



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Recherche d'un mimotope peptidique du lipopolysaccharide (LPS) de Brucella

Wéry, Maxime

Award date:
1997

[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
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**RECHERCHE D'UN MIMOTOPE PEPTIDIQUE DU
LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) DE *BRUCELLA***

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

Maxime WERY

Juin 1997

Recherche d'un mimotope peptidique du lipopolysaccharide (LPS) de *Brucella*

WERY Maxime

Résumé

Les tests sérologiques classiques utilisés pour le diagnostic de la brucellose bovine se basent sur la détection d'anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) de *Brucella*. Mais, du fait de la parenté antigénique entre le LPS de *Brucella* et celui de *Yersinia enterocolitica* O:9, des réactions sérologiques faussement positives (RSFP) sont régulièrement observées suite à une infection par *Y. enterocolitica* O:9. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une stratégie qui tente de contourner les problèmes de RSFP en recherchant un mimotope peptidique du LPS de *Brucella*, reconnu par un anticorps anti-LPS de *Brucella* mais pas par un anticorps anti-LPS de *Y. enterocolitica* O:9. L'approche suivie se base sur l'interaction spécifique entre deux peptides encodés par des séquences nucléotidiques complémentaires (peptides complémentaires). Nous avons donc conçu un adaptateur encodant les peptides complémentaires des trois régions hypervariables de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal A76-12G12, qui reconnaît spécifiquement le LPS de *Brucella*. Cet adaptateur a été inséré dans le gène recombinant de la protéine majeure d'enveloppe (pVIII) d'un vecteur phagien, dans le but de permettre la présentation des peptides complémentaires en surface de phages filamenteux.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1997

Promoteur: J.-J. Letesson

Liste des abréviations utilisées

AcMo	Anticorps Monoclonal
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumine
CDR	Complementarity Determining Region
DO	Densité optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetate
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GAM	Goat Anti-Mouse (anticorps de chèvre anti-souris)
Ig	Immunoglobuline
IPTG	Isopropyl-thio beta D thiogalactoside
LPS	Lipopolysaccharide
mg	milligramme
ml	millilitre
ng	nanogramme
nmole	nanomole
pb	paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Peptide Complémentaire
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
pmoles	picomole
RF	Forme Réplivative
rpm	Révolutions par minute
TBS	Tris Buffer Saline
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine
Tris	Hydroxyméthyl aminométhane
µg	microgramme
µl	microlitre
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

INSERT	Longueur	Sau 3A	Hpa I	Rsa I
PC CDR 1	369	369	369	186 183
PC CDR 2	374	374	216 158	374
PC CDR 3	362	186 176	362	362
PC CDR 1+2	419	419	216 203	237 182
PC CDR 1+3	407	221 186	407	225 182
PC CDR 2+3	413	227 186	255 158	413
PC CDR 1+2+3	458	272 186	255 203	276 182
f88-4-CYS6	390	390	390	390
f88-4-CYS4	384	384	384	384

"Remerciements"

A chanter sur l'air "Les copains d'abord", de Georges Brassens.

Des labos j'en ai vus beaucoup, mais le seul qu'y en valait le coup
Celui dans l'quel j'voulais rentrer, pour apprendre le métier
Il m'accueillit en pèr'peinard, c'est là qu'j'irais faire mon mémoire
Il s'appelait l'labo d'Immuno, labo d'Immuno.

A sa tête Mr Letesson, qu'est un promoteur d'exception
J'le vois encore v'nir me d'mander, "ton oligo est cloné?"
En deux ans d'cours il m'a r'filer, le virus du gars passionné
Par le monde bactérien riche de complexités.

Mes maîtres c'était Poos et Xavier, c'tait eux qu'allaient d'voir m'encadrer
M'expliquer comment cultiver, restreindre et cloner
C'est vrai qu'ils m'ont bien fait suer, mais c'était pour bien me former
Alors "disciple" je fus nommé, et je fus abusé (NDLA: c'est pour la rime,
bien entendu).

Quand t'as b'soin qu'on t'explique clairement, la fixation du complément
Il y a toujours Philippe et Vincent, deux êtres charmants (NDLA: c'est
pour la rime, à nouveau)
Ils connaissent les épitopes C, l'ELISA, les RSFP
Ils sont patients pour t'expliquer, en plus ils sont calés!

Des chercheurs et des doctorants, tu reçois moult encouragement
Quand tu doutes y en a toujours un pour te remettre dedans (NDLA: dans
le bain)
Franch'ment les gars vous êtes très bien, j'vous r'mercie pour votre
soutien
C'est vrai qu'au milieu du mois d'juin, ça faisait du bien.

Et quand tu descends du labo, t'arrive chez la bande à Pancho
Chez Jordy, Damien et le CRO, les "capulitos"
Toujours là pour te faire marrer, t'filer conseils et bonnes idées
Et surtout pour v'nir te squatter, tes gels fraîchement coulés (sans
rancune).

Que dire de mon pote de labo, avec qui on faisait les sots
Dès que les maîtres tournaient le dos, c'qu'on a ri, hein CRO?
Et puis toutes ces supers soirées, c'est le lendemain qu' s'était moins gai
Combien d'fois dans la hotte on a pas manqué de s'mettre à ronfler.

Enfin quand vient la rédaction, voilà qu'arrive le p'tit Nuttion
Qui nous amène la bouffe, c'est bon, allons, festoyons
Bert si tu n'avais pas été là, nous on se s'rait nourri de quoi
T'as amené café et coca, on avait b'soin d'ça.

Cette petite touche humoristique, c'est ma façon à moi de vous dire que je vous suis sincèrement reconnaissant pour tout ce que vous m'avez apporté durant ces cinq mois.

Et bien que je ne sois pas parvenu à les replacer dans le texte, je tiens encore à remercier Séverine, Marie, Caroline, Michel, Marie-Anne, Gersande, Frédéric, Jess et Jean-Baptiste pour leur amitié et la bonne humeur apportée durant ces quatre années partagées ensemble.

Merci aussi à Katalin pour son soutien depuis le Kenya.

Merci à ma mère et à ma grand-mère.

Merci à Steph, pour tout.

Table des matières

INTRODUCTION	1
<u>1. Problématique liée au diagnostic de la brucellose</u>	1
1.1. Les brucelloses	1
1.2. Le S-LPS de <i>Brucella</i>	1
1.3. Le diagnostic de la brucellose	3
1.4. Les réactions sérologiques faussement positives	4
<u>2. Immunoglobulines et épitopes B</u>	5
2.1. Structure des immunoglobulines	5
2.2. Caractéristiques des épitopes B	7
2.3. Détermination d'épitopes B	8
<u>3. Les phages filamenteux</u>	8
3.1. Cycle de réplication des phages filamenteux	9
3.2. Les protéines d'enveloppe pIII et pVIII	10
3.3. Les différents types de présentation en surface de phages	11
<u>4. Criblages de bibliothèques de peptides exprimés en surface de phages filamenteux</u>	12
4.1. Principe: le biopanning	12
4.2. Identification de mimotopes	12
4.2.1. Mimotopes d'épitopes	12
4.2.2. Mimotopes de ligands de protéines autres que des anticorps.	14
4.3. Intérêt des mimotopes	14
<u>5. Les peptides complémentaires</u>	14
5.1. Hydrophatie des acides aminés	14
5.2. Scores hydrophatiques des acides aminés encodés par des codons complémentaires	15
5.3. Importance de la seconde base des codons	16

5.4. La Théorie de la Reconnaissance Moléculaire	17
5.5. Similarité entre des protéines et le peptide complémentaire à leur récepteur	18
5.6. Système immunitaire et peptides complémentaires	19
5.7. Applications de la Théorie de la Reconnaissance Moléculaire	20
5.7.1. Purification et caractérisation de récepteurs et "binding proteins".	20
5.7.2. Elaboration de programmes informatiques en vue d'identifier des sites d'interactions entre protéines.	20
<u>6. But du mémoire</u>	22
RESULTATS ET DISCUSSION	23
<u>1. Clonage de l'ADNc codant pour les fragments Fab de l'AcMo 12G12</u>	24
1.1. Description des amorces nucléotidiques permettant d'amplifier par RT-PCR les ARNm encodant les fragments Fab d'un anticorps	24
1.2. Insertion dans un vecteur plasmidique et séquençage des segments d'ADN encodant les fragments Fab de l'AcMo 12G12	24
1.3. Analyse des différents clones H et L	26
<u>2. Séquençage des inserts nucléotidiques des clones L et H sélectionnés</u>	27
2.1. Séquences obtenues pour les inserts des clones L	27
2.2. Séquences obtenues pour les inserts des clones H	28
<u>3. Localisation précise des trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12</u>	28
3.1. Localisation par alignement de séquences	28
3.2. Localisation par analyse de la structure tridimensionnelle d'un anticorps similaire	29

<u>4. Conception d'un adaptateur encodant les peptides complémentaires aux trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12</u>	30
4.1. Détermination des séquences peptidiques complémentaires aux CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12	30
4.2. Conception d'un adaptateur encodant les peptides complémentaires aux CDR de la chaîne lourde de 12G12	32
<u>5. Insertion de l'adaptateur encodant les peptides complémentaires dans le génome d'un phage filamenteux</u>	35
5.1. Premières tentatives d'insertion	35
5.1.1. Description et préparation de la matrice.	35
5.1.2. Première tentative d'insertion	35
5.1.3. Seconde tentative d'insertion	37
5.1.4. Analyse des clones obtenus après transformation	37
5.1.5. Infections de la souche K91kan d' <i>E. coli</i> et PCR sur colonies.	38
5.1.6. Analyse et séquençage de l'insert nucléotidique porté par les phages	39
5.2. Troisième et quatrième tentatives d'insertion	41
<u>6. Infections et criblage des clones obtenus</u>	44
6.1. Infections et PCR sur colonies	44
6.2. Analyse de l'insert nucléotidique des phages par restrictions enzymatiques	46
<u>7. Production des phages pour quatre clones, tests fonctionnels et séquençage</u>	47
7.1. Production et quantification de quatre phages	47
7.2. Test ELISA	48
7.3. Immuno-empreintes sur colonies et dot blot	49
7.4. Séquençage de l'insert nucléotidique des quatre phages	49

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	51
MATERIEL ET METHODES	54
<u>1. Techniques relatives à l'ADN recombinant</u>	54
1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique	54
1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique	55
1.3. Extraction au phénol:	57
1.4. Précipitation de l'ADN.	58
1.5. Restriction d'ADN purifié:	58
1.6. Electrophorèse en gel d'agarose:	59
1.7. Insertion d'un oligonucléotide dans un vecteur	60
1.8. Transformation	62
1.8.1. Transformation par électroporation	62
1.8.1.1. Préparation de cellules électrocompétentes	62
1.8.1.2. Electroporation	63
1.8.2. Transformation par choc thermique	64
1.8.2.1. Préparation de cellules compétentes	64
1.8.2.2. Transformation par choc thermique	65
1.9. Infection	65
1.9.1. Préparation des phages	66
1.9.2. Préparation de "Terrific broth cells".	66
1.9.3. Infection de "Terrific broth cells"	67
1.10. Amplification par PCR sur colonies infectées	67
1.11. Séquençage de l'ADN	68
1.11.1. Préparation de l'ADN pour séquençage automatique	68
1.11.2. Séquençage manuel de l'ADN des phages	69
1.11.2.1. Réaction de séquençage.	70
1.11.2.2. Préparation et utilisation du gel d'électrophorèse.	71
<u>2. Production des phages</u>	72
2.1. Production des phages	72
2.2. Evaluation du nombre de particules virales	73

<u>3. Immuno-empreinte sur colonies et dot blot</u>	74
3.1. Dot blot	74
3.2. Immuno-empreinte sur colonies	75
<u>4. Test ELISA</u>	76

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

Liste des abréviations utilisées

AcMo	Anticorps Monoclonal
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumine
CDR	Complementarity Determining Region
DO	Densité optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetate
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GAM	Goat Anti-Mouse (anticorps de chèvre anti-souris)
Ig	Immunoglobuline
IPTG	Isopropyl-thio beta D thiogalactoside
LPS	Lipopolysaccharide
mg	milligramme
ml	millilitre
ng	nanogramme
nmole	nanomole
pb	paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Peptide Complémentaire
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
pmoles	picomole
RF	Forme Réplicative
rpm	Révolutions par minute
TBS	Tris Buffer Saline
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine
Tris	Hydroxyméthyl aminométhane
µg	microgramme
µl	microlitre
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

Introduction

1. Problématique liée au diagnostic de la brucellose

1.1. Les brucelloses

Les brucelloses sont des zoonoses mondialement répandues causées par des bactéries Gram négatives du genre *Brucella*, au sein duquel on reconnaît classiquement 6 espèces (*B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.neotomae*, *B.canis* et *B.ovis*). Cette classification repose essentiellement sur la spécificité d'hôte, précisée en laboratoire par le typage métabolique et sérologique (Alton *et al.*, 1988). Les brucelloses animales affectent entre autres les ruminants (Berche *et al.*, 1988). Elles se caractérisent par l'atteinte de l'appareil génital, provoquant des avortements chez les femelles et dans une moindre mesure des inflammations testiculaires chez les mâles, débouchant sur une stérilité. La transmission à l'homme survient au contact d'animaux d'élevages malades ou par ingestion d'aliments contaminés. La brucellose humaine est connue sous le nom de fièvre de Malte ou fièvre ondulante.

