banque aléatoire semble plus importante (tableau 8). Peu d'aa ont une distribution normale : E, K, V, M, Y et F. Les autres aa sont répartis de manière égale entre une augmentation de la fréquence (R, A L, I, G, N et Q) et une diminution de celle-ci (D, H, P, W, S, et T). Un des aa n'est pas représenté, il s'agit de la cystéine. Ces variations peuvent prendre des proportions assez importantes, par exemple l'augmentation de la fréquence de l'arginine, de la leucine et de la glycine. La diminution de fréquence de la thréonine est également assez marquante. Les classes d'aa sont réparties aléatoirement dans les trois groupes comme dans le cas de la streptavidine.



Fréquence en aa dans les clones sélectionnés contre le 4F9 anti LPS(NNK)			
Nb codons	aa	Fréqu. att.	Fréqu.
1	D	3,56	2
1	E	3,56	3
1	K	3,56	4
3	R	10,69	13
1	H	3,56	2
2	A	7,13	9
2	V	7,13	8
3	L	10,69	14
1	I	3,56	5
2	P	7,13	5
2	F	7,13	6
1	W	3,56	2
1	M	3,56	3
2	G	7,13	11
3	S	10,69	9
2	T	7,13	2
1	C	3,56	0
1	Y	3,56	4
1	N	3,56	7
1	Q	3,56	5
32	Total	114,00	114

Fréquence des aa dans les clones 4F9(NNK)

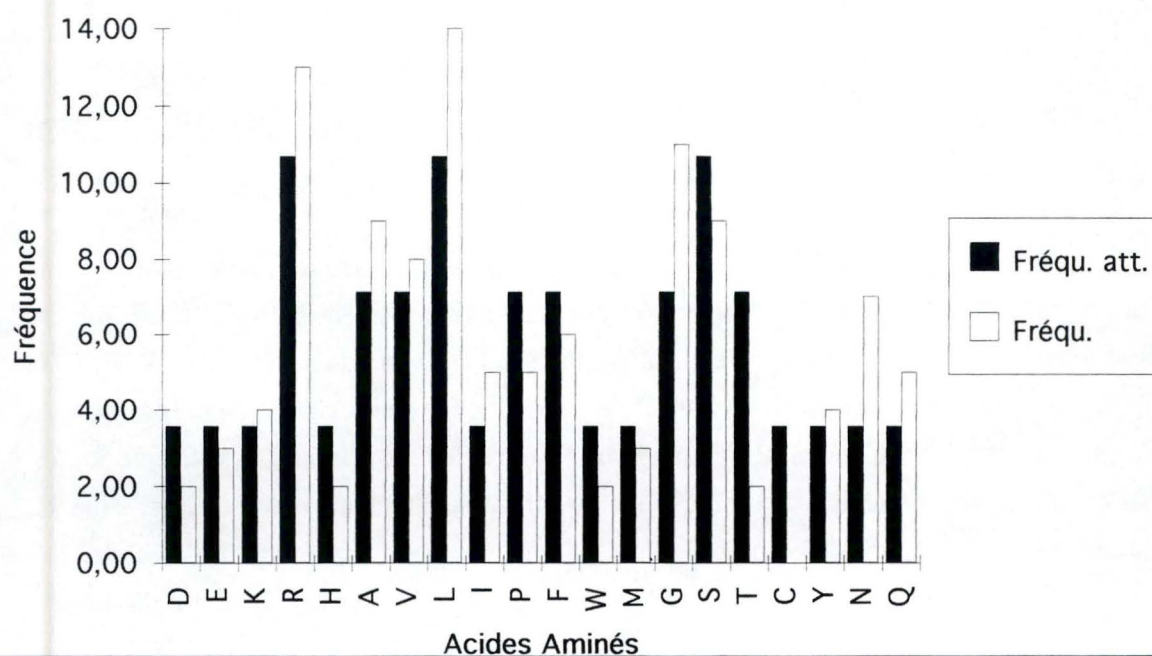


Tableau 8  
Comparaison de la fréquence en aa dans les clones sélectionnés contre l'Ac 4F9 et une banque aléatoire

### **4.1.3 Comparaison de la fréquence en aa dans les clones non sélectionnés, streptavidine et 4F9**

Dans ce test, les données comparées sont les fréquences relatives des aa dans les trois catégories de clones (tableau 9). La fréquence relative est calculée comme suit : (fréquence observée / nombre d'aa de l'échantillon) x 100. La répartition semble être la même au niveau des aa D, E, L, I et W. L'arginine est largement représentée que ce soit dans les clones streptavidine ou dans les clones 4F9. Une augmentation de fréquence des aa K, M, G, N et Q affecte les clones 4F9. La même tendance apparaît pour les aa F et Y dans les clones streptavidine. La fréquence des aa A et V est inférieure à l'attente (fréquence dans les clones non sélect.) à la fois dans les clones strept et 4F9. Les aa S et T sont plus faiblement représentés dans les clones 4F9, la cystéine y étant elle tout à fait absente. La répartition des aa varie donc dans les clones 4F9 et streptavidine vis à vis des clones non sélectionnés, ceci indique donc qu'une sélection a bien eu lieu.

### **4.2 Position des aa selon leurs caractéristiques physico-chimiques dans les clones non sélectionnés, streptavidine et 4F9**

Les tables de classification des aa sont nombreuses. Nous avons choisi celle utilisée par Degraaf lors de ces propres analyses (Degraaf et al., 1993).

La classification est la suivante :

aa Acides=D et E

aa Basiques=K, R et H

aa polaire=G, S, T, C, Y, N et Q

aa non polaire=A, V, L, I, P, F, W et M.

Les résultats obtenus et les graphiques sont détaillés dans le tableau 10. Le nombre d'aa variant dans les différentes classes, un graphique reprenant les fréquences observées serait inutilisable. Nous avons donc utilisé un graphique comportant les fréquences relatives d'apparition d'un type d'aa aux différentes positions. La fréquence relative est obtenue en divisant la fréquence d'apparition observée d'un type d'aa à une position par la fréquence attendue ce type d'aa à cette même position. Par exemple, si la répartition est aléatoire, nous avons 2 chances sur 20 d'obtenir un aa acides à une



Comparaison de la fréquence des aa des clones streptavidine et 4F9 avec celle des aa des clones non sélectionnés			
aa	Fréq rel NS	Fréq rel strep	Fréq rel 4F9
D	2,27	1,67	1,75
E	3,79	3,33	2,63
K	1,52	0,83	3,51
R	5,30	13,33	11,40
H	0,76	2,50	1,75
A	10,61	7,50	7,89
V	9,85	5,83	7,02
L	11,36	9,17	12,28
I	5,30	4,17	4,39
P	7,58	6,67	4,39
F	5,30	9,17	5,26
W	2,27	3,33	1,75
M	0,76	0,83	2,63
G	5,30	4,17	9,65
S	12,12	10,83	7,89
T	7,58	5,83	1,75
C	1,52	1,67	0,00
Y	3,03	5,83	3,51
N	2,27	1,67	6,14
Q	1,52	1,67	4,39

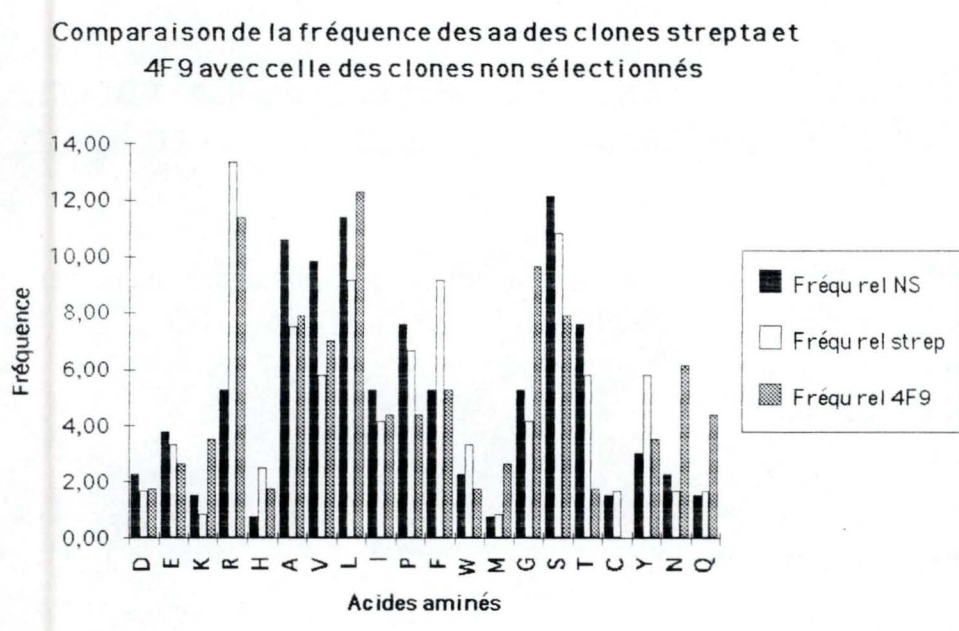


Tableau 9  
 Comparaison de la fréquence en aa dans les clones non sélectionnés, streptavidine et 4F9

position déterminée puisque cette classe des comporte 2 aa sur les 20 au total. Nous divisons donc les fréquences observées pour les aa acides par 2. Une fréquence relative de 1 correspond à une fréquence observée identique à la fréquence attendue.