1.2. Le S-LPS de *Brucella*

Le lipopolysaccharide (LPS) est une molécule complexe insérée au sein de la membrane externe des bactéries Gram négatives. Il est composé de trois parties: le lipide A, le core et la chaîne O (Figure 1). Le lipide A constitue la portion hydrophobe du LPS et assure son ancrage dans la membrane. Le core, de composition oligosaccharidique, assure la jonction avec la chaîne O. Enfin, la chaîne O est formée d'unités mono- ou oligosaccharidiques répétées de nombreuses fois. Contrairement au lipide A et au core qui sont conservés chez une même famille de bactéries Gram négatives, la chaîne O est spécifique de l'espèce bactérienne; elle est nommée antigène O.

Chez les bactéries du genre *Brucella*, la majorité des espèces est naturellement "smooth" (lisses, car elles portent une chaîne O, on parle alors de S-LPS), à l'exception des espèces *B.canis* et *B.ovis* qui sont de type "rough" (rugueuses, car absence de chaîne O). La chaîne O est constituée de nombreuses répétitions d'un monomère de 4,6-dideoxy-4-formamido-D-mannopyranosyl (appelé également

LPS-S

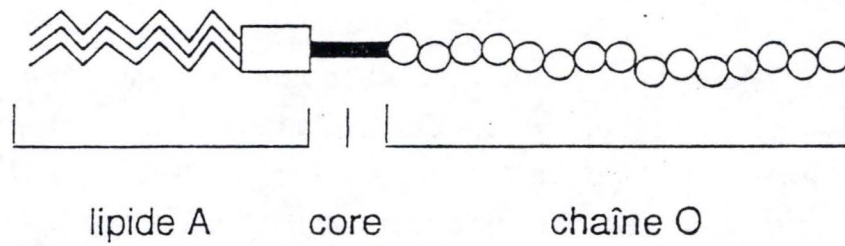


Figure 1:
Structure générale du lipopolysaccharide.

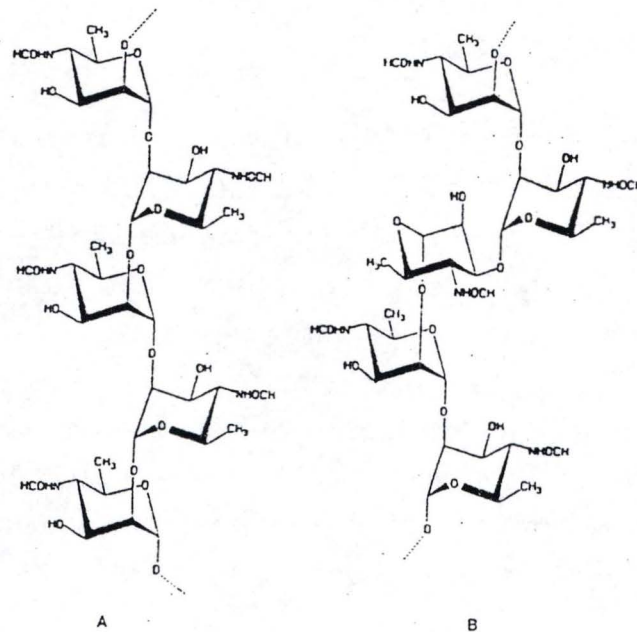


Figure 2:
Structure chimique hypothétique des épitopes A (A)
et M (B) du S-LPS de *Brucella*
(Bundle *et al.*, 1989).

perosamine). Cependant, les liaisons unissant les monomères peuvent être de 2 types: $\alpha 1,2$ ou $\alpha 1,3$.

Historiquement, sur base de leur réactivité différente avec des anticorps polyclonaux, deux types de S-LPS ont été identifiés chez *Brucella*: un S-LPS de type A et un S-LPS de type M. Cette classification a ensuite été confirmée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, permettant de définir un épitope A et un épitope M (Douglas and Palmer, 1988).

D'autres anticorps monoclonaux reconnaissant les deux types de LPS ont permis de définir deux épitopes supplémentaires sur le S-LPS de *Brucella*, les épitopes communs C/Y et C (Palmer and Douglas, 1989). Les anticorps monoclonaux de type C/Y reconnaissent les deux types de S-LPS de *Brucella* (le LPS de type M est toutefois reconnu dans une moindre mesure), et également le LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9. Les anticorps monoclonaux de type C quant à eux ne reconnaissent pas le LPS de *Y. enterocolitica* O:9. Pour cette raison, l'épitope C est appelé "épitope commun spécifique", tandis que l'épitope C/Y est appelé "épitope commun aspécifique".

L'utilisation de diverses techniques de chimie analytique a permis de proposer une structure hypothétique des épitopes A et M (Caroff *et al.*, 1984a; Bundle *et al.*, 1987). Par la suite, ces résultats ont été confortés par des expériences de reconnaissance d'oligosaccharides synthétiques par des anticorps monoclonaux A et M spécifiques (Bundle *et al.*, 1989). Ainsi, l'épitope A serait constitué d'une répétition de 5 monomères de perosamine reliés par les liens $\alpha 1,2$ (Figure 2A); la séquence $(\alpha 1,2)_2-\alpha 1,3-(\alpha 1,2)_2$ constituerait l'épitope M (Figure 2B). Il reste cependant des subtilités non élucidées, car il existe en effet des anticorps monoclonaux A spécifiques qui ne reconnaissent pas le LPS de *Y. enterocolitica* (qui est pourtant constitué de monomères de perosamine reliés uniquement par des liens $\alpha 1,2$). La structure des épitopes communs reste inconnue à ce jour. Toutefois, l'épitope C/Y doit être formé au maximum de quatre monomères de perosamine unis par des liaisons de type $\alpha 1,2$.

Enfin, selon l'abondance relative de liaisons $\alpha 1,3$, les biovars sont A ou M dominants. Par exemple, comme le biovar 1 de *B. abortus* possède 98% de liaisons de type $\alpha 1,2$ et 2% de type $\alpha 1,3$, l'épitope

A est majoritaire et cette souche est dite A dominante. Par contre, avec 75% de liaisons de type $\alpha 1,2$ et 25% de type $\alpha 1,3$, le biovar 1 de *B. melitensis* est dit M dominant.

1.3. Le diagnostic de la brucellose

Suite à l'infection par *Brucella*, la réponse sérologique est dirigée principalement contre la chaîne O du LPS. Tant chez l'homme que chez l'animal, le diagnostic de la brucellose est donc basé sur la détection d'anticorps spécifiques anti-LPS.

Pour exemple, parmi tous les tests sérologiques classiques, le test d'agglutination sur lame (Rose Bengale, test à l'antigène tamponné) met en évidence une agglutination due à des IgM anti-LPS qui réagissent très rapidement et très fortement avec des bactéries (*Brucella*) colorées (Alton *et al.*, 1988).

La réaction de fixation du complément montre quant à elle la présence d'IgG anti-LPS dans le sérum de l'individu testé par l'observation de la lyse de cellules indicatrices (globules rouges de mouton sensibilisés avec des anticorps anti-globules rouges) induite par les facteurs du complément (Alton *et al.*, 1988). Le sérum est tout d'abord mélangé avec des bactéries *Brucella* en suspension. Le complément puis les cellules indicatrices sont alors rajoutés. Lorsque le sérum de l'individu contient des anticorps dirigés contre le LPS de *Brucella* (individu positif), les complexes immuns générés consomment le complément et les cellules indicatrices ne sont pas lysées. Par contre, lorsque le sérum ne contient aucun anticorps anti-LPS (animal négatif), le complément est consommé par les cellules indicatrices sensibilisées qui alors sont lysées.

Ces deux tests sont considérés comme les plus sensibles des tests sérologiques classiques.

1.4. Les réactions sérologiques faussement positives

Du fait de la présence de LPS dans les vaccins couramment utilisés, les tests sérologiques conventionnels sont incapables de différencier un individu vacciné d'un individu infecté. De plus, ces mêmes tests manquent de spécificité et peuvent donner lieu à des réactions sérologiques faussement positives (RSFP).

Les RSFP sont dûes à la parenté antigénique entre le LPS de *Brucella* et celui d'autres microorganismes (Corbel, 1985), en particulier *Yersinia enterocolitica* O:9, dont la chaîne O du LPS est très proche de celle de *Brucella* (Caroff *et al.*, 1984b). En effet, la chaîne O du S-LPS de *Y. enterocolitica* O:9 est également formée de répétitions d'un monomère de perosamine avec la même substitution formamide en position 4, mais dans ce cas, les liens sont uniquement de type α 1,2. Lors d'un test diagnostique pour la brucellose, des anticorps produits suite à une infection par *Y. enterocolitica* O:9 pourront reconnaître le S-LPS des *Brucella* utilisées comme antigène diagnostique. Bien que n'ayant jamais été en contact avec *Brucella*, l'individu testé sera considéré comme positif pour la brucellose.

Une stratégie possible afin de contourner ce problème de réactivité croisée serait de baser le diagnostic sur des protéines de *Brucella*. Cependant, comparée au LPS, la réponse sérologique anti-protéine apparaît trop tardivement pour être utilisable dans le cadre du diagnostic sérologique de la brucellose (Letesson *et al.*, 1997).

Actuellement, des tests ELISA de compétition sont mis au point (Weynants *et al.*, 1996; Weynants *et al.*, 1997). En résumé, du S-LPS de *Brucella* est immobilisé au fond d'une plaque multipuits. Le sérum de l'individu à tester est ensuite mis en compétition pour le S-LPS avec un anticorps monoclonal de souris, par exemple, dirigé contre l'épitope C commun spécifique. La fixation de cet anticorps monoclonal est ensuite détectée par incubation en présence d'un anti-anticorps de souris couplé à une enzyme dont l'activité peut être mesurée. Si l'échantillon sanguin de l'individu ne contient aucun anticorps anti-LPS de *Brucella* (animal négatif), seul l'anticorps monoclonal peut se lier au LPS fixé au fond des

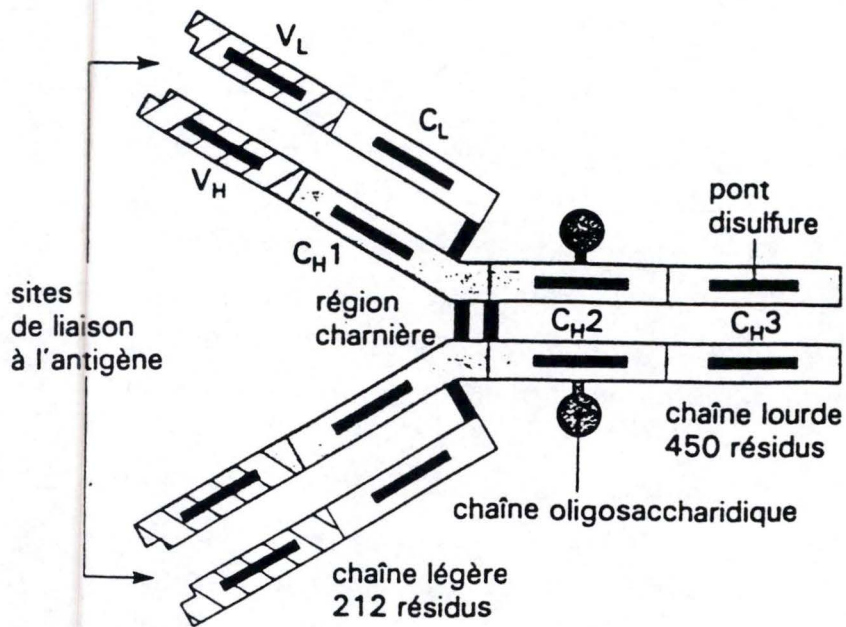


Figure 3:

Structure de base d'une immunoglobuline G. La chaîne lourde comporte trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3) et un domaine variable (VH). La chaîne légère comporte un seul domaine constant (CL) et un domaine variable (VL). Les ponts disulfures intra et intermoléculaires sont représentés par les rectangles noirs (Roitt *et al.*, 1994).

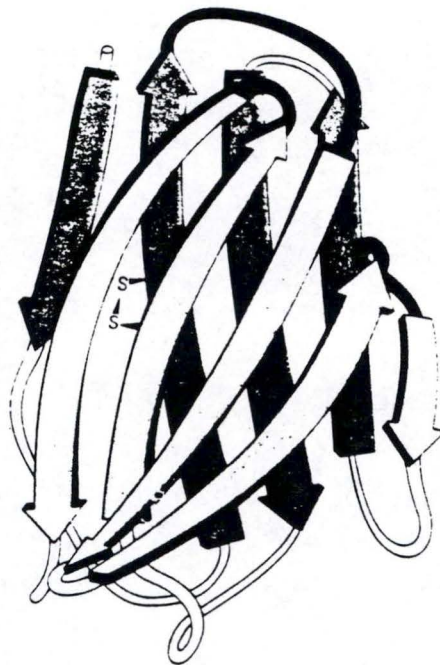


Figure 4:

Structure d'un domaine d'un anticorps. Les brins β antiparallèles forment deux feuillets. Les boucles noircies représentent les régions hypervariables. La structure est stabilisée par un pont disulfure (-S-S-) (Roitt *et al.*, 1994).

puits. Par contre, si l'échantillon sanguin contient des anticorps anti-LPS de *Brucella* (animal positif), ceux-ci entrent en compétition avec l'anticorps monoclonal, diminuant ainsi le signal observé dans le cas d'un animal négatif. Cependant il existe toujours des problèmes de RSFP dûs à *Y.enterocolitica* O:9. Il est possible en effet que les anticorps bovins anti-LPS de *Y.enterocolitica* O:9, qui se lient au S-LPS de *Brucella*, masquent et rendent inaccessible par encombrement stérique l'épitope C reconnu par l'anticorps monoclonal de souris (Weynants *et al.*, 1997).

Une autre approche serait d'isoler et de purifier l'épitope C spécifique du S-LPS de *Brucella*. Mais elle nécessiterait la culture et la manipulation à grande échelle de bactéries pathogènes. La synthèse chimique des sucres constituant cet épitope, bien que possible, serait tout aussi difficile à réaliser, et ce d'autant plus que sa structure reste à ce jour inconnue.

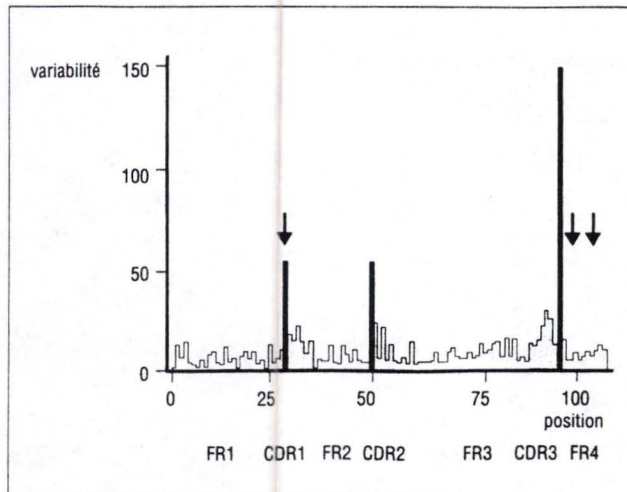
C'est pourquoi actuellement, une nouvelle approche tente d'identifier des molécules (des peptides, par exemple) capables de "mimer" les différents épitopes présents sur le S-LPS de *Brucella*. On parle dans ce cas de mimotopes. On pourrait alors baser le test diagnostique sur un mimotope qui serait reconnu par un anticorps anti-LPS *Brucella* et non reconnu par un anticorps anti-LPS *Y.enterocolitica* O:9. Ce mémoire s'inscrit directement dans le cadre de cette approche.

2. Immunoglobulines et épitopes B

2.1. Structure des immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines constituées de 2 chaînes lourdes (H, heavy) identiques et de 2 chaînes légères (L, light) également identiques entre elles (figure 3). Des ponts disulfures intra et intermoléculaires stabilisent la structure. Chez la plupart des mammifères, les Ig se répartissent en 5 classes distinguées par le type de chaîne lourde: μ , γ , α , ϵ , δ (Roitt *et al.*, 1994).

**Variabilité de séquences
de la région variable des chaînes légères**



Variabilité des chaînes lourdes

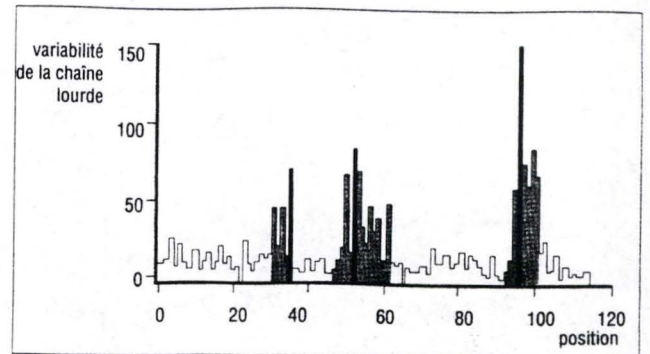


Figure 5:

Variabilité des séquences de la région variable des chaînes légères (A) et des chaînes lourdes (B). La variabilité est calculée en comparant les séquences de plusieurs chaînes. Pour chaque position elle est égale au nombre d'acides aminés différents trouvés à cette position, rapportés à la fréquence de l'acide aminé le plus rencontré.

Les trois zones de plus grande variabilité sont les régions hypervariables

(in Roitt *et al.*, 1994).

Structure tertiaire d'une chaîne légère

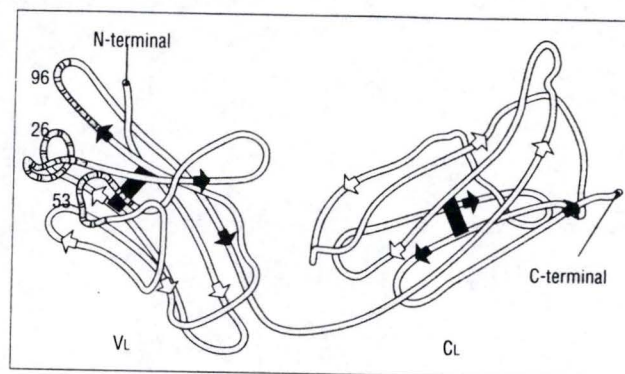


Figure 6:

Structure tertiaire d'une chaîne légère d'immunoglobuline. Les régions hypervariables sont portées par trois boucles reliant entre eux les brins β . Un résidu numéroté est représenté pour chaque région hypervariable. Les ponts disulfures sont représentés par les rectangles noircis

(Roitt *et al.*, 1994).

Les chaînes lourdes et légères sont subdivisées en domaines, formés principalement de 2 feuilletts β anti-parallèles stabilisés par un pont disulfure (Figure 4). La chaîne légère comporte un domaine constant (CL) et un domaine variable (VL). La chaîne lourde des IgG, IgA et IgD est constituée de 3 domaines constants (CH1, CH2, CH3) et d'un domaine variable (VH). La chaîne lourde des IgM et IgE comporte un domaine constant supplémentaire. Situés du côté NH_2 -terminal des chaînes, les domaines VL et VH présentent une variabilité plus marquée au niveau de leur séquence en acides aminés. C'est à ce niveau que se situe le site impliqué dans la reconnaissance de l'antigène (Roitt *et al.*, 1994).

La comparaison de la séquence en acides aminés d'un grand nombre de chaînes lourdes et légères montre que la variabilité des domaines VL et VH n'est pas répartie de façon homogène le long de ces régions. De courts segments, ont une variabilité très prononcée et sont appelés régions hypervariables (Figure 5). Les études par cristallographie aux rayons X ont démontré que ce sont les résidus des régions hypervariables des régions VL et VH qui se lient à l'antigène. Ces séquences déterminent donc directement le site de liaison de l'antigène et sont nommées CDR (Complementarity Determining Region). Chaque chaîne comporte trois CDR. Les acides aminés situés entre les CDR forment les régions FR (framework), et jouent un rôle important lors du repliement et dans la stabilité de la structure de la protéine.

Au niveau de la structure tertiaire, les CDR sont portés par trois boucles qui relient entre eux les brins β (Figure 6). Enfin, le repliement de la molécule en une structure quaternaire permet de rapprocher dans l'espace les 3 CDR de la chaîne lourde et les 3 CDR de la chaîne légère en vis-à-vis. L'ensemble constitue alors le paratope, c'est-à-dire la portion de l'anticorps qui établit la liaison avec la surface de l'antigène (Roitt *et al.*, 1994).

Au niveau génétique, les régions constantes et variables des chaînes lourdes et légères sont codées par des segments distincts d'un gène. En effet, pour la chaîne légère κ chez la souris, on retrouve 200 segments codant pour la région variable V_κ , 5 segments codant pour une région J et un segment codant pour la région constante C_κ qui détermine la classe κ de chaînes légères (il existe en réalité deux classes de chaînes légères: la classe κ et la

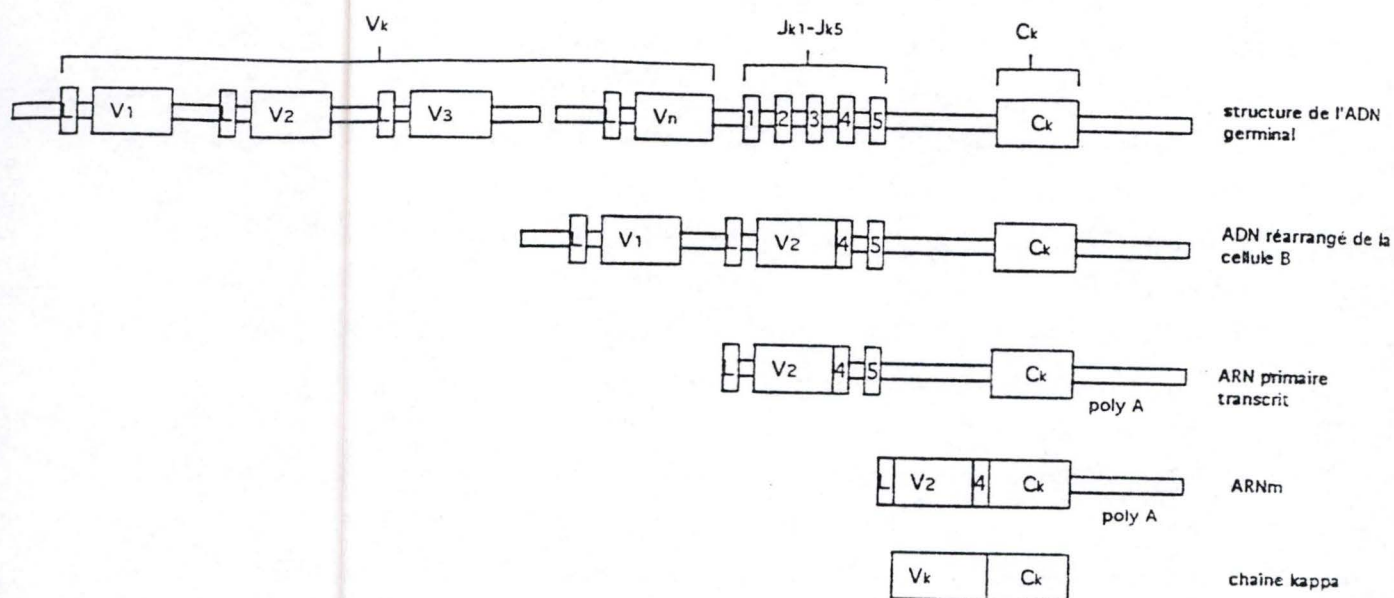


Figure 7:

Production d'une chaîne légère κ chez la souris. Au cours de la différenciation de la cellule pré-B, un des différents segments génétiques V_k et sa séquence signal (L) présent dans l'ADN germinal est recombinié à un des segments J. L'ARN primaire transcrit contient encore une longue séquence intercalée entre le fragment LV_kJ et le segment C_k . Cet ARN primaire est transformé en ARNm par la jonction du segment C_k au segment LV_kJ et est traduit par les ribosomes en chaîne légère κ .

Le réarrangement représenté n'est qu'une des combinaisons possibles

(d'après Roitt *et al.*, 1994).

classe λ). La formation d'une chaîne légère provient d'un réarrangement au niveau génomique d'un segment variable V donné avec un segment J donné. Ce segment VJ réarrangé est ensuite associé au segment $C\kappa$ (Figure 7). La chaîne lourde est également codée par des segments génétiques V, J et C. Il existe ainsi un segment de gène pour chacun des isotypes IgM, IgD, IgE et IgA, et également pour chacun des isotypes d'IgG. Tout comme la région variable $V\kappa$, la région variable VH est codée par un grand nombre de segments. Une diversité supplémentaire est apportée par un quatrième segment génétique, le segment D.

2.2. Caractéristiques des épitopes B

Classiquement, les épitopes ou déterminants antigéniques sont définis comme étant les portions des antigènes reconnues par les récepteurs des lymphocytes lors d'une réponse immunitaire. Il existe donc des épitopes T et des épitopes B, correspondant respectivement aux lymphocytes T et B. Un antigène peut avoir une mosaïque d'épitopes différents ou bien des épitopes répétitifs (Roitt *et al.*, 1994). Les anticorps sont spécifiques d'un épitope et non pas de l'ensemble de l'antigène.

Contrairement aux épitopes T qui sont exclusivement peptidiques, les épitopes B peuvent être de nature protéique, nucléique, lipidique, ou encore polysaccharidique. Suivant leur structure, les épitopes B protéiques peuvent être continus ou discontinus. Dans le premier cas, la région reconnue par l'anticorps se compose d'acides aminés qui se suivent directement dans la séquence primaire de la protéine. Dans le second cas, l'épitope se compose de résidus rendus proches lors du repliement de la protéine.