#### **4.2.1 Clones non sélectionnés**

Les aa acides sont absents des positions 1 et 6 et ont une fréquence inférieure à l'attente si ce n'est en position 5 où ils sont largement prédominants. Les aa basiques sont également en faible proportion et n'apparaissent pas en position 3. Les aa polaires correspondent à l'attente partout sauf en dernière position où ils sont largement représentés. Le point marquant de cette analyse étant la large représentation des aa non polaires à toutes les positions.

#### **4.2.2 Clones streptavidine**

Les aa acides sont faiblement représentés aux positions 1 et 4, le sont largement à la position 2 et sont absents à la position 3 et aux deux dernières. Les aa polaires sont normalement représentés à toutes les positions et la prédominance des aa non polaire observée dans les clones non sélectionnés semble s'être estompée sauf en position 5. Les aa basiques ont une représentation supérieure à l'attente en position 3 et 4 et sont absents de la position 5

#### **4.2.3 Clones 4F9**

De même que dans les clones streptavidine, la représentation des aa polaires est assez proche de l'attente et la prédominance des aa non polaire a disparu. Les aa acides sont absents des positions 2, 4 et 5 et faiblement représentés en première position. Les aa basiques sont quant à eux normalement représentés sauf en position 1 et 4 où ils prédominent.

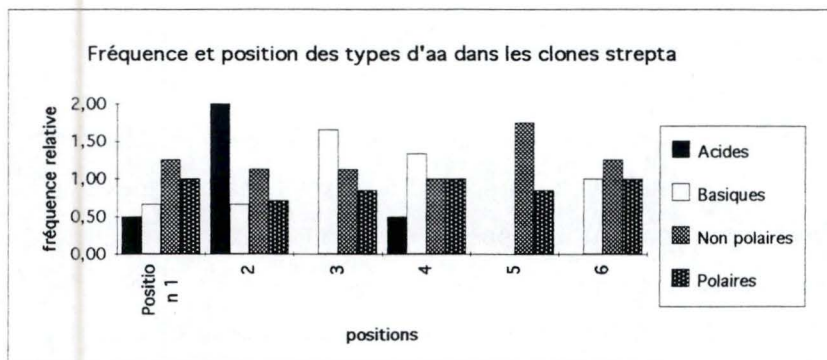
Contrairement à toutes attentes (Degraaf et al., 1993) une large prédominance des aa non polaires apparaît dans les clones non sélectionnés. Dans les clones streptavidine et surtout dans les clones 4F9 cette tendance s'estompe et fait place à une large augmentation de l'apparition de aa basiques. Les aa acides sont souvent absents dans les



Position des aa selon leurs caractéristiques physico-chimiques dans les clones streptavidine, 4F9 et non sélectionnés.

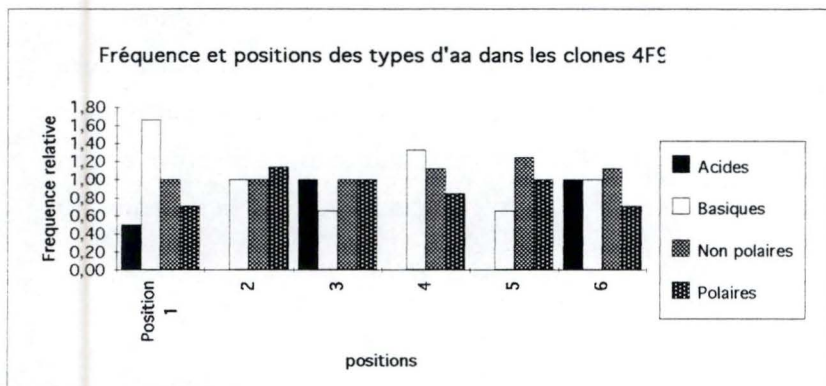
20 clones sélectionnés contre la streptavidine

Caract. aa	Position 1	2	3	4	5	6
Acides	0,50	2,00	0,00	0,50	0,00	0,00
Basiques	0,66	0,66	1,66	1,33	0,00	1,00
Non polaires	1,25	1,13	1,13	1,00	1,75	1,25
Polaires	1,00	0,71	0,85	1,00	0,85	1,00



19 clones sélectionnés contre le 4F9

Caract. aa	Position 1	2	3	4	5	6
Acides	0,50	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Basiques	1,66	1,00	0,66	1,33	0,66	1,00
Non polaires	1,00	1,00	1,00	1,13	1,25	1,13
Polaires	0,71	1,14	1,00	0,85	1,00	0,71



22 clones non sélectionnés

Caract. aa	Position 1	2	3	4	5	6
Acides	0,00	0,50	0,50	0,50	2,50	0,00
Basiques	1,33	0,33	0,00	0,66	0,33	0,66
Non polaires	1,50	1,75	1,75	0,13	1,50	1,25
Polaires	0,85	0,85	1,00	0,85	0,57	1,42

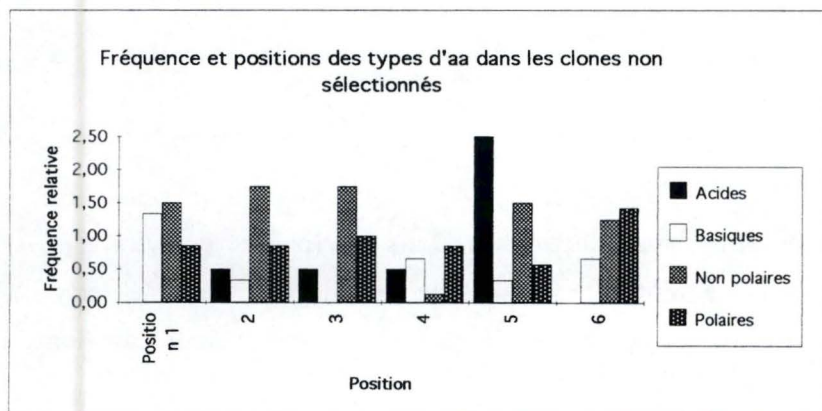


Tableau 10  
Représentation et position des aa selon leurs caractéristiques physicochimiques dans les clones non sélectionnés, streptavidine et 4F9

clones streptavidine et 4F9. Seule la représentation des aa polaires semble ne pas avoir été affectée par les différentes sélections. Cette analyse, bien que nous apportant quelques informations, est sujette à caution puisque les fréquences sont calculées indépendamment les unes des autres. Il faudrait pouvoir tenir compte des interrelations entre les aa. Ces analyses conditionnelles, où sont déterminées les fréquences d'un aa à une position en sachant qu'un autre aa occupe une autre position sont cependant fastidieuses et inapplicables sur des échantillons de petite taille.

### **4.3 Analyse de la position des acides aminés**

Il n'est pas toujours possible de mettre en évidence un consensus, ou séquence se répétant, inchangée, dans toutes séquences obtenues. Certains auteurs ont donc eu recours à la mise en évidence de séquences motifs. Celles-ci sont des séquences ou peuvent apparaître plusieurs aa à une même position. Etant nous même dans l'incapacité de fournir un consensus, nous avons dû recourir à la détermination d'une séquence motif. Le tableau 11 présente l'occurrence des aa aux différentes positions des hexapeptides séquencés. La séquence motif est construite en prenant les aa les plus fréquemment rencontrés et ce pour chacune des positions. Dans le cas de clones non sélectionnés, la répartition des aa aux différentes positions est trop homogène que pour émettre une séquence motif ayant du sens. Pour les clones streptavidine, certains aa sont largement représentés à certaines positions et il est donc possible de déduire une séquence motif.

L (E/L/S) R A R (R/V)

Néanmoins, une certaine variabilité apparaît au niveau des positions 2 et 6.

Une séquence consensus peut également être mise en évidence pour les clones 4F9.

L L N (R/L) G R

Cette séquence motif corrèle d'ailleurs bien avec l'analyse de la fréquence des aa où les aa L, R, G et N sont largement représentés.

Ces séquences motifs peuvent encore être affinées par l'analyse de la présence de dipeptides au sein des différents hexapeptides sélectionnés.