Généralement, les épitopes B d'une protéine native sont préférentiellement composés d'acides aminés hydrophiles, situés en surface de la molécule, en contact avec le solvant, et formant une structure proéminente plus accessible aux anticorps (Novotny *et al.*, 1987). Le paratope est d'apparence concave. La taille minimale d'un épitope conservant son activité antigénique (c'est-à-dire sa capacité à être reconnu par un anticorps) est d'au moins 5

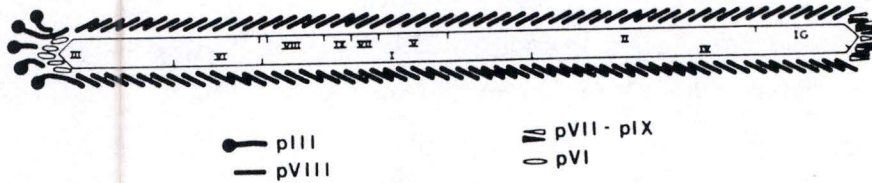
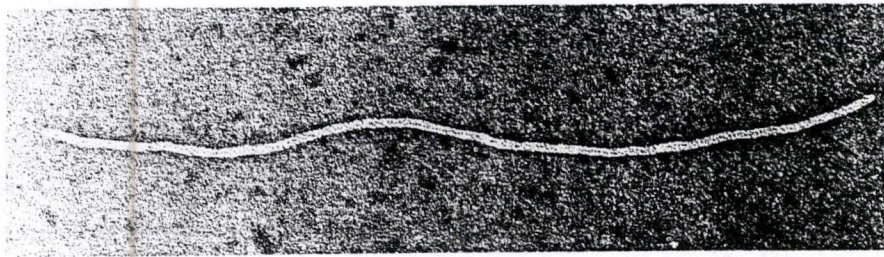


Figure 8:

Morphologie d'un phage filamenteux: micrographie électronique (haut) et représentation schématique (bas) montrant la localisation des différentes protéines d'enveloppe. L'ADN et l'emplacement des gènes sont également représentés. IG: grande région intergénique (Webster, 1996).

Gene	Amino acids ^a	Molecular weight ^a	Function
I	348	39,502	Assembly
II	410	46,137	DNA replication
III	406	42,522	Minor capsid protein
IV	405	43,476	Assembly
V	87	9,682	Binding ssDNA
VI	112	12,342	Minor capsid protein
VII	33	3,599	Minor capsid protein
VIII	50	5,235	Major capsid protein
IX	32	3,650	Minor capsid protein
X	111	12,672	DNA replication
XI	108	12,424	Assembly

^aThe number of amino acids and the molecular weight are for the mature proteins. The initiating methionine is included in proteins which do not contain an amino terminal signal sequence

Tableau 1:

Gènes et protéines des phages filamenteux f1. La fonction, le nombre d'acides aminés et le poids moléculaire des protéines matures sont indiqués (Webster, 1996).

résidus, permettant une force d'attraction suffisante entre paratope et épitope.

2.3. Détermination d'épitopes B

Plusieurs méthodes permettent la détermination d'épitopes B. Par exemple, l'analyse de séquences de protéines connues au moyen d'algorithmes prédictifs permet de caractériser des épitopes continus. Parmi les méthodes plus expérimentales, le pepscan nécessite la synthèse sur phase solide de peptides de tailles définies dont les séquences se chevauchent. L'ensemble de ces peptides représente la totalité de l'antigène. L'interaction de ces peptides avec un anticorps est alors testée. Cette méthode ne permet que l'identification d'épitopes continus et nécessite de plus une connaissance préalable de la séquence de l'antigène.

Depuis plusieurs années, l'exploitation des bibliothèques aléatoires de peptides a permis d'identifier de nombreux épitopes continus, discontinus, ainsi que des mimotopes de protéines et de carbohydrates. Par définition, un mimotope est une molécule capable de mimer une autre molécule dans une application donnée.

Le développement des bibliothèques de peptides s'est fait selon deux grandes approches (Gallop *et al.*, 1994). Tout d'abord, une approche chimique avec la synthèse et la production de mélanges de peptides présentés en surface de supports solides (billes de résine, coton, cellulose,...) ou libres en solution. Ensuite, une approche biologique où les peptides sont présentés par exemple en fusion avec des protéines de bactéries ou de phages filamenteux (Scott and Smith, 1990; Cwirla *et al.*, 1990; Delvin *et al.*, 1990). Dans ce dernier cas, une banque d'oligonucléotides aléatoires est générée. Ces oligonucléotides sont alors insérés dans le génome des phages en fusion avec le gène codant pour une protéine d'enveloppe.

3. Les phages filamenteux

Les bactériophages filamenteux sont des virus qui infectent uniquement les bactéries Gram négatives en se liant spécifiquement au sommet des pili (Rasched and Oberer, 1986; Webster, 1996). Morphologiquement, les phages filamenteux

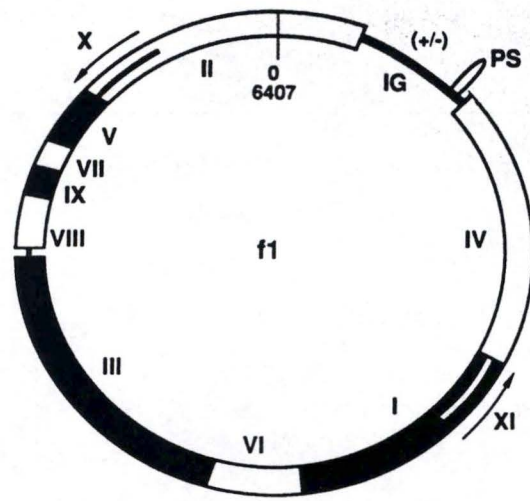


Figure 9:

Carte génétique des phages filamenteux f1. IG: grande région intergénique. PS: signal d'empaquetage. (+/-): position de l'origine de réplication du brin positif et du brin négatif. Les flèches indiquent les zones de superposition entre gènes (le gène X est se superpose au gène II, et le gène XI se superpose au gène I)
(Webster, 1996).

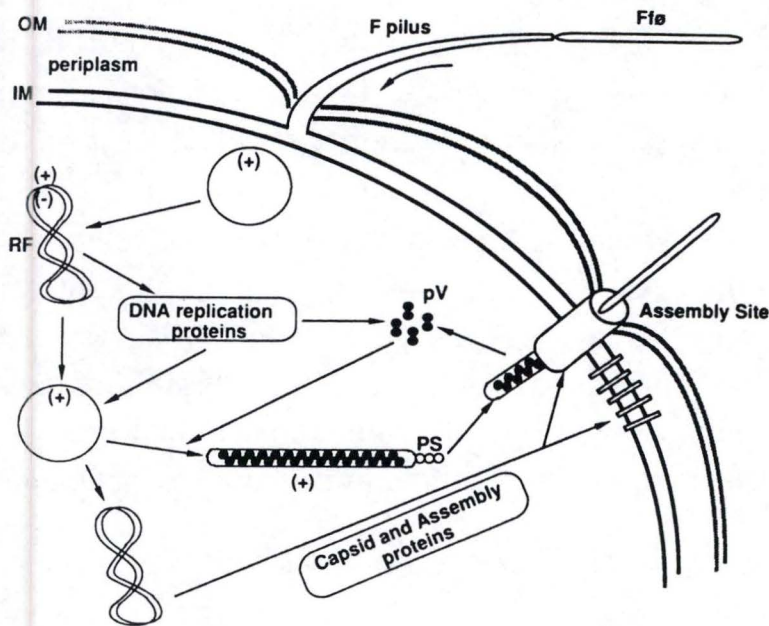


Figure 10:

Cycle de réplication d'un phage filamenteux Ff. OM et IM: membrane externe et interne de la bactérie hôte, respectivement. RF: forme répliquative. (+) et (-) représentent les brins positifs et négatifs. PS: signal d'empaquetage. pV: protéine pV
(Webster, 1996).

apparaissent comme de longues et fines particules à l'intérieur desquelles est confinée une molécule d'ADN simple brin circulaire (Figure 8).

Les phages de la classe Ff, comprenant les souches F1, Fd et M13, infectent *E.coli* via les pili sexuels. Leur génome est long d'environ 6400 nucléotides. Il renferme 9 phases de lecture codant pour 11 protéines (Tableau 1), ainsi que 2 régions intergéniques non codantes (Figure 9). L'origine de réplication du génome se situe dans la région intergénique la plus grande.

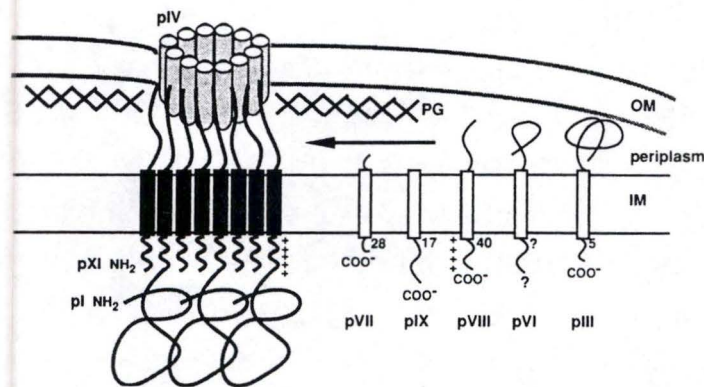
La protéine pVIII est le composant majeur de l'enveloppe phagienne (la protéine pVIII est aussi nommée protéine majeure d'enveloppe). Quatre protéines mineures, pIII, pVI, pVII et pIX, interviennent également dans la composition de l'enveloppe. Les protéines pI, pIV et pXI ne se retrouvent pas dans l'enveloppe mais sont indispensables à la morphogénèse et à l'assemblage du phage. Les protéines pII et pX interviennent lors de la réplication de l'ADN phagien. Enfin, la protéine pV interagit avec l'ADN phagien simple brin dans le cytoplasme de la bactérie infectée.

3.1. Cycle de réplication des phages filamenteux

Le cycle de réplication des phages filamenteux permet la formation de nouveaux virions et leur propagation hors de l'hôte sans entraîner la lyse de celui-ci (Figure 10).

Suite à la liaison de la protéine pIII à l'extrémité d'un pilus F d'*E.coli*, l'ADN monocaténaire positif du phage pénètre à l'intérieur de la bactérie hôte. Il est alors transformé en forme réplivative double brin, sans l'intervention des protéines phagiennes. Tout d'abord, une ARN polymérase de l'hôte synthétise une amorce au niveau de la grande région intergénique. Cette amorce est ensuite utilisée par une ADN polymérase bactérienne pour synthétiser le brin complémentaire négatif. Celui-ci servira de matrice pour la synthèse de nouveaux brins positifs et pour la transcription des gènes phagiens.

La protéine phagienne pII est indispensable pour la multiplication des formes réplivatives. En créant une coupure dans le brin positif de la forme réplivative, elle permet à la polymérase d'allonger ce brin par le mécanisme de "rolling circle" (la synthèse d'un nouveau brin déplace le brin synthétisé précédemment). Le brin



A schematic representation of the known topologies of the membrane-associated phage capsid and assembly proteins. The interactions between the pI, pIV, and pXI assembly proteins shown are based on the evidence cited in the text. The numbers on the cytoplasmic side of the inner membrane refer to the residue at the end of the membrane-spanning region for that protein. OM, outer membrane; IM, inner membrane; PG, peptidoglycan layer. The series of + symbols represents the positive side chains of the amphiphilic helices of pI, pXI, and pVIII adjacent to the cytoplasmic face of the inner membrane. The arrow represents the hypothetical movement of the capsid proteins into the site formed by pI, pXI, and pIV during assembly

Figure 11:

Localisation et organisation des protéines d'assemblage et de capsid d'un phage filamenteux en membrane d'une bactérie infectée. OM et IM: membrane externe et membrane interne de la bactérie. PG: peptidoglycane (Webster, 1996).

néosynthétisé se trouve ainsi à la suite du premier. La protéine pII sépare alors les deux brins. Le nouveau brin positif est transformé à son tour en forme réplivative.

Lorsque la protéine pV est en quantité suffisante (environ 800 exemplaires de dimères de pV par molécule d'ADN), elle se lie au monobrin positif et empêche sa transformation en forme réplivative (Webster *et al.*, 1996). Les complexes sont déplacés vers la membrane cytoplasmique. Selon un modèle toujours hypothétique, après le retrait de la protéine pV, les monobrins d'ADN s'assemblent avec les protéines d'enveloppe en traversant la membrane interne de la bactérie par des canaux formés par des monomères de pI et de pXI (Figure 11). Les nouveaux virions sont finalement extrudés via des canaux formés de 10 à 12 monomères de pIV traversant la membrane externe de l'hôte (Webster, 1996).

3.2. Les protéines d'enveloppe pIII et pVIII

La protéine d'enveloppe pIII est synthétisée sous forme de préprotéine, contenant une séquence signal de 18 résidus qui est clivée lors de l'insertion de la protéine en membrane de la bactérie (Webster, 1996). La protéine mature est longue de 406 acides aminés. Elle est présente en 5 exemplaires à une extrémité du phage. Son domaine N-terminal est responsable de l'attachement du phage sur le pilus F de la bactérie. Le domaine C-terminal assure l'ancrage de la protéine dans l'enveloppe et est indispensable pour la morphogénèse normale du phage, notamment en empêchant la formation de polyphage (Crissman and Smith, 1984). La protéine pIII tolère l'insertion d'un peptide étranger au niveau de son domaine N-terminal, par insertion d'un oligonucléotide dans son gène (Smith, 1985). Mais au-delà d'une certaine taille d'insert (environ 6 acides aminés), la fonction d'infectivité du phage médiée par la protéine pIII est abolie (Makowski, 1993). Néanmoins, la présence conjointe de ces copies non fonctionnelles de la pIII et de copies non recombinantes restaure l'infectivité du phage.

La protéine pVIII est la protéine majeure d'enveloppe. Elle est présente en 2700 exemplaires dans la particule phagienne non recombinante. Initialement, elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur avec un peptide signal de 23 acides aminés du côté N-terminal. La protéine mature est longue de 50 acides aminés. Du

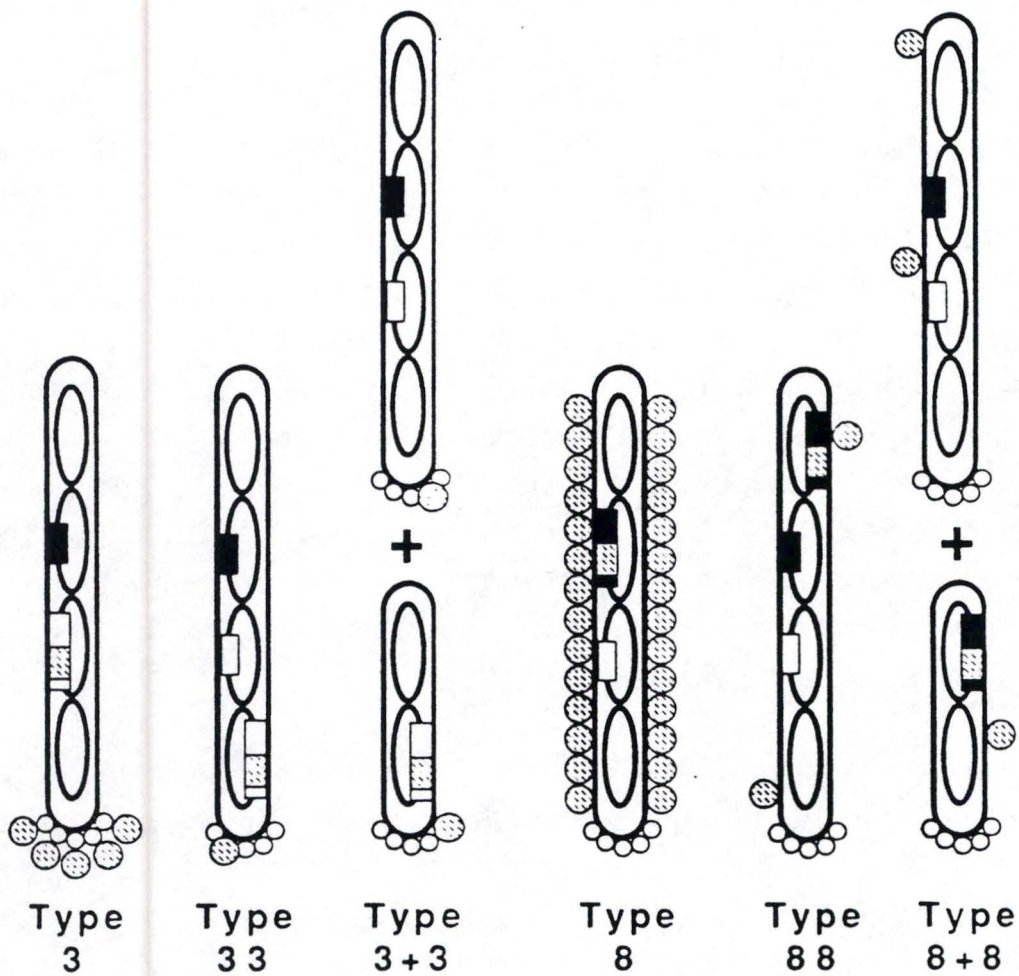


Figure 12:

Les différents types de présentations de peptides en surface de phages.
 Le gène de la protéine pIII et de la protéine pVIII sont représentés par les rectangles blancs et noirs, respectivement. L'insert et le peptide étrangers sont représentés par les rectangles et les cercles avec pointillés (Smith, 1993).

sixième résidu à son extrémité, elle a une structure en hélice α . Elle comprend trois portions: la portion N-terminale en contact avec le solvant (résidus 1 à 20), une courte portion centrale hydrophobe (21 à 28) et une hélice C-terminale amphipatique de 11 acides aminés qui interagit avec l'ADN (4 de ces 11 acides aminés sont d'ailleurs des lysines dont la charge positive pourrait interagir avec les charges négatives de l'ADN) (Rasched and Oberer, 1986). L'insertion de peptides étrangers est uniquement tolérée dans la portion N-terminale de la protéine mature.

3.3. Les différents types de présentation en surface de phages

En fonction de la protéine utilisée et des vecteurs d'expression, il est possible de distinguer différents types de présentations de peptides ou de polypeptides (Figure 12).

Les présentations de types 3 et 8 permettent l'insertion d'un peptide d'une taille maximale d'environ 6 acides aminés. Un fragment d'ADN étranger est inséré dans le gène d'une de ces protéines sans altérer la phase du cadre de lecture, et toutes les protéines exprimées sont recombinantes. Cependant, lorsque le peptide inséré est de trop grande taille (plus de six acides aminés), les fonctions des protéines sont altérées et il est nécessaire d'apporter des copies non mutées de ces protéines pour assurer ces fonctions. Ce sont les systèmes 33, 88, 3+3 et 8+8, décrits ci-dessous.

Pour les présentations de types 33 et 88, les phages sont modifiés de sorte que leur génome possède deux exemplaires de la pIII ou de la pVIII, respectivement. Une copie est intacte et apporte les protéines non recombinantes. L'autre copie porte l'insert nucléotidique d'intérêt. Les deux types de protéines sont insérées au niveau de l'enveloppe.

Dans le cas des présentations 3+3 et 8+8, le gène recombinant est porté par un phagemide. Un phagemide est un vecteur qui comporte une origine de réplication bactérienne, un gène de résistance à un antibiotique et une origine de réplication phagienne qui permet à ce vecteur d'être empaqueté sous forme simple brin par les protéines phagiennes apportées par un autre phage, nommé phage "helper". Le phagemide porte l'exemplaire modifié du gène codant pour la pIII ou la pVIII, et le phage helper apporte une copie

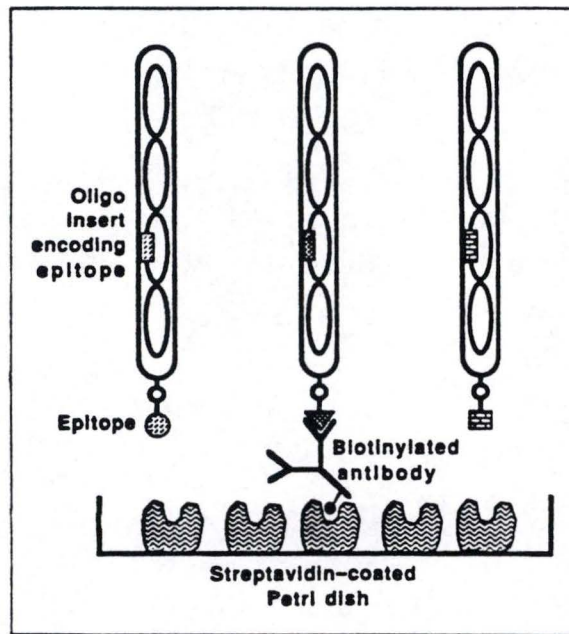


Figure 13:

Principe du biopanning. Les phages qui portent un peptide reconnu par une molécule sélectionnante biotinyllée sont récupérés par fixation sur la streptavidine immobilisée au fond d'une boîte de Petri (Scott, 1992).

non recombinante du gène de la protéine ainsi que tous les gènes et protéines nécessaires à l'emballage du phagemide. Lors de l'amplification, deux types de particules sont formées: phagemides et phages helpers. Les deux portent en membrane un mélange de protéines recombinantes et sauvages. Toutefois, il est possible de sélectionner uniquement le phagemide en utilisant un milieu qui contient l'antibiotique pour lequel le phagemide apporte un gène de résistance.

4. Criblages de bibliothèques de peptides exprimés en surface de phages filamenteux

4.1. Principe: le biopanning

La méthode du biopanning permet de sélectionner parmi une banque de phages ceux qui présentent un insert peptidique d'intérêt (Parmley and Smith, 1988) (Figure 13). Une molécule (en général un anticorps) permet la sélection d'un peptide qui mime le ligand naturel sur base de son interaction avec cette molécule sélectionnante.

Techniquement, l'emploi de molécules sélectionnantes biotinylées permet de récupérer facilement les complexes formés avec les phages, en les fixant sur de la streptavidine immobilisée au fond d'une boîte de Petri. Après élution, ces phages sont amplifiés puis soumis éventuellement à un nouveau cycle de biopanning. Enfin, le séquençage de l'insert nucléotidique permet de déduire la séquence peptidique qui a été reconnue par la molécule sélectionnante.

Le lien physique qui existe au sein du virion entre le peptide et l'ADN qui l'encode justifie tout l'intérêt de cette technique.

4.2. Identification de mimotopes

4.2.1. Mimotopes d'épitopes

De nombreuses équipes ont rapporté l'isolement de mimotopes peptidiques au moyen d'anticorps monoclonaux reconnaissant des

épitopes linéaires ou discontinus, voire même des épitopes non peptidiques.

Les premiers mimotopes peptidiques isolés grâce à des anticorps monoclonaux mimaient des épitopes linéaires (Scott and Smith, 1990; Cwirla *et al.*, 1990).

Depuis, des mimotopes d'épitopes discontinus ont été identifiés. Par exemple, l'équipe de Felici (1993) a identifié quatre peptides reconnus par un anticorps spécifique d'un épitope discontinu de la toxine de *Bordetella pertussis* (PTX). Ces quatre peptides entrent en compétition avec la PTX pour la fixation de l'anticorps (Felici *et al.*, 1993).

Dans certains cas, des séra humains plutôt que des anticorps monoclonaux ont été utilisés. Entre autres, des séra de patients atteints d'hépatite B ont permis d'isoler des peptides montrant deux séquences consensus. Injectés à des souris, les phages portant ces séquences induisent une forte production d'anticorps spécifiques de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (Folgori *et al.*, 1994). Ces peptides miment donc l'antigène naturel aussi bien du point de vue antigénique qu'immunogénique.

Des mimotopes de déterminants antigéniques saccharidiques ont également pu être déterminés. Par exemple, le peptide APWLYGPA est reconnu par un anticorps dirigé contre un oligosaccharide exprimé à la surface des cellules d'adénocarcinome, et il permet d'inhiber la fixation de l'anticorps sur son épitope naturel (Hoess *et al.*, 1993). De même, le peptide GMDGTQLDRW est reconnu par l'anticorps humain 2E9, dirigé contre le glucuronoxylomannane (GXM) de la capsule de *Cryptococcus neoformans* (Zhang *et al.*, 1997). Ce mimotope inhibe la liaison de l'anticorps 2E9 sur le GXM. Il est aussi capable d'inhiber la fixation sur le GXM des anticorps présents dans des séra d'humains immunisés avec le GXM couplé à la toxoïde tétanique.

Une étude réalisée avec des anticorps mono- et polyclonaux reconnaissant tous un même épitope du polysaccharide de la paroi cellulaire de *Streptococcus* (groupe A) indique que les carbohydrates et leurs mimotopes peptidiques ne sont pas reconnus selon le même mécanisme (Harris *et al.*, 1997). Ainsi, pour chaque anticorps, les peptides isolés présentent une séquence consensus particulière. De plus, ces peptides sont spécifiques de l'anticorps qui les a sélectionnés, puisqu'ils ne se lient qu'à celui-ci. La

réactivité des anticorps vis-à-vis des mimotopes peptidiques qu'ils permettent d'isoler semblent donc plus restreinte que pour leur épitope saccharidique naturel.

4.2.2. Mimotopes de ligands de protéines autres que des anticorps.

Pour exemple, des peptides contenant le motif His-Pro-Gln sont reconnus par la streptavidine et miment donc la biotine (Delvin *et al.*, 1990).

De même, les peptides qui contiennent la séquence consensus Tyr-Pro-Tyr miment les sucres reconnus par la concanavaleine A (Con A). Ils peuvent aussi empêcher la précipitation de l' α -glucane dextran 1335 par la Con A (Oldenburg *et al.*, 1992).

4.3. Intérêt des mimotopes

La recherche de nouveaux ligands pour des récepteurs et l'information structurale apportée par ces ligands peptidiques est d'un grand intérêt dans la conception de nouveaux agents pharmacologiques.

L'utilisation de séra immuns afin d'identifier des peptides qui se lient à des anticorps protecteurs est une approche potentiellement utile dans le développement de nouveaux vaccins. Cette approche est investiguée dans le développement de vaccins entièrement synthétiques contre la malaria ou contre le HIV par l'administration d'épitopes de lymphocytes B et T.