Fréquence des dipeptides au sein des clones 4F9

1er résidu	2eme résidu																				1er résidu	fréq.	
	D	E	K	R	H	A	V	L	I	P	F	W	M	G	S	T	C	Y	N	Q			
D				1																	D	1	
E								1	1													E	2
K				1				1			1			1								K	4
R				1	1		1	1		1	1	1	1		1	1						R	10
H									1						1							H	2
A				1			1	2						1	1					1		A	7
V		1		1							1			1	2					1		V	6
L			1	1		1	1		1		1	1		3	1					2		L	13
I				1			1	1							1							I	4
P									2				1						1			P	4
F								1		2							1				1	F	5
W							1															W	1
M							1							1								M	2
G				2		1	2		2					1						2	1	G	11
S		2			2		1					1			2							S	8
T																					1	T	1
C																						C	0
Y							1							1								Y	2
N			1				1	1	1											2		N	6
Q				1					1		2				1							Q	5
2eme résidu	D	E	K	R	H	A	V	L	I	P	F	W	M	G	S	T	C	Y	N	Q			
	2	2	2	11	1	7	7	11	5	5	5	2	2	11	8	2	0	3	6	3			

Tableau 12  
Fréquence de dipeptides

Préférence première position	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	C	TDW	HEMV		KIP	FQ	NS	A	S		R	G		L

Préférence deuxième position	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	C	H	DEKW MT	YQ	IPF	N	AV	S				GRL		

## Fréquence des dipeptides au sein des clones 4F9

	2eme résidu																				1er résidu		
1er résidu	D	E	K	R	H	A	V	L	I	P	F	W	M	G	S	T	C	Y	N	Q		1er résidu	fréq.
D				1																		D	1
E								1	1													E	2
K				1				1			1				1							K	4
R				1	1		1	1		1	1	1	1			1	1					R	10
H									1							1						H	2
A				1			1	2							1	1				1		A	7
V		1		1							1				1	2				1		V	6
L			1	1		1	1		1		1	1			3	1				2		L	13
I				1				1	1							1						I	4
P									2					1					1			P	4
F								1			2						1				1	F	5
W							1															W	1
M							1								1							M	2
G				2		1	2		2						1					2	1	G	11
S		2			2		1					1			2							S	8
T																				1		T	1
C																						C	0
Y							1								1							Y	2
N			1				1	1	1											2		N	6
Q				1					1		2					1						Q	5
2eme résidu	D	E	K	R	H	A	V	L	I	P	F	W	M	G	S	T	C	Y	N	Q			
	2	2	2	11	1	7	7	11	5	5	5	2	2	11	8	2	0	3	6	3			

Tableau 12  
Fréquence de dipeptides

Préférence première position	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	C	TDW	HEMV		KIP	FQ	NS	A	S		R	G		L

Préférence deuxième position	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	C	H	DEKW MT	YQ	IPF	N	AV	S				GRL		



## DIPEPTIDES

## Fréquence des dipeptides au sein des clones streptavidine

1er résidu	2eme résidu																				1er résidu	fréq.
	D	E	K	R	H	A	V	L	I	P	F	W	M	G	S	T	C	Y	N	Q		
D											1				1						D	2
E				2				1									1				E	4
K																1					K	1
R	1					3	2			2	1							1	1		R	13
H				1			1				1			2	1						H	3
A				1						1	3				1				1		A	7
V	1			1						2											V	4
L			2				2			1	1	1		1	1	1					L	10
I										2						2	1				I	5
P				2		3	1														P	6
F				3		1		1		1					1	1			1		F	9
W			1		1																W	2
M				1																	M	1
G																		1	1		G	3
S				1	1		1		1		2	1	1	1	1	1					S	11
T					1			1											3		T	5
C				2																	C	2
Y					1			2		1		1			1						Y	7
N																					N	1
Q											1	1									Q	2
2eme résidu	D	E	K	R	H	A	V	L	I	P	F	W	M	G	S	T	C	Y	N	Q		
	2	3	1	15	2	8	6	6	4	7	10	3	1	4	11	5	1	7	1	2		

Préférence première position	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
		KMN	DNCQ	HG	EV	IT	P	AY		F	L	S		R

Préférence deuxième position	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
		KMCN	HDQ	EW	IG	T	VL	PY	A		F	S				R

#### 4.4 Fréquence des dipeptides

La fréquence d'apparition des dipeptides au sein des séquences streptavidine et 4F9 est répertoriée dans le tableau 12. Ce tableau comprend également les préférences d'apparition des aa en première ou en deuxième position de ces dipeptides. Les séquences motifs déterminées précédemment vont être améliorées grâce à cette analyse. Lorsqu'une indécision quant à l'aa apparaît à une position de l'hexapeptide, elle est levée en adoptant l'aa le plus représenté dans cette configuration. Cette donnée nous étant fournie par la fréquence des dipeptides. Cette fréquence est obtenue en comptant le nombre de dipeptides ou couple d'aa au sein des différentes séquences et en procédant par chevauchement de 1 (overlapping de 1). Par exemple pour la séquence A S W R Y P, les différents dipeptides sont : AS, SW, WR, RY et YP.

La séquence motif mise en évidence dans les clones streptavidine est la suivante : L (E/L/S) R A R (R/V). Des indécisions apparaissent dans le choix des aa au positions 2 et 6. En tenant compte de la variabilité de la position 2, les différents dipeptides possibles en position 1 et 2 ainsi qu'en position 2 et 3 sont : LE (2), LL (0), LS (1), ER (2), LR (0) et SR (1). Entre parenthèse, apparaissent les fréquences d'observation de ces dipeptides dans tous les clones sélectionnés contre la streptavidine. Les dipeptides LE et ER sont les plus représentés et nous permettent d'attribuer la deuxième position de l'hexapeptide à l'aa E (ac. Glutamique). En position 5 et 6, les deux dipeptides possibles sont : RR (0) et RV (2). Nous adoptons donc l'aa V (valine) pour la dernière position.

Notre séquence motif pour la streptavidine devient donc :

L E R A R V

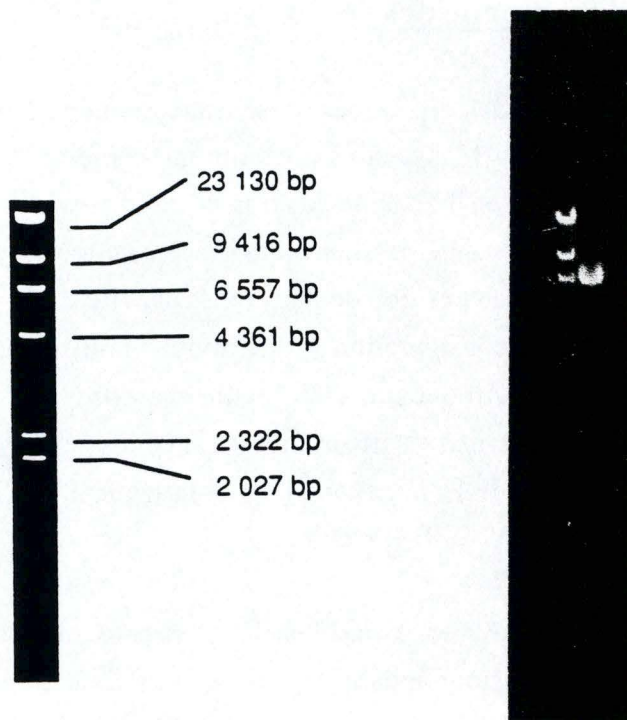
La même analyse est réalisée pour la séquence motif des clones 4F9 (L L N (R/L) G R). Deux aa apparaissent en troisième position, l'arginine et la leucine. Les dipeptides possibles sont les suivants : NR (0), NL (1), RG (0) et NG (3). Aucun dipeptide NR ou RG n'apparaît. Par contre 1 dipeptide NL et 3 LG sont présent. La troisième position de notre séquence motif revient donc à l'aa L (leucine).

La séquence motif devient :

L L N L G R

L'utilisation de ces motifs doit être prudente. En effet, ils proviennent de l'analyse d'un nombre réduit de séquences comportant une variabilité importante. L'occurrence





marqueur  $\lambda$  restreint par *Hin* d III

Figure 24  
 Résultats du gel d'électrophorèse en agarose.  
 Piste 1=Marqueur  
 Piste 2=échantillon

maximale d'un aa à une position n'excède d'ailleurs pas 6/20. Ces motifs ne sont pas largement représentés au sein des séquences obtenues et n'ont pas la prétention d'être proche de la séquence peptidique mimant les épitopes étudiés (mimotopes).

## **5. Analyse des résultats concernant la production d'un anticorps polyclonal dirigé contre les phages fUSE 5**

Un phage sélectionné au hasard dans la banque a été produit en grande quantité et a été purifié (Mat. et méth. point 4.1). La concentration de la suspension de phage était de 2 mg/ml et sa pureté a été vérifiée par migration d'ADN sur gel d'électrophorèse d'agarose (Mat. et Méth. point 4.2). Ces phages ont ensuite été inoculés au lapin (Mat. et Méth. point 4.3). Enfin la production de l'Ac polyclonal par le lapin a été mise en évidence par ELISA (Mat. et Méth. point 4.4).

### **5.1 Electrophorèse en gel d'agarose**

Un échantillon de notre suspension de phage, adéquatement préparé, a été soumis à une migration électrophorétique sur gel d'agarose (Mat. et Meth. point 4.2). Le résultat de celle-ci apparaît dans la figure 24.

La première piste correspond au marqueur de masse moléculaire (ADN du phage  $\lambda$  restreint par *Hin* d 3). La deuxième piste correspond à notre échantillon. Une bande apparaît dans cette piste, elle correspond à un fragment d'environ 6500 paires de bases. Ceci correspond bien à la taille de l'ADN génomique de nos phages. Cette bande est unique et montre que notre suspension de phages ne contient pas d'ADN de *E.coli*, ou en tout cas pas assez que pour le mettre en évidence.

### **5.2 Confirmation de la production de l'anticorps polyclonal anti fUSE 5**

Le sérum obtenu après immunisation du lapin a été testé en ELISA à la fois sur des phages et sur un lysat de bactéries *E.coli* (Mat. et Méth. point 4.4). Les résultats obtenus (Figure 25) montrent un signal important dans les deux cas. Ceci indique qu'il y a eu production d'Ac anti-*coli*. La suspension de phages que nous avons injecté au lapin



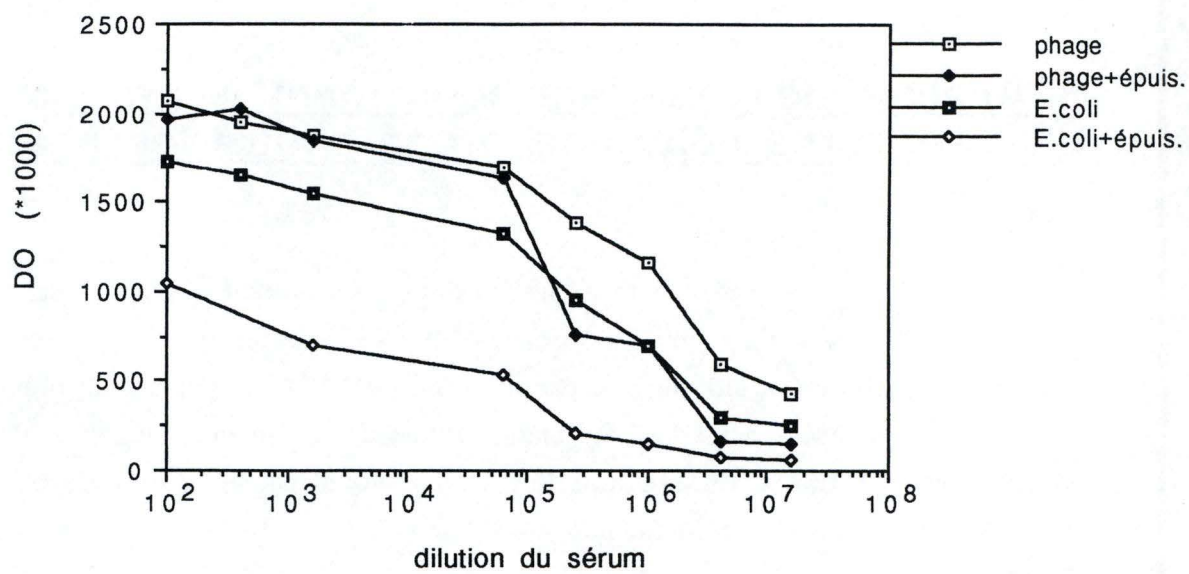


Figure 25  
 Résultats du test ELISA

---

contenait sans doute des protéines de cette bactérie. Pour déterminer si d'autres Ac (anti fUSE 5) ont bien été produits, nous avons réalisé les mêmes tests avec du sérum épuisé contre *E.Coli*. En testant le sérum épuisé sur les phages, un signal est obtenu jusqu'à de hautes dilutions du sérum. Par contre, une extinction du signal apparaît rapidement lorsque le sérum est testé sur un lysat de bactéries *E.coli*. Ceci montre qu'outre la production d'Ac anti-coli, il y a bien eu production d'Ac dirigés contre les phages fUSE 5.



# Discussion

## E. Discussion

La mise en évidence d'épitopes par criblage immunologique de banques de peptides aléatoires sur phage est une technique très récente mais ayant déjà porté ses fruits. Dower a décrit la localisation de l'épitope reconnu par un Ac monoclonal dirigé contre le tumor necrosis factor- $\alpha$  humain. Les clones réactifs ont été isolés d'une banque d'octapeptides exprimés en fusion à la protéine PIII des phages. 22 des 23 clones séquencés arboraient la séquence PEGXE (X=alanine dans 50% des clones)(Dower, 1992). Lane et Stephen ont découvert la séquence épitopique reconnue par l'Ac monoclonal PAb240 dirigé contre la protéine tumeur suppressive P53. Ils ont utilisé une banque d'hexapeptides sur phage identique à la nôtre (peptide exprimé en fusion à la protéine d'enveloppe PIII) et après trois cycles de panning ont testés les clones par ELISA. Tous les clones positifs contenaient la séquence RHSVV ou RHSVI. Les protéines p53 humaines, de souris et de poulet contenant la séquence RHSVV (Lane and Stephen, 1993).

Néanmoins, ces techniques de criblage immunologique, comme toutes les techniques récentes, comportent des échecs. Lane et Stephen ont criblé la même banque d'hexapeptides avec d'autres Ac monoclonaux anti p53, mais dans aucun cas ils n'ont isoler de clones aptes à la fixation. L'explication la plus simple est que l'épitope minimum reconnu par ces Ac à une taille supérieure à 6 résidus et donc n'est pas représenté dans la banque d'hexapeptides (Lane and Stephen, 1993). Ces problèmes de tailles épitopiques ne sont cependant pas les seuls. Christian et al. ont criblé une banque de décapeptides avec un Ac monoclonal anti gp120 de virus d'immunodéficience humaine type 1 (HIV-1) connu pour reconnaître un décapeptide aucun peptide homologue de l'antigène n'a été isolé. Seuls des mimotopes de faible affinité ont été mis en évidence. Ces résultats indiquent une insuffisance de discrimination entre les rares séquences de haute affinité et les nombreuses séquences de faible affinité (Christian et al., 1992).

La détermination de séquence motif intervient lorsqu'il est impossible de mettre en évidence une séquence consensus. Ceci apparaît lorsque tous les résidus de la séquence épitopique n'interviennent pas de manière importante dans la fixation de l'Ac. Certains auteurs ont été confrontés à ce problème. Utilisant une banque d'hexapeptides (PIII) Smith et son équipe ont, après trois pannings, isolé des clones exprimant des peptides se liant à la protéine-S (un fragment d'une ribonucléase pancréatique bovine). Ne pouvant déceler une séquence consensus, ils ont édité une séquence motif où plusieurs aa peuvent



occuper la même position. Cette séquence est la suivante : (F/Y) N F (E/V) (I/V) (L/V) (Smith et al., 1993). Kay et ses confrères ont utilisé une banque de peptides aléatoires de 36 résidus de long insérés à l'extrémité N-terminale de la protéine PIII de phage de type TSAR-9. Ils ont criblé cette banque avec un Ac dirigé contre le fragment Fc des immunoglobulines de souris. De même que Smith, ils n'ont pu déterminer de séquence consensus. La séquence motif reconnue est la suivante : R T (I/L) (S/T) K P (Kay et al., 1993).

Lors du criblage de notre banque avec la streptavidine, aucune séquence consensus n'a pu être mise en évidence. Une telle séquence a pourtant été identifiée à plusieurs reprises, soit par criblage de banques de peptides synthétiques aléatoires soit par criblage de banque de peptides aléatoires sur phages. Devlin et al. ont criblé une banque d'environ 20 millions de séquences aléatoires de 15 résidus exprimés à la surface des phages et ont obtenu 20 peptides qui peuvent se fixer à la streptavidine (Devlin et al., 1990). Lam et son équipe ont quant à eux criblé une banque de pentapeptides aléatoires synthétiques et ont trouvé 28 peptides spécifiques de la streptavidine (Lam et al., 1991). La plupart des peptides sélectionnés par les auteurs précédents, se fixant à la streptavidine possèdent une séquence tripeptidique His-Pro-Gln avec des substitutions occasionnelles de la méthionine ou de l'asparagine pour la glutamine. Plus récemment, Kay et al. ainsi que McLafferty, utilisant tous deux des banques de peptides aléatoires (avec des inserts d'une taille de 36 et 18 respectivement) sur phages, ont mis en évidence la même séquence consensus (Kay et al., 1993 et McLafferty et al., 1993). Weber et son équipe ont réalisé l'étude de la fixation à la streptavidine d'un peptide contenant cette séquence et la détermination de la structure cristallographique du complexe ainsi formé (Weber et al., 1992). La structure cristallographique montre que le peptide (Phe-Ser-His-Pro-Gln-Asn-Thr) se fixe avec l'histidine, la glutamine et la proline orientées à l'intérieur du site de fixation de la biotine sur la streptavidine et bien que certains résidus participant à la fixation de la biotine interagissent également avec les peptides, ceux-ci adoptent un mode de fixation différent de la biotine.