L'utilisation des peptides s'étend également aux tests de diagnostic en offrant un antigène chimiquement bien défini et en grande quantité permettant ainsi d'augmenter la sensibilité et la spécificité des tests.

5. Les peptides complémentaires

5.1 Hydropathie des acides aminés

Les propriétés physico-chimiques des acides aminés reposent sur les différences entre leur chaîne latérale. Ainsi, une des

Acide aminé	Score hydropathique
Isoleucine (I)	4,5
Valine (V)	4,2
Leucine (L)	3,8
Phénylalanine (F)	2,8
Cystéine (C)	2,5
Méthionine (M)	1,9
Alanine (A)	1,8
Glycine (G)	-0,4
Thréonine (T)	-0,7
Tryptophane (W)	-0,9
Sérine (S)	-0,8
Tyrosine (Y)	-1,3
Proline (P)	-1,6
Histidine (H)	-3,2
Glutamate (E)	-3,5
Glutamine (Q)	-3,5
Aspartate (D)	-3,5
Asparagine (N)	-3,5
Lysine (K)	-3,9
Arginine (R)	-4,5

Tableau 2:

Scores hydropathiques des acides aminés. Les acides aminés se répartissent en trois groupes hydropathiques: hydrophobes, hydrophiles et légèrement hydrophiles.

(d'après Kyte and Doolittle, 1982).

classifications les plus courantes des acides aminés repose sur leur hydropathie. Par exemple, les scores hydropathiques de Kyte et Doolittle reflètent leur caractère hydrophile ou hydrophobe (Kyte and Doolittle, 1982). Aux valeurs négatives correspondent les acides aminés hydrophiles, et inversement, les valeurs positives sont assignées aux résidus hydrophobes.

Sur cette base, de l'arginine (-4,5) à l'isoleucine (+4,5), les acides aminés peuvent être répartis en 3 groupes hydropathiques arbitraires (Tableau 2): de +4,5 à +1,8 pour les hydrophobes; de -4,5 à -3,2 pour les hydrophiles; de -1,6 à -0,4 pour les résidus qualifiés de légèrement hydrophiles.

5.2. Scores hydropathiques des acides aminés encodés par des codons complémentaires

La complémentarité des bases est une des principales caractéristiques du code génétique. Comme A est toujours apparié à T, et G à C, la séquence des bases sur un brin détermine la séquence des bases de l'autre brin; ces brins sont dits complémentaires.

Des constatations plus récentes sont venues s'ajouter à ce pilier de la génétique moléculaire. Quand un codon spécifie un acide aminé hydrophile, son codon complémentaire spécifie généralement un acide aminé hydrophobe, et vice versa (Blalock and Smith, 1984). Par exemple, le codon 5'-GUU-3' encode une valine (score: +4,2), et son codon complémentaire, 5'-CAA-3', encode une glutamine (score: -3,5). Pour un codon spécifiant un acide aminé légèrement hydrophile (selon la définition de Kyte et Doolittle, 1982), la tendance moyenne veut que son codon complémentaire spécifie un autre acide aminé légèrement hydrophile.

Une analyse plus détaillée montre que pour les 20 codons spécifiant des résidus hydrophobes, 13 des codons complémentaires encodent des acides aminés hydrophiles, 5 des acides aminés légèrement hydrophiles, et 2 seulement spécifient toujours des résidus hydrophobes (Tableau 3). Pour les codons des acides aminés hydrophiles, 13 des 18 codons complémentaires spécifient des résidus hydrophobes, les 5 autres encodent quant à eux des résidus légèrement hydrophiles (Tableau 4).

Dans le cas des acides aminés légèrement hydrophiles, 10 des 20 codons complémentaires possibles spécifient également des

Coding strand			Non-coding strand				
Codon	Amino acid	Hydropathic score	Codon	Amino acid	Hydropathic score		
					Individual	Average	Average change
AUA	Isoleucine	-4.5	UAU	Tyrosine	-1.3	-1.3	-5.8
GUU	Valine	-4.2	CAA	Glutamine	-3.5	-3.4	-7.6
GUC	Valine		CAG	Glutamine	-3.5		
GUG	Valine		CAC	Histidine	-3.2		
GUA	Valine		CAU	Histidine	-3.2		
UUA	Leucine	+3.7	AAU	Asparagine	-3.5	-3.5	-7.2
UUG	Leucine		AAC	Asparagine	-3.5		
CUU	Leucine		GAA	Glutamic acid	-3.5		
CUC	Leucine		GAG	Glutamic acid	-3.5		
CUA	Leucine		GAU	Aspartic acid	-3.5		
CUG	Leucine		GAC	Aspartic acid	-3.5		
UUU	Phenylalanine	+2.7	AAA	Lysine	-3.9	-3.9	-6.6
UUC	Phenylalanine		AAG	Lysine	-3.9		
UGU	Cysteine	+2.5	ACA	Threonine	-0.7	-0.7	-3.2
UGC	Cysteine		ACG	Threonine	-0.7		
AUG	Methionine	+1.9	UAC	Tyrosine	-1.3	-1.3	-3.2
GCU	Alanine	+1.8	CGA	Arginine	-4.5	-4.5	-6.3
GCC	Alanine		CGG	Arginine	-4.5		
GCA	Alanine		CGU	Arginine	-4.5		
GCG	Alanine		CGC	Arginine	-4.5		

Tableau 3:

Scores hydropathiques des acides aminés encodés par les codons complémentaires à ceux d'acides aminés hydrophobes (Blalock and Smith, 1984).

Coding strand			Non-coding strand				
Codon	Amino acid	Hydropathic score	Codon	Amino acid	Hydropathic score		
					Individual	Average	Average change
CGU	Arginine	-4.5	GCA	Alanine	+1.8	+0.9	+5.4
CGC	Arginine		GCG	Alanine	+1.8		
CGA	Arginine		GCU	Alanine	+1.8		
CGG	Arginine		GCC	Alanine	+1.8		
AGA	Arginine		UCU	Serine	-0.9		
AGG	Arginine		UCC	Serine	-0.9		
AAA	Lysine	-3.9	UUU	Phenylalanine	+2.7	+2.7	+6.6
AAG	Lysine		UUC	Phenylalanine	+2.7		
AAU	Asparagine	-3.5	UUA	Leucine	+3.7	+3.7	+7.2
AAC	Asparagine		UUG	Leucine	+3.7		
GAU	Aspartic acid	-3.5	CUA	Leucine	+3.7	+3.7	+7.2
GAC	Aspartic acid		CUG	Leucine	+3.7		
CAA	Glutamine	-3.5	GUU	Valine	+4.2	+4.2	+7.7
CAG	Glutamine		GUC	Valine	+4.2		
GAC	Glutamic acid	-3.5	CUG	Leucine	+3.7	+3.7	+7.2
GAA	Glutamic acid		CUU	Leucine	+3.7		
CAG	Histidine	-3.2	GUG	Valine	+4.2	+4.2	+7.4
CAU	Histidine		GUA	Valine	+4.2		

Tableau 4:

Scores hydropathiques des acides aminés encodés par les codons complémentaires à ceux d'acides aminés hydrophiles (Blalock and Smith, 1984).

Coding strand			Non-coding strand				
Codon	Amino acid	Hydropathic score	Codon	Amino acid	Hydropathic score		
					Individual	Average	Average change
GGU	Glycine	-0.4	CCA	Proline	-1.6	-1.6	-1.2
GGC	Glycine		CCG	Proline	-1.6		
GGA	Glycine		CCU	Proline	-1.6		
GGG	Glycine		CCC	Proline	-1.6		
ACC	Threonine	-0.7	UGG	Tryptophan	-0.9	-1.4	+2.1
ACG	Threonine		UGC	Cysteine	+2.5		
ACA	Threonine		UGU	Cysteine	+2.5		
UGG	Tryptophan	-0.9	ACC	Threonine	-0.7	-0.7	+0.2
UCU	Serine	-0.9	AGA	Arginine	-4.5	-2.1	-1.2
UCC	Serine		AGG	Arginine	-4.5		
UCA	Serine		AGU	Serine	-0.9		
UCG	Serine		AGC	Serine	-0.9		
AGU	Serine		UCA	Serine	-0.9		
AGC	Serine		UCG	Serine	-0.9		
UAU	Tyrosine	-1.3	AUA	Isoleucine	+4.5	-3.2	+4.5
UAC	Tyrosine		AUG	Methionine	+1.9		
CCU	Proline	-1.6	GGA	Glycine	-0.4	-0.4	-1.2
CCC	Proline		GGG	Glycine	-0.4		
CCA	Proline		GGU	Glycine	-0.4		
CCG	Proline		GGC	Glycine	-0.4		

Tableau 5:

Scores hydropathiques des acides aminés encodés par les codons complémentaires à ceux d'acides aminés légèrement hydrophiles (Blalock and Smith, 1984).

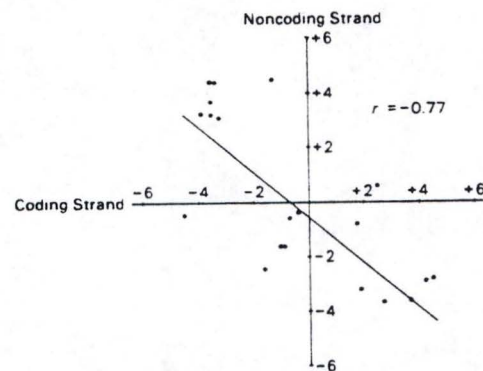


Figure 14:

Relation entre les scores hydropathiques des acides aminés encodés sur un brin et la moyenne des scores des acides aminés encodés sur le brin complémentaire. Le coefficient de corrélation r est de $-0,77$.

(Blalock and Smith, 1984).

5' CUU AUG CAG 3'

Prot. = N-Leu-Met-His-C

3' GAA UAC GUC 5'

Torp. 5'-3' = N-Leu-His-Lys-C (CUG CAU AAG)

Torp. 3'-5' = C-Glu-Tyr-Val-N (GAA UAC GUC)

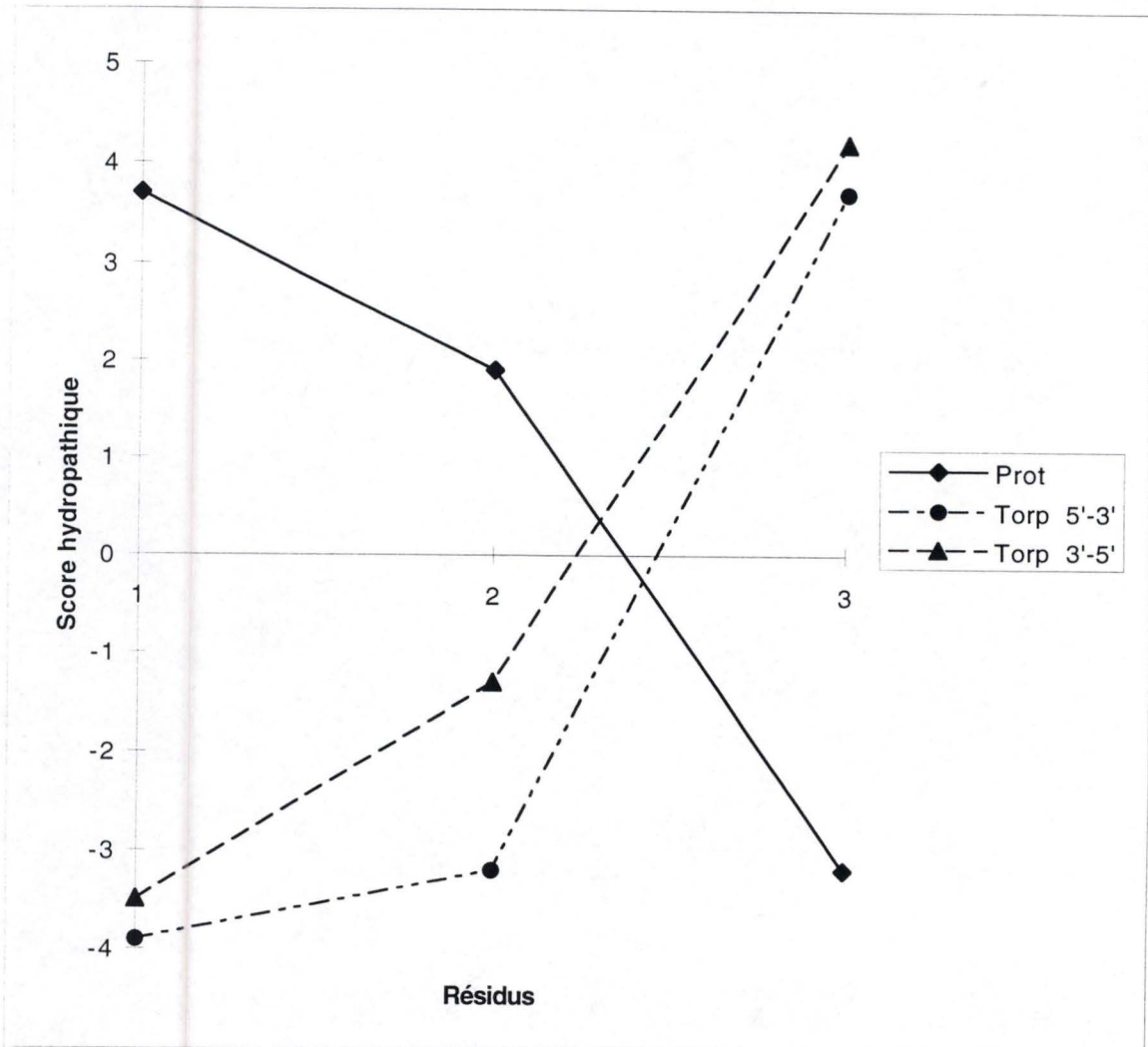


Figure 15:

Séquences et profils hydrophatiques de peptides encodés par deux ARN messagers complémentaires. "Torp": peptides complémentaires au peptide "Prot". "5'-3'" et "3'-5'" indiquent le sens de lecture de l'ARNm complémentaire. N et C représentent les extrémités N-terminale et C-terminale des peptides. L'inversion des profils hydrophatiques se produit quel que soit le sens de lecture du messenger complémentaire.

résidus légèrement hydrophiles . Les 10 codons complémentaires restants se répartissent de manière équivalente, à raison de 5 pour des résidus hydrophiles et 5 pour des résidus hydrophobes (Tableau 5).

La figure 14 montre la relation entre les scores hydropathiques des acides aminés encodés sur un brin et la moyenne des scores des acides aminés encodés sur le brin complémentaire. Une analyse par régression linéaire donne un coefficient de corrélation de -0,77. Un test de "t de Student" révèle une relation hautement significative entre les scores hydropathiques des produits de la traduction de deux brins complémentaires.

5.3. Importance de la seconde base des codons

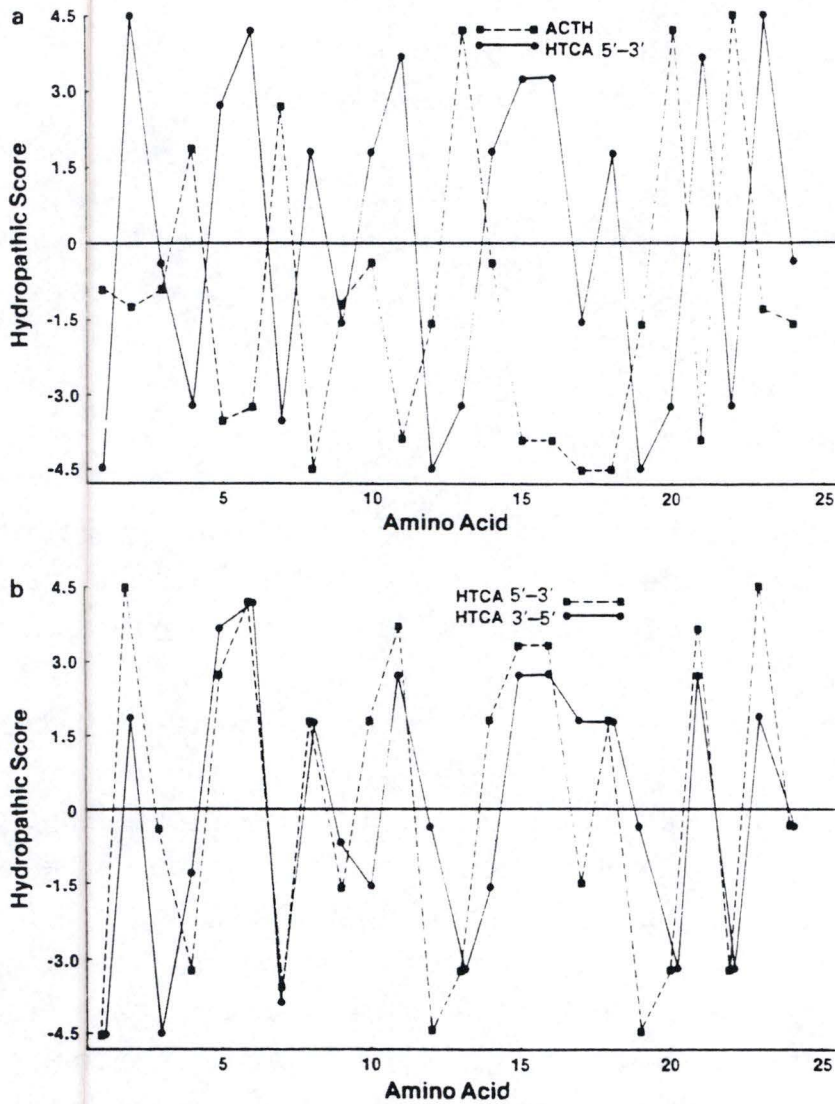
La traduction dans le sens 5'-3' de deux ARNm hypothétiques complémentaires donne donc deux peptides (appelés peptides complémentaires) qui présentent des profils hydropathiques opposés lorsque l'extrémité N-terminale de l'un est alignée avec l'extrémité C-terminale de l'autre. Un exemple simple est donné à la Figure 15.

L'inversion des profils hydropathiques se produit également lorsque les codons complémentaires sont lus dans le sens non conventionnel 3'-5' (Blalock and Bost,1986)(Figure 15). Ce phénomène semble lié à la seconde base des codons. Que les codons soient lus dans le sens 5'-3' ou 3'-5', la deuxième base reste en effet inchangée. De plus, la plupart des codons spécifiant des acides aminés hydrophiles possèdent de façon prépondérante un A en seconde position (6 acides aminés sur 7), alors que la base complémentaire U occupe la position centrale des codons pour 5 résidus hydrophobes sur 7.

A l'exception de la tyrosine, la seconde base pour les codons des 5 acides aminés légèrement hydrophiles est soit un G, soit un C. Par conséquent, leurs codons complémentaires spécifieront toujours des acides aminés légèrement hydrophiles, quel que soit le sens de lecture de ces codons.

ACTH Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Lys Lys Arg Arg Pro Val Lys Val Tyr Pro
 +RNA 5'-UCU UAC UCC AUG GAA CAC UUC CGC UGG GGC AAG CCG GUG GGC AAG AAG CGG CGC CCG GUG AAG GUG UAC CCC-3'
 -RNA 3'-AGA AUG AGG UAC CUU CUG AAG GCG ACC CCG UUC GGC CAC CCG UUC UUC GCC GCG GGC CAC UUC CAC AUG GGG-5'
 HTCA 5'-3' Gly Val His Leu His Arg Ala Pro Leu Leu Ala His Arg Leu Ala Pro Ala Glu Val Phe His Gly Val Arg
 HTCA 3'-5' Arg Met Arg Tyr Leu Val Lys Ala Thr Pro Phe Gly His Pro Phe Phe Ala Ala Gly His Phe His Met Gly

Amino acid sequence of a peptide (HTCA) encoded by RNA that is complementary to corticotropin ACTH-(1-24) mRNA. The sequences +RNA (which encodes ACTH) and -RNA (which encodes HTCA) are from Ref. 1.



Hydropathic profiles of ACTH and HTCA 5'-3'. Each amino acid residue was assigned a value according to the Kyte and Doolittle index⁵⁰. (a) Comparison of ACTH and HTCA 5'-3'. The two peptides are aligned antiparallel. (b) Comparison of HTCA 5'-3' and HTCA 3'-5'. The first amino acid corresponds to the carboxy terminus of HTCA 5'-3'.

Figure 16

- I. Séquences en acides aminés de l'ACTH et des deux peptides encodés par l'ARN messager complémentaire (ARN-) de celui de l'ACTH (ARN+), lu dans le sens 5'-3' (HTCA 5'-3') ou dans le sens 3'-5' (HTCA 3'-5').
- II. Comparaison des profils hydropathiques de l'ACTH et du peptide complémentaire HTCA 5'-3' (a). Profils hydropathiques des peptides HTCA 5'-3' et HTCA 3'-5' (b)
(Blalock, 1990).

5.4. La Théorie de la Reconnaissance Moléculaire

La Théorie de la Reconnaissance Moléculaire (TRM) prédit la reconnaissance et l'interaction entre des (poly)peptides encodés par des séquences nucléotidiques complémentaires. En effet, comme des peptides encodés par des messagers complémentaires présentent des profils hydrophatiques opposés, ils pourraient dès lors adopter des conformations complémentaires pouvant mener à une interaction spécifique (le profil hydrophatique d'une protéine constitue en effet le moteur principal du repliement tridimensionnel).

Le système prototype utilisé afin de valider cette théorie et de caractériser l'interaction entre deux peptides complémentaires étudiait le couple constitué de la corticotropine (ACTH) et d'un peptide synthétique (HTCA 5'-3'), encodé par l'ARN messager complémentaire à celui de l'ACTH (Figure 16). Les tests ont révélés une interaction spécifique, de haute affinité et saturable (Blalock, 1990). Des résultats similaires ont été obtenus avec un second peptide synthétique (HTCA 3'-5') encodé lui aussi par l'ARN messager complémentaire à celui de l'ACTH mais traduit cette fois dans le sens 3'-5' (Figure 16).

La TRM a été la cible de nombreuses critiques et interrogations. Tout d'abord, concernant l'interaction entre un acide aminé hydrophile et un acide aminé hydrophobe, contraire aux principes de physico-chimie les plus élémentaires. Toutefois, dans certains cas, de telles interactions seraient possibles et pourraient jouer un rôle dans la reconnaissance entre deux peptides complémentaires (Blalock, 1990). Par exemple, les acides aminés les plus hydrophiles, comme l'arginine et la lysine, possèdent un groupe chargé qui est maintenu à distance du squelette peptidique (formé par les liens peptidiques) par une chaîne apolaire, qui en milieu aqueux pourrait interagir avec les chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes.

Selon un second modèle, lors de l'interaction entre les deux peptides complémentaires, les résidus hydrophiles des deux chaînes sont orientés vers le solvant aqueux extérieur (Markus *et al.*, 1989). Cette orientation permettrait de libérer des espaces sous chaque résidu hydrophile, espaces dans lesquels les résidus

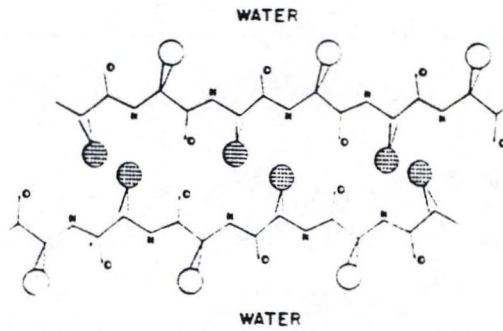


Figure 17:

Représentation schématique de l'interaction entre deux peptides complémentaires (alignement antiparallèle, c'est-à-dire que l'extrémité N-terminale de l'un est alignée avec l'extrémité C-terminale de l'autre). Les résidus hydrophiles sont représentés par des cercles vides; les résidus hydrophobes sont représentés par des cercles pleins (Markus *et al.*, 1989).

EPIDERMAL GROWTH FACTOR	EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR	COMPLEMENTARY MESSAGE TO EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR
10 15N SER TYR PRO GLY CYS PRO SER SER 16U AGU UAU CCA GGA UCC CCA UCC UCA	110 110 GLU LEU PRO MET ARG ASN LEU 111 GAG <u>CTG CCC ATG AGA AAT TTA</u>	110 110 LEU <u>ASP GLY TYR SER LEU ASN</u> 111 CUC <u>GAC CGG UAC UCU UUA AAU</u>
20 20N ASP GLY TYR CYS LEU ASN GLY GLY 21U <u>CAU GGA UAC UGC CUC AAU</u> GGU GGC	120 120 GLN GLU ILE LEU HIS GLY ALA VAL 121 CAG GAA ATC CTG CAT GGC GCC CTG	120 120 VAL LEU XXX ASP VAL PRO ARG HIS 121 GUC CUU UAG GAC GUA CCG CCG CAC
25 25N CYS MET HIS ILE <u>GLU SER LEU ASP</u> 26U <u>UGC AUG CAU AUU</u> <u>GAA UCA CUG GAC</u>	130 130 ARG PHE SER ASN ASN PRO ALA LEU 131 CGG TTC AGC AAC AAC CCT GCC CTG	130 130 ALA LYS SER LEU LEU GLY ARG ASP 131 GCC AAC UCC UUG UUG GGA CCG GAC
30 30N TYR THR CYS ASN CYS VAL ILE GLY 31U <u>ACC</u> <u>UAC</u> ACA UGC AAC UGU GUU AUU GGC	140 140 CYS ASN VAL GLU SER ILE GLN TRP 141 TGC AAC GTG GAG AGC ATC CAG TGG	140 140 THR LEU HIS LEU SER XXX VAL THR 141 ACC UUG CAC CUC UCG UAG GUC ACC
40 40N SER GLY ASP ARG CYS GLN THR ARG 41U UCU UGC CAU CCA UCU CAG ACU CGA	150 150 ARG ASP ILE VAL SER SER ASP PHE 151 CGG GAC ATA CTC ACC ACT GAC TTT	150 150 ALA LEU TYR GLN SER SER LEU IYS 151 GCC CUC UAU CAG UCG UCA CUG AAA
50 50N LEU ARG TRP TRP GLU LEU ARG 51U CUA CCA UGC UGC GAG CUC CGU	150 150 LEU SER ASN MET SER MET ASP 151 <u>CTC ACC AAC ATG TCC ATG GAC</u>	150 150 <u>GLU SER LEU TYR SER TYR LEU</u> 151 <u>GAG UCG UUG UAC ACC UAC</u> CUC

Tableau 6:

Séquences nucléotidiques et en acides aminés de l'EGF, d'une portion de son récepteur (résidus 110 à 150), et du peptide complémentaire à cette portion. Les segments homologues entre l'EGF et le peptide complémentaire à son récepteur sont encadrés; les régions de complémentarité entre l'EGF et son récepteur sont soulignées; XXX représente un "stop" (Bost *et al.*, 1985).