Certains auteurs, par contre, n'ont pu mettre en évidence cette séquence consensus. Roberts et al., utilisant une banque d'hexapeptides identique à la nôtre, basée sur les phages de type fUSE 5, ont déterminé deux séquences consensus après criblage contre la streptavidine. Ces séquences (GDWVFI et PWPWLG) ne contiennent pas les aa H, P et Q. Les peptides correspondants ont été testés en ELISA et sont bien capables de se fixer sur la streptavidine. Roberts et al. ont alors cloné un peptide contenant la séquence HPQ dans un phage de type fUSE 5 et ont montré que la fixation à la



streptavidine n'a pas lieu. Donc dans le contexte du vecteur fUSE 5, la séquence HPQ est incapable de se fixer à la streptavidine (Roberts et al., 1993). Ceci montre qu'il est tout à fait normal que nous n'ayons pu mettre en évidence la séquence consensus habituellement reconnue. Néanmoins et bien que nous travaillions avec le même type de vecteur, notre séquence motif n'a pas de point commun avec les séquences de Roberts et al.. L'utilisation de notre séquence motif nécessite cependant la plus grande prudence d'une part car l'échantillon étudié est de taille réduite et d'autre part parce que la séquence motif a été réalisée avec un maximum d'occurrence d'un aa de 6/20 à une position. L'explication du fait que nous n'ayons pu mettre en évidence la même séquence consensus que Roberts et al. réside sans doute dans les différentes conditions d'élutions des phages sélectionnés. Ils ont élué leurs phages à pH acide 30 minutes à 37°C. Nous l'avons fait 10 minutes à température ambiante. Il est possible et même probable que nos conditions moins drastiques n'aient permis que l'élution des phages de faible affinité et par le fait même nous aient empêché de mettre en évidence une séquence consensus.

Lors de la sélection des phages contre l'anticorps monoclonal 4F9, nous n'avons pas pu mettre en évidence de séquence consensus. Il nous a cependant été possible d'identifier une séquence motif. Celle-ci comporte néanmoins les mêmes limitations que la séquence motif que nous avons mis en évidence pour la streptavidine. Dans ce cas précis, nous faisons face à une difficulté supplémentaire puisque l'épitope à identifier est non protéique. Pour rappel, notre Ac est dirigé contre la chaîne O du LPS qui est de nature polysaccharidique. Cette difficulté supplémentaire ne devrait pourtant pas constituer un obstacle puisque des épitopes non protéiques ont déjà été identifiés. Grâce à une banque d'hexapeptides aléatoires exprimés à la surface de phages, Scott et al. ont mis en évidence des phages se liant à la Concanavaleine A (Lectine) et dont la fixation est inhibée par le ligand naturel composé d'hydrates de carbone (méthyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside). Ils ont déterminé une séquence consensus qui est la suivante : YPY (Scott et al., 1992). Hoess et al., ont déterminé la séquence épitopique de l'Ac monoclonal B3 dirigé contre une structure non protéique (hydrate de carbone, antigène de Lewis) de la surface de nombreuses cellules adénocarcinomeuses. Ils ont utilisé une banque d'octapeptides exprimés à la surface de phages. La séquence de l'épitope est la suivante : APWLYGPA (Hoess et al., 1993).

Si le problème ne résulte pas de la nature de l'épitope, il provient peut être, comme dans le cas de la streptavidine, de nos conditions d'élutions trop faibles pour la mise en évidence des phages de très haute affinité. Des conditions d'élution plus



drastiques pourraient donc être envisagées. Pour favoriser l'obtention de clones de plus haute affinité, un quatrième panning pourrait également être envisagé.

Une autre amélioration pouvant être apportée à ce système se situe au niveau de la sélection par ELISA des phages destinés au séquençage. L'Ac polyclonal anti-fUSE 5 devrait nous permettre d'éliminer le biais introduit par l'absence de connaissance du titre lors de la sélection des phages ayant une absorbance importante en ELISA. Tester des dilutions de suspensions de phages de titre connu en ELISA de capture permettrait de déterminer une courbe de calibration. Celle-ci nous permettant par la suite de connaître facilement le titre des suspensions inconnues. Grâce à ce titre, il nous sera possible de savoir si la haute absorbance obtenue par certains phages en ELISA correspond bien à une haute affinité de ceux-ci.

Le test ELISA lui même peut être amélioré. Les absorbances observées lors de ce test sont relativement faibles. Ceci est tout à fait normal puisque face à la masse protéique des phages la représentation antigénique est très faible (Maximum 5 exemplaires par phages), de plus l'orientation des phages lors de l'adsorption n'étant pas contrôlée, il est probable que de nombreux épitopes soient masqués. L'utilisation de notre Ac polyclonal pour la fixation des phages pourrait peut être optimiser l'orientation des phages et donc leur accessibilité. Une augmentation du signal pourrait également être obtenue grâce à l'utilisation d'une méthode de révélation induisant une amplification de celui-ci. Le complexe avidine-biotine amplifie le signal grâce aux caractéristiques de l'avidine. La biotine couplée à la peroxydase ou tout autre système de révélation, peut se fixer à quatre reprises sur une molécule d'avidine permettant une augmentation du signal du même ordre.

Des modifications au niveau du système d'expression pourraient également être envisagées. Un système d'expression utilisant la protéine pVIII (type 8 ou 8+8) devrait améliorer les tests de détection car la représentation antigénique est beaucoup plus importante. Les problèmes d'orientation seraient également éliminés puisque la protéine pVIII est présente sur toute la surface du phage.

# Conclusions et perspectives



## F. Conclusions et perspectives

Nous avons criblé une banque d'hexapeptides aléatoires sur phage, tout d'abord avec la streptavidine ensuite avec un Ac monoclonal anti-LPS de *Brucella*, le 4F9. Dans cette banque, les peptides sont exprimés en fusion à une protéine d'enveloppe des phages de type fUSE 5, la protéine PIII. Dans les deux cas, nous avons pu mettre en évidence des séquences motifs. Celles-ci ont néanmoins peu de signification car l'échantillon étudié est de taille réduite et la répartition des aa dans les séquences est très hétérogène.

Les phages sélectionnés contre la streptavidine nous ont permis d'identifier la séquence L E R A R V. Lors du criblage contre l'Ac 4F9, la séquence motif reconnue était L L N L G R.

Nous avons également produit un Ac polyclonal, dirigé contre un phage de type fUSE 5, destiné à améliorer la méthode de détection des clones positifs (ELISA) et de permettre l'élaboration d'une méthode de titration aisée de nos phages.

Bien que nous n'ayons pu mettre en évidence de séquence consensus correspondant à l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal anti-LPS de *Brucella*, les résultats nous permettent de penser qu'après certaines mises au point, tant au niveau de la sélection des phages qu'au niveau de l'analyse des séquences, il sera possible d'identifier ce mimotope avec précision. Les peptides sélectionnés devront subir des tests de fixation avec l'anticorps 4F9 pour déterminer leur réelle antigénicité et spécificité. L'étude de ces interactions est à l'heure actuelle facilitée par des techniques telles que l'analyse des interactions biospécifiques en temps réel ("Real-Time BIA") ou le RIA (Radio Immuno Assay). Des tests ELISA de compétition, entre les peptides et le LPS, pour la fixation de l'Ac sont également à envisager. L'analyse des interactions spécifiques (BIAcore) permet de détecter les interactions moléculaires et de les quantifier avec précision quand elles se produisent. Ce système se base sur la résonance plasmonique de surface (SPR)(Altschuh et al., 1992), un phénomène de mécanique quantique où sont détectés les changements de propriétés optiques à la surface d'un fin film métallique. La SPR est un phénomène de résonance entre les photons incidents et les électrons du film métallique. La résonance apparaît à un angle spécifique de la lumière incidente. A cet angle, de l'énergie est transférée aux électrons de la surface métallique, induisant une disparition de tout phénomène de réflexion. Cet angle de résonance dépend de l'indice de réfraction à proximité de la surface métallique dépendant lui-même de la concentration des masses à la



surface. Les biomolécules sont immobilisées sur une couche de dextran carboxylée fixée à la surface du film métallique. Lorsque des molécules se fixent ou se dissocient de cette surface, il y a modification proportionnelle de l'angle de résonance. Toutes ces modifications sont enregistrées et permettent de suivre la réaction en temps réel. Altschuh et al. ont déjà réalisé, par cette technique, l'étude de la fixation de peptides sur un anticorps monoclonal dirigé contre le virus de la mosaïque du tabac (Altschuh et al., 1992).

Lorsque la spécificité des peptides sera démontrée, il faudra passer à l'étude immunologique de ceux-ci, c'est-à-dire vérifier qu'il peuvent induire la production d'Ac. Certains auteurs ont mis en évidence la possibilité d'utiliser des phages recombinants directement comme antigène. Ces phages expriment un peptide étranger en fusion à une de leurs protéines d'enveloppe et sont utilisés en tant que "carrier". Greenwood et al. et par la suite Willis et al. ont introduit dans la protéine majeur des phages (PVIII) des peptides représentant les déterminants antigéniques majeurs d'une protéine du parasite de la malaria, *Plasmodium falciparum*. Ils ont étudié l'immunogénicité de ces phages et ont démontré que dans le modèle murin, ceux-ci induisent la production d'Ac, spécifiques des peptides insérés (Greenwood et al., 1991 et Willis et al., 1993). Des expériences identiques ont été menées par Minenkova et al. au sujet d'une protéine d'enveloppe (protéine Gag p17) du virus du SIDA (HIV-1). Ils ont démontré que les immunoglobulines induites par immunisation du lapin avec les phages recombinants réagissent bien avec la protéine d'enveloppe de 17 Kda du virus (Minenkova et al., 1993). Ceci montre que les phages peuvent être utilisés en tant que "carrier" et ouvrir des possibilités de production de vaccins peu onéreux. Néanmoins, Felici et al. travaillant sur la toxine de *Bordetella pertussis* ont montré que des phages recombinants sélectionnés sont capables de mimer des épitopes discontinus jusqu'au point de lier l'anticorps monoclonal correspondant, mais étaient incapables d'induire une production détectable d'anticorps spécifiques pour l'antigène original (Felici et al., 1993). De plus Greenwood et al. ont montré que pour être immunogènes, les phages recombinants doivent exprimer le peptide étranger au niveau de ses protéines d'enveloppes majeures (Greenwood et al., 1991). Sans doute les peptides exprimés en fusion à la protéine PIII sont ils trop faiblement représentés que pour induire une réponse immunitaire.

Nous devons donc peut-être nous tourner vers la synthèse peptidique, le couplage à différents "carrier" et l'utilisation d'adjuvants. Les "carrier" et les adjuvants sont essentiels pour assurer une efficacité maximale des peptides synthétiques en utilisation vaccinale. Les adjuvants sont des substances qui, injectées simultanément à l'antigène,



augmentent la réponse immunitaire. Ils permettent d'éviter la dispersion de l'antigène et activent les macrophages. Le seul adjuvant approuvé en utilisation humaine est composé d'aluminium. En utilisation animale, le plus couramment employé est l'adjuvant complet de Freund's (CFA). Il consiste en une émulsion (eau-huile) contenant des mycobactéries tuées. Dans la plupart des cas, les peptides synthétiques comportent entre 10 et 15 résidus et ne sont pas en eux-mêmes immunogènes même si ils sont administrés avec le bon adjuvant. Dès lors il faut les coupler avec des carriers macromoléculaires tels que protéines, érythrocytes et lysosomes (Arnon and van Regenmortel, 1992).

Les recherches visant à optimiser les systèmes d'expressions phagiens se font de plus en plus nombreuses. Quelques Ac ont permis l'isolement de séquences où le motif de fixation est entouré de deux résidus cystéine. Les peptides ainsi exprimés adoptent une conformation en boucle par formation de ponts disulfures. Les contraintes conformationnelles imposées par cette cyclisation peuvent augmenter l'affinité de certaines interactions peptides-anticorps (Saragovi et al., 1992). Kay et al. ont étudié le rôle possible des ponts disulfures dans la fixation et ont montré que bien que l'affinité de la plupart des peptides est indépendante de la cyclisation, dans certains cas elle est fortement augmentée. L'un des peptides isolé, dirigé contre la streptavidine, a une affinité 100 fois moins importante lorsqu'il est mis en présence de DTT (agent réducteur empêchant la formation de ponts disulfure) (Kay et al., 1993). L'apparition de deux cystéines aux positions extrêmes des peptides aléatoires étant rare, certains auteurs créent des banques entières où les peptides sont entourés de régions invariables contenant des résidus cystéines. Luzzago et al. ont construit une banque de nonapeptides exprimés dans la protéine pVIII (type 8+8) et bordés de résidus cystéine. La cyclisation n'affecte cependant pas tous les peptides. Ils ont criblé leur banque avec l'Ac monoclonal H107 dirigé contre une sous unité de la ferritine humaine et ont mis en évidence la séquence consensus suivante : YDGSYRWAP (Luzzago et al., 1993). McLafferty et al. ont créé une banque de peptides sur phage, exprimant des peptides de 18 résidus en fusion à la protéine PIII. Chaque peptide comporte deux cystéines et 6 résidus aléatoires, 4 entre les cystéines et 2 de part et d'autre de celles-ci. Ils ont criblé leur banque avec la streptavidine et un Ac monoclonal dirigé contre la  $\beta$ -endorphine (3-E7). Les séquences consensus obtenues sont respectivement les suivantes : HPQ et CYGGFC. Ils ont détecté une diminution de fixation de 80% en présence de DDT montrant ainsi l'importance de la cyclisation dans la sélection de ces clones (McLafferty et al., 1993). La construction de banques plus complexes est également à l'étude. Pessi et al., ont synthétisé et caractérisé une protéine de 61 résidus disposés en feuillets  $\beta$  : le "minibody". Ils ont utilisé une portion du domaine variable de la chaîne lourde d'une immunoglobuline comme matrice.



Ce minibody contient deux boucles hypervariables H1 et H2. Ils ont également introduit un site de fixation au métal. En rendant aléatoires les deux boucles hypervariables, il est possible d'utiliser ces minibodys pour construire une banque de peptides aléatoires sur phage (Pessi et al., 1993).

Les techniques de criblage immunologique et les banques de peptides progressant de jours en jours, de plus en plus d'épitopes vont pouvoir être déterminés. De nombreuses potentialités nous sont donc offertes, tant au niveau du diagnostic que de la vaccination. Une approche très prometteuse pour la vaccination est l'utilisation simultanée de différents peptides. Ce système désigné MAP (multiple antigen peptide) a été introduit par Tam et Zavala en 1989. Le système est constitué d'une courte matrice immunologiquement inerte (résidus lysine) exposant les peptides (Tam and Zavala, 1989). L'avantage de ce système est que l'antigène est chimiquement défini et que la même macromolécule peu exposer soit plusieurs copies du même peptide soit plusieurs peptides différents (Arnon and Van Regenmortel, 1992). Gras-Masse et son équipe ont utilisé une approche semblable pour éviter le problème engendré par le troisième domaine hypervariable (V3) de la glycoprotéine de surface majeur (gp120) du virus HIV-1. Cette hypervariabilité est causée par la pression du système immunitaire sur ces organismes et empêche toute immunisation efficace. Pour tenter d'éliminer cette difficulté, ils ont synthétisé un peptide, appelé mixotope, contenant  $7,5 \times 10^5$  combinaisons peptidiques pour les régions hypervariables V3. Ils ont couplé ce mixotope à une protéine porteuse et l'ont injecté à des lapins. Les résultats se sont révélés très prometteurs puisque les Ac induits reconnaissent plusieurs types de régions V3 ainsi que la protéine gp120 (Gras-Masse et al., 1992). Dans le cas de la vaccination contre la brucellose, un des épitopes du LPS (4F9) pourrait être couplé à des épitopes de protéines externe de *brucella* pour assurer une protection optimale.



# Bibliographie

## G. Bibliographie

Alton G. G., Jonas L. M., Angus R. D. and Verger J. M. 1988.  
Techniques for brucellosis laboratory.  
INRA, Paris.

Altschuh D., Dubs M.C., Weiss E., Zeder-Lutz G. and Van Regemortel M.H. 1992.  
Determination of kinetic constants for the interaction between a monoclonal antibody and peptide using surface plasmon resonance.  
Biochemistry 31 : 6298-6304.

Anonyme, 1977.  
Brucellosis : a veterinarian's guide to the literature.  
Ministry of agriculture and fisheries . New Zealand.

Arnon R. and Van Regemortel H.V. 1992.  
Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines.  
J. FASEB, 6 : 3265-3274.

Bang B., 1897.  
The ethiology of epizootic abortion.  
J. Comp. Path., 10 : 125-149.

Bascoul S., Cannat A., Huguet M.F. and Serre A. 1978.  
Studies on the immune protection to murine experimental brucellosis conferred by *Brucella* fractions. Positive role of immune serum.  
Immunology, 35 : 213-221.

Brocard H. 1955.  
Les brucelloses.  
In "Maladies infectieuses" , Bastin R., Editions Flammarion, 1155-1219 .

Bruce D., 1887.  
Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever.  
Practitioner, 39 : 161-170.

Bundel D. R., Cherwonogrodsky J. W., Caroff M. and Perry M. B., 1987.  
The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*.  
Ann. Inst.Pasteur/Microbiol., 138:92-98.  
Carroff M., Bundel B. R., Perry M. B., Cherwonogrosky J. W. and Duncan J. R.  
1984.  
Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3.  
Infect immun , 46 : 384-388

Christian R.B., Zuccherman R.N., Kerr J.M. and Cesareni G. 1992.  
Simplified methods for construction, assessment and rapid screening of peptide libraries in bacteriophage.  
Mol. Biol., 227 : 711-718.

Cloekaert A., de Wergifosse P., Dubray G. and Limet J.N. 1990.  
Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies : immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked



immunosorbent assay.

Infect. Immun., 58 : 3980-3987.

Cloekaert A., Jacques I., Bosseray N., Limet J.N., Bowden R., Dubray G. and Plommet M. 1991.

Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer membrane proteins of *Brucella*.

J. Med. Microbiol., 34 : 175-180.

Cloekaert A., Jacques I., de Wergifosse P., Dubray G. and Limet J.N. 1992.

Protection against *Brucella melitensis* or *Brucella abortus* in mice with immunoglobulin G (IgG), IgA and IgM monoclonal antibodies specific for a common epitope shared by the *Brucella* A et M smooth lipopolysaccharides.

Infect. Immun., 60 : 312-315.

Cloekaert A., Zygmunt M.S., de Wergifosse P., Dubray G. and Limet J.N. 1992.

Demonstration of Peptidoglycan-Associated *Brucella* Outer Membrane Proteins by Use of Monoclonal Antibodies.

J. Gen. Microbiol., 138 : 1543-1550.

Comparison of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains.

Infect. Immun., 46 : 182-187.

Corbel M. J. 1985.

Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions.

Vet. Bull., 55 : 927-938.

Corbel M. J., Stuart F. A. and Brewer R. A. 1984.

Observations on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species of other genera.

Dev. Biol. Stand. 56 : 341-348.

Cwirla S.E., Peters E.A., Barrett R.W. and Dower W.J. 1990.

Peptides on phage : A vast library of peptides for identifying ligands.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 6378-6382.

Degraaf M.E., Miceli R.M., Mott J.E. and Fischer H.D. 1993.

Biochemical diversity in a phage library of random decapeptides.

Gene, 128 : 13-17.

Devlin J.J., Panganiban L.C. and Devlin P.E. 1990.

Random peptide libraries : A Source of Specific Protein Binding Molecules.

Science, 249 : 404-406.

Dewaele L. 1992.

Amélioration du diagnostic de la brucellose bovine.

Convention IRSIA 5387A.

Douglas J. T., Rosenberg E. Y., Nikaido H., Vertraete D.R. and Winter A.J. 1984.

Porins of *Brucella* species.

Infect. Immun., 44 : 16-21.

- Dower W.J. 1992.  
phage power.  
Current Biol., 2 : 251-253.
- Dubray G. 1972.  
Etude ultrastructurale des bactéries de colonies lisse (S) et rugueuse (R) du genre *Brucella*.  
Thèse de doctorat. Université de Paris Sud.
- Dubray G. 1987.  
Protective antigens in Brucellosis.  
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 138 : 84-86.
- Dubray G. and Bézard G. 1980.  
Isolation of three protective cell-wall antigens of *Brucella* in experimental brucellosis in mice.  
Ann Rech vet, 11 : 367-373.
- Dubray G. and Charriaut C., 1983.  
Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane.  
Ann. Rech. Vet., 14 : 311-318.
- Dubray G., 1981.  
Etude ultrastructurale et biochimique des enveloppes des bactéries du genre *Brucella*.  
Thèse de doctorat es-sciences, Université Paris-sud.
- Engvall E. and Perlmann P. 1971.  
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G.  
Immunochemistry, 8 : 871-874.
- Enright A. M. 1990.  
The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infections in domestic mammals.  
In "Animal Brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 301-320.
- Felici F., Luzzago A., Folgori A. and Cortese R. 1992.  
Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. II. Selection of clones recognised by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries.  
Gene, 128 : 21-27.
- Ficht T. A. 1990  
Pathogenesis of *Brucella*
- Frottier J. 1979.  
Les Brucelloses .  
Le concours médical , 37 : 5-39.
- Gale E. F., Cundliffe E., Reynolds P.E., Richmond M.H. and Waring M.J., 1981.  
The molecular basis of antibiotic action.  
Wiley Interscience Publication, 2<sup>nd</sup> Ed.
- Gamazo C. and Moryion I. 1987.  
Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis*



cells.

Infect. Immun., 55 : 609-615.

Garin-Bastuji B. 1993.

Brucellose bovine, ovine et caprine : contrôle et prévention.

Point Vét., 25 : 107-111.

Garin-Bastuji B., 1993.

Le dépistage de la Brucellose et ses difficultés. Le cas des sérologies atypiques en Brucellose bovine.

Le point vétérinaire, Vol.25 : 115-124.

Geysen H.M. 1985.

Antigens-antibody interactions at the molecular level : adventure in peptides synthesis.

Immunol. Today, 6 : 364-369.

Geysen H.M., Barteling S.J. and Meloen R.H. 1985.

Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein.

Immunol., 82 : 178-182.

Geysen H.M., Meloen R.H. and Barteling S.J. 1984.

Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid.

Geysen H.M., Rodda S.J. and Mason T.J. 1986.

The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes.

In "Synthetic Peptides as Antigens", Poter R. and Whelan J. (Eds) Pitman, London, Ciba Foundation symposium 119, 130-149.

Geysen H.M., Rodda S.J., Mason T.J., Tribbick G. and Schoofs P.G. 1987.

Strategies for epitope analysis using peptide synthesis.

J. Immunol. Meth., 102 : 259-274.

Gomez Miguel M.J., Moriyon I and Lopez J. 1986.

An enzyme immunoassay for bovine brucellosis using a monoclonal antibody specific for field strains of *Brucella abortus*.

Third international Symposium on Brucellosis, Algiers, april 1993, 18-20, page 491, editeur : Karger S.

Gras-Mosse H., Ameisen J.C., Boutillon C., Rouaix F., Bossus M., Deprez B., Neyrinck J.L., Capron A. and Tartar A. 1992.

Synthetic vaccines and HIV-1 hypervariability : A "Mixotope" approach.

Gray C.W., Brown R.S. and Marvin D.A. 1981.

Adsorption complexe of filamentous Fd virus.

Mol. Biol., 146 : 621-627.

Greenwood J., Willis A.E. and Perham R.N. 1991.

Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite proteins as antigens.

Mol. Biol., 220 : 821-827.

- Grimont F. et al. 1992.  
Molecular typing with cloned DNA probes.  
Ann Inst. Pasteur/Microbiol., 143 : 55-65.
- Hoess R., Brinkmann U., Handel T. and Pastan I. 1993.  
Identification of a peptide which bind to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3.  
Gene, 128 : 43\_49.
- Hopp T.P. and Woods K.R. 1983.  
A computer program for predicting protein antigenic determinants.  
Mol. Immunol., 20 : 483-489.
- Horrocks W . H . , 1905.  
Preliminary note on goats as a means of propagation of mediterranean fever .  
In "Reports Med Fever Commission ", Part 3, Harrison and sons (Ed.),St Martins  
Lowe, London , 84-90.
- Horsfall A.C., Hay F.C., Soltys A.J. and Jones M.G. 1991.  
Epitope mapping.  
Immunol. Today, 12 : 211-213.
- In "Advances in Brucellosis research", Adams L. G., Texas, A & M, University Press :  
77-88.
- Ito T. and Yokota. 1988.  
Monoclonal antibodies to *Vibrio cholerae* OI serotype.  
Inaba. J. Clin. Microbiol., 26 : 2367-2370.
- Jacques I., Cloeckart A., Limet J.N. and Dubray G. 1992.  
Protection conferred on mice by combination of monoclonal antibodies directed against  
*Brucella* outer membrane proteins or smooth LPS.  
J. Med./Microbiol., accepté pour publication.
- Jones L. M. and Berman D. T., 1976.  
The role of living vaccines in prophylaxis.  
Dev. Biol. Stand, 31 : 328-334 .
- Jones L.M., Diaz R. and Taylor A.G. 1973.  
Characterisation of allergenes prepared from smooth and rough strains of *Brucella*  
*melitensis*.  
Br. J. Exp. Pathol., 54 : 492-508.
- Karplus P.A and Schultz G.E 1985.  
Prediction of chain flexibility in proteins  
Naturwissenschaften 72 ; 212.
- Karplus P.A. and Schultz G.E. 1985.  
Prediction of chain flexibility in proteins.  
Naturwissenschaften, 72 : 212.
- Kay B.K., Adey N.B., He Y.S., Manfredi J.P., Mataragnon A.H. and Fowekes D.M.  
1993.  
An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel



sequences with affinity to selected targets.  
*Gene*, 128 : 59-65.

Krieg N. R. and Holt J. G. 1984.  
*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1.  
Williams & Wilkins Éd. Baltimore, USA.

Lam K.S., Salmon S.E., Mersh E.M., Hruby V.J., Kazmiersky W.M. and Knapp R.J. 1991.  
A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity.  
*Nature*, 354 : 82-84.

Lane D.P. and Stephen C.W. 1993.  
Epitope mapping using bacteriophage peptide libraries.  
*Current Opinion in Immunology*, 5 : 268-271.

Leinikki P., Lethinen M., Hyöty H., Pakkonen P., Kantanen M.L. and Hakulinen J. 1993.  
Synthétique peptides as diagnostic tools in virology.  
*Advances in virus research*, 42 : 149-186.

Limet J.N., Bosseray B., Garin-Bastuji G., Dubray G. and Plommet M. 1989.  
Humoral immunity in mice mediated by monoclonal antibodies against the A and M antigens of *Brucella*.  
*J. Med. Microbiol.*, 30 : 37-43.

Lin J., Adams L.G. and Ficht T.A. 1992.  
Characterisation of the heat shock response in *B. abortus* and isolation of genes encoding the GroE heat shock proteins.  
*Infect. Immun.*, 60 : 2425-2431.

Lowman H.B., Bass S.H., Simpson N., Wells J.A. 1990.  
Selecting high affinity bindings proteins by monovalent phage display.  
*Biochem.*, 30 : 10832-10838.

Luzzago A., Felici F., Tramontano A., Pessi A. and Cortese R. 1993.  
Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. I. Epitope mapping of human ferritin using a phage library of constrained peptides.  
*Gene* 128 : 51-57.

Mac Millan A. 1990.  
Conventional serological tests.  
In "Animal Brucellosis", Nielsen K. and Duncan J. CRC Press : 153-197.

Makowski L. 1993.  
Structural Constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages.  
*Gene*, 128 : 5-11.

Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. 1989.  
*Molecular cloning, a laboratory manual*.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Ed.

Martin N.C. and Horrocks R.E.W. 1990.  
Membrane fonctions of gram-negative bacteria.

- Marvin D.A. and Hohn B. 1969.  
Filamentous bacterial viruses.  
Bacteriol. Rev., 33 : 172-209.
- Mayfield J.E. 1990.  
Detection of *Brucella* cells and cell components.  
In "Animal Brucellosis", Nielsen K. and Duncan J. CRC Press : 97-120
- Mazaré Y., 1971.  
Les brucelloses.  
In "Maladies infectieuses", Bastin R., Ed. Flammarion, 698-738.
- Mazur B.J. and Zinder N.D. 1975.  
The role of gene V in f1 single strand synthesis.  
Virology 68 : 490.
- Mc Lafferty M.A., Kent R.B., Ladner R.C. and Markland W. 1993.  
M13 bacteriophage displaying disulfide-constrained mucoproteins.  
Gene, 128 : 29-36.
- Meickle P. J., Perry M. P., Cherwonogrodsky J. W., and Bundel D. 1989.  
Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars.  
Infect. Immun., 57 : 2820-2828
- Merrifield R.B. 1963.  
Solid phase peptides synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide.  
J. Am. Chem. Soc., 85 : 2149-2154.
- Meyer T.F., Geider K., Kurz C., Schaller 1979.  
Cleavage site of bacteriophage fd gene II protein in the origin of viral strand replication .  
Nature 278 : 365.
- Minenkova O.O., Ilyichev A.A., Kischenko G.P. and Petrenko V.A. 1993.  
Design of specific immunogens using filamentous phages as the carrier.  
Gene, 128 : 85-88.
- Model P., McGill C., Mazur B. and Fulford W.D. 1982.  
The replication of bacteriophage f1 : gene V protein regulate the synthesis of gene II-protein.  
Cell 29 : 329.
- Moriyon I. 1987.  
Properties of the outer membrane of *Brucella*.  
2nd Forum in Microbiology. Ann Inst. Pasteur/Microbiology, 138 : 69-144.
- Moriyon I. and Berman D.T. 1983.  
Isolation, purification and partial characterisation of *Brucella abortus* matrix proteins.  
Infect. Immun., 39 : 394-402.
- Moriyon I., Gamazo C. and Diaz R. 1987.  
Properties of the outer membrane of *Brucella*.  
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 138 : 89-91.



- Nicoletti P. 1990.  
Vaccination.  
In "Animal brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 283-296.
- Parmley S.F. and Smith G.P. 1988.  
Antibody-selectable filamentous fd phage vectors : affinity purification of target genes.  
Elsevier Science Publishers, gene, 73 : 305-318.
- Perry M. B. and Bundel D.R. 1990.  
Antigenic relationships of the lipopolysacchrides of *Echerichia hermanii* strains with those of *Echerichia coli* O157 : H7, *Brucella melitensis* and *Brucella abortus*.  
Infect. Immun., 58 : 1391-1395.
- Pessi A., Bianchi E., Cramer A., Venturini S., Tramontano A. and Sollazzo M. 1993.  
A designed metal-binding protein with a novel fold.  
Nature, 362 : 367-369.
- Phillips M., Pugh G. W. and Deyoe B.L. 1989.  
Chemical and protective properties of *Brucella* lipopolysaccharides obtained by butanol extraction.  
Am J. Vet. Res., 50 : 311-317.
- Plommet M. and Plommet, A.M. 1982.  
Immune serum-mediated effects in Brucellosis evolution in mice.  
Infect. Immun., 41 : 97-105.
- Roberts D., Guegler K. and Winter J. 1993.  
Antibody as a surrogate receptor in the screening of a phage display library.  
Gene, 128 : 67-69.
- Saha A.K., Mukhopadhyay N.K., Dowling J.N., Ficht T.A., Adams L.G. and Glew R.H. 1990.  
Characterisation of a phosphomonoesterase from *Brucella abortus*.  
Infect. Immun., 58 : 1153-1158.
- Sanger F., Nichlen S. and Coulson A.R. 1977.  
DNA sequencing with chain terminating inhibitor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 5463.
- Santos J. M., Verstraete D.R., Perera V.Y. and Winter A.J. 1984  
Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species.  
Infect Imm, 46 : 188-194.
- Saragovi H.V., Greeme M.I., Chrusciel R.A. and Kalim M. 1992.  
Loops and secondary structure mimetics : developement and applications in basic science and rational drug design.  
Biotechnology, 10 : 773-777.
- Scott J.K. 1992.  
Discovering peptide ligands using epitope libraries.  
Elsevier Science publishers, 241-245.

- Scott J.K. and Smith G.P. 1990.  
Searching for peptide ligands with an epitope library.  
*Science*, 249 : 386-390.
- Scott J.K., Loganathan D., Easley R.B., Gong X. and Goldstein I.J. 1992.  
A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library.  
*PNAS*, 89 : 5398-5402.
- Smith G.P. 1985.  
*Science* 228 : 1315
- Smith G.P. 1988.  
Filamentous phage assembly : morphogenetically defective mutants that do not kill the host.  
*Virology*, 167 : 156-165.
- Smith G.P. 1993.  
Surface display and peptide libraries.  
*Gene*, 128 : 1-2.
- Smith G.P. and Scott J.K. 1993.  
Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage.  
*Methods in enzymology*, 217 : 228-257.
- Smith G.P., Schultz D.A. and Ladbury J.E. 1993.  
A ribonuclease S-peptide antagonist discovered with a bacteriophage display library.  
*Gene*, 128 : 37-42.
- Sulitzeanu D. 1965.  
Mechanism of immunity against *Brucella*.  
*Nature*, 205 : 1086-1088.
- Tam J.P. and Zavala F. 1989.  
Multiple antigen peptides. A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays.  
*Immunol.Methods* 124 : 53-51.
- Verstraete D. R. and Winter A. J. 1984.  
Comparison of sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella*
- Verstraete D. R., Creasy, N. T., Caveney, N.T., Baldwin, C.L., Blab M.W., and Winter, A.J. 1982.  
Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and Characterisation.  
*Infect.Immun.*, 35 : 979-989
- Weber P.C., Pantoliano M.W. and Thompson L.D. 1992.  
Crystal structure and ligand studies of a screened peptide complexed with streptavidin.  
*Biochem.*, 31 : 9350-9354.
- Welling G.W., Weijer W.J., Van der Zee R. and Welling-Wester S. 1985.  
Prediction of sequential antigenic regions in proteins.  
*FEBS Letters*, 188 : 215-218.



- Willis A.E., Perham R.N. and Wraith D. 1993.  
Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage.  
*Gene*, 128 : 79-83.
- Wilson I.A., Niman H.L., Houghten R.A., Cherenon A.R., Connolly M.L. and Lerner R.A. 1984.  
The structure of an antigenic determinant in a protein.  
*Cell*, 37 : 767-778.
- Winter A.J., Rowe G.E., Duncan J.R., Eis M.J., Widom J., Ganem B. and Morein B. 1988.  
Effectiveness of natural and synthetic complexes of porin and a polysaccharide as vaccines against *Brucella abortus* in mice.  
*Infect. Immun.*, 56 : 2808-2817.
- Winter A.J. 1987.  
outer membrane proteins of *Brucella abortus*.
- World Health Organisation. 1993.  
WHO plans renewed attack on animal disease that threatens millions of people.  
Press Release WHO/68, 1-2.