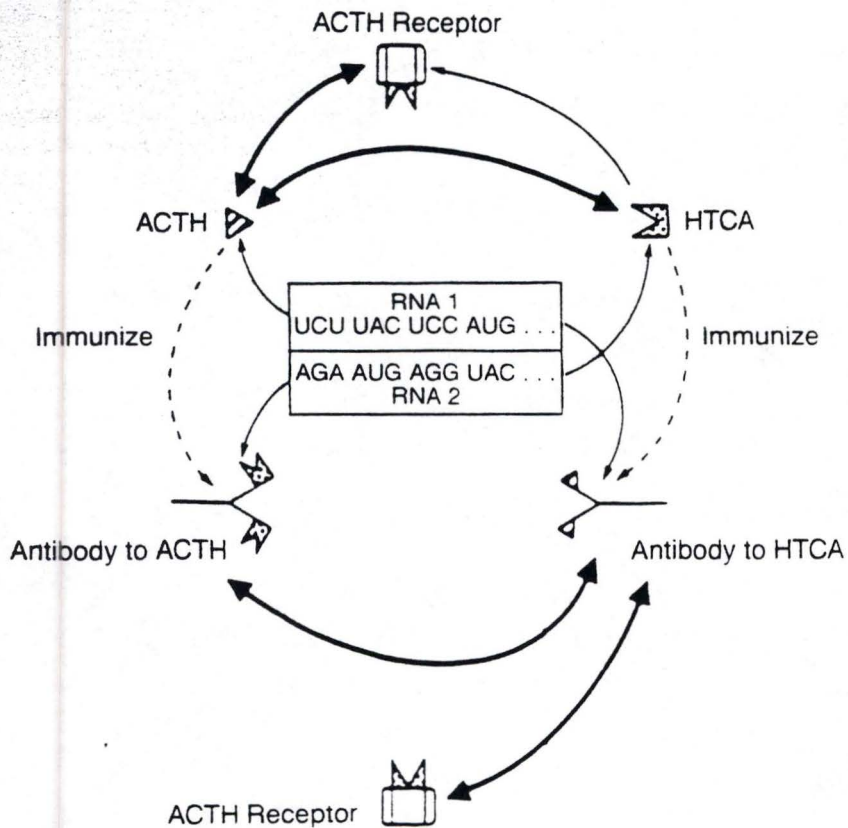
hydrophobes de la chaîne en vis-à-vis pourraient venir se ranger (Figure 17). L'interaction serait optimale dans le cas où acides aminés hydrophiles et hydrophobes alternent le long du peptide. Dans le cas contraire, l'interaction pourrait provoquer des courbures ou des torsions de la structure. Ainsi, dans ce modèle, les résidus hydrophiles n'interagissent pas avec les résidus hydrophobes, mais se retirent plutôt de leur chemin, libérant des espaces internes dans lesquels viennent se loger les acides aminés hydrophobes des deux peptides.

Une seconde critique majeure à l'encontre de la TRM concernait la spécificité de l'interaction. Cependant, plusieurs études ont démontré un degré de spécificité très élevé. Dans certain cas, le changement d'un seul acide aminé entraîne la perte de l'interaction (Brentani *et al.*, 1988).

Enfin, un troisième axe de critiques s'interrogeait quant à la généralisation de la TRM. De nombreux exemples d'interaction entre des peptides et protéines biologiques et leurs peptides complémentaires ont toutefois été rapportés. C'est le cas notamment pour l'ACTH et la γ -endorphine (Bost *et al.*, 1985a), la protéine c-raf (Fassina *et al.*, 1989), la Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (Mulchahey *et al.*, 1986), l'angiotensine II (Elton *et al.*, 1988), la fibronectine (Brentani *et al.*, 1988), et la cystatine C humaine (Ghiso *et al.*, 1990). Toutefois, des exemples d'absence d'interaction entre des paires de peptides complémentaires ont été rapportés, suggérant que la TRM ne serait pas une théorie universelle (Beattie and Flint, 1992).

5.5. Similarité entre des protéines et le peptide complémentaire à leur récepteur

La découverte de régions de similarité locale hautement significative entre des ligands biologiques et les peptides complémentaires à leurs récepteurs constitue un des arguments les plus forts en faveur de la TRM. Par exemple, deux segments similaires de six acides aminés chacun ont été détectés entre la séquence peptidique de l'Epidermal Growth Factor (EGF) et celle du peptide complémentaire à celui de son récepteur (Tableau 6)(Bost



Proposed scheme for the relationship between complementary RNA, the peptides (recognition units) they encode, and the antibodies induced by such recognition units. The recognition units for ACTH and HTCA (the complementary peptide for ACTH) are specified by complementary RNA. They can interact with one another as well as induce the other's idiotopic homolog after immunization. These homologs are thought to be encoded by the same complementary RNA that specified the original pair of recognition units. Bold arrows indicate interacting peptide recognition units, narrow arrows indicate the nucleic acid source of the peptides, and dashed arrows show the peptides for immunization. Although this model depicts the specific example of ACTH and HTCA, it is, of course, applicable to any pair of recognition units.

Figure 18:

Relations entre deux peptides encodés par des ARN complémentaires, et les anticorps produits suite à une immunisation avec ces deux peptides. Les doubles flèches représentent une interaction. Les simples flèches indiquent la source nucléotidique qui encode les différents peptides. Les flèches en pointillés indiquent les peptides utilisés pour l'immunisation et les anticorps générés (Blalock, 1990).

et al., 1985b). Ces deux segments complémentaires montrent chacun 83% d'identité en acides aminés avec l'EGF. Au niveau des séquences nucléotidiques, les pourcentages d'identité sont respectivement de 67 et 78%. Cependant, les différences affectent principalement la troisième base des codons, et elles n'ont donc que peu d'influence sur la séquence peptidique. Des homologies similaires ont également été observées pour l'interleukine-2 et la transferrine (Bost *et al.*, 1985b). Pour ces trois exemples, les segments de complémentarité hydrophatique sont toujours détectés au niveau du domaine extracellulaire du récepteur, en accord avec les prédictions de la TRM.

D'autres équipes ont obtenus des résultats analogues. Par exemple, une séquence de 10 acides aminés de la bombésine se retrouve dans le peptide complémentaire à son récepteur (Tritsch, 1991).

5.6. Système immunitaire et peptides complémentaires

L'intervention d'interactions entre des couples de peptides complémentaires au sein du système immunitaire a été proposée (Blalock, 1990).

En effet, l'existence d'un véritable réseau d'anticorps en interaction au sein du système immunitaire est maintenant clairement établie (Roitt, 1994). Ainsi, des idiotypes (antigènes caractéristiques des régions variables des anticorps) sont reconnus par les paratopes (anti-idiotopes) d'autres anticorps. Ces idiotopes et anti-idiotopes pourraient bien présenter des séquences peptidiques complémentaires. Cette hypothèse est confortée par l'observation qu'une immunisation avec deux peptides complémentaires l'un de l'autre et interagissant, produit deux anticorps capables de se reconnaître (Figure 18)(Blalock, 1990).

5.7. Applications de la Théorie de la Reconnaissance Moléculaire

5.7.1. Purification et caractérisation de récepteurs et "binding proteins".

Une des premières applications de la TRM a été la génération d'anticorps dirigés contre un peptide complémentaire à un ligand déterminé en vue de purifier par chromatographie d'affinité le récepteur de ce ligand. Ainsi, un anticorps dirigé contre le peptide complémentaire à l'ACTH a permis l'immuno-purification et la caractérisation de son récepteur. Les mêmes résultats ont été obtenus, entre autres, pour la γ -endorphine (Carr *et al.*, 1986), l'angiotensine II (Elton *et al.*, 1988), la fibronectine (Brentani *et al.*, 1988), et la Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (Mulchahey *et al.*, 1986). Dans chaque cas, l'interaction récepteur-anticorps permet d'empêcher l'interaction récepteur-hormone, démontrant que l'anticorps se lie sur le site de liaison de l'hormone ou sur un site très proche.

5.7.2. Elaboration de programmes informatiques en vue d'identifier des sites d'interactions entre protéines.

Plusieurs équipes ont mis au point des programmes informatiques dans le but de déterminer les sites d'interactions éventuels entre des couples de protéines (Fassina and Meli, 1994). Le programme détermine tout d'abord les profils hydrophatiques des deux protéines étudiées, souvent un ligand et son récepteur. Ensuite, il compare ces profils sur des segments de longueur prédéfinie tout en déterminant en même temps le degré de complémentarité hydrophatique. Les segments qui présentent un score maximum de complémentarité sont sélectionnés comme étant des sites potentiels d'interaction. Ils sont alors produits par synthèse chimique et testés expérimentalement. Cette approche a été appliquée avec succès pour la détermination d'un site d'interaction entre l'interleukine-1 β et son récepteur de type I (Fassina and Meli, 1994).

Un autre programme a été élaboré par l'équipe de Maier (1994), et utilisé avec succès lors d'une étude sur l'interaction entre des idiotypes et anti-idiotypes. Ce programme est similaire à celui de Fassina et Meli (1994), à la différence près que seuls les segments hydrophatiquement complémentaires qui se retrouvent accessibles en surface des protéines repliées sont sélectionnés comme sites potentiels d'interaction uniquement (Maier *et al.*, 1994).

6. But du mémoire

Dans le cadre de ce mémoire, nous allons déterminer les peptides complémentaires aux régions hypervariables d'un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement le LPS de *Brucella*, l'anticorps A76-12G12. Ces peptides seront alors présentés en surface de phages filamenteux en fusion avec la protéine d'enveloppe pVIII par insertion d'un fragment nucléotidique encodant ces peptides dans une des deux copies du gène de la pVIII (phage de type 88). La reconnaissance de ces peptides par l'AcMo 12G12 sera ensuite testée.

La reconnaissance d'un de ces peptides par l'anticorps constituerait une première étape vers la construction d'un mimotope spécifique du LPS de *Brucella*, et ce à des fins diagnostiques.

**Résultats
et
discussion**

L'anticorps monoclonal A76-12G12 (AcMo 12G12) reconnaît l'épitope C présent exclusivement sur le LPS (A dominant et M dominant) de *Brucella* (Weynants *et al.*, 1996). Sa réactivité avec le LPS de *Yersinia* est non détectable. Il est produit actuellement au laboratoire par culture *in vitro* d'un hybridome de souris. L'obtention d'un mimotope reconnu spécifiquement par cet anticorps fournirait un outil précieux pour contourner les problèmes de réactions sérologiques faussement positives lors du diagnostic de la brucellose (voir le paragraphe 1.4 de l'introduction).

L'AcMo 12G12 a déjà été utilisé pour cribler les différentes librairies de peptides présentés en phage disponibles au laboratoire, mais aucun phage recombinant positif n'a pu être détecté (c'est-à-dire qu'aucun peptide n'a été sélectionné par l'anticorps). C'est pourquoi une nouvelle stratégie a été imaginée en vue d'obtenir un mimotope reconnu par l'AcMo 12G12. Cette stratégie se base sur l'interaction entre un peptide et son peptide "complémentaire", décrite par J.E. Blalock sous le terme de "Théorie de la Reconnaissance Moléculaire" (Blalock, 1990). Cette théorie prédit la reconnaissance spécifique entre deux peptides (appelés peptides "complémentaires") encodés par deux séquences nucléotidiques complémentaires (voir le paragraphe 5.4 de l'introduction).

La première étape de ce mémoire consistera à déterminer la séquence nucléotidique des ADNc de la chaîne légère (VL et CL) et du fragment Fd (c'est-à-dire les domaines VH et CH1) de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 (le clonage de ces fragments a été réalisé en 1994 par V. Weynants); leur séquence peptidique sera ensuite déduite. Dans un second temps, les trois régions hypervariables pour les chaînes lourdes et légères seront localisées, et les séquences de leurs peptides complémentaires seront déterminées. Pour chaque chaîne, un adaptateur encodant ces peptides complémentaires sera conçu. Celui-ci sera alors inséré dans le génome d'un phage filamenteux de type 88, en fusion avec une des deux copies du gène de la protéine majeure d'enveloppe (protéine pVIII ou g8p). Différentes constructions où les peptides seront présentés individuellement ou par combinaison de deux ou de trois en surface des phages seront réalisées. Enfin, leur reconnaissance par l'AcMo 12G12 sera testée. En cas de succès, ces peptides constitueraient une première étape vers la construction d'un mimotope reconnu par un anticorps spécifique du LPS de *Brucella*.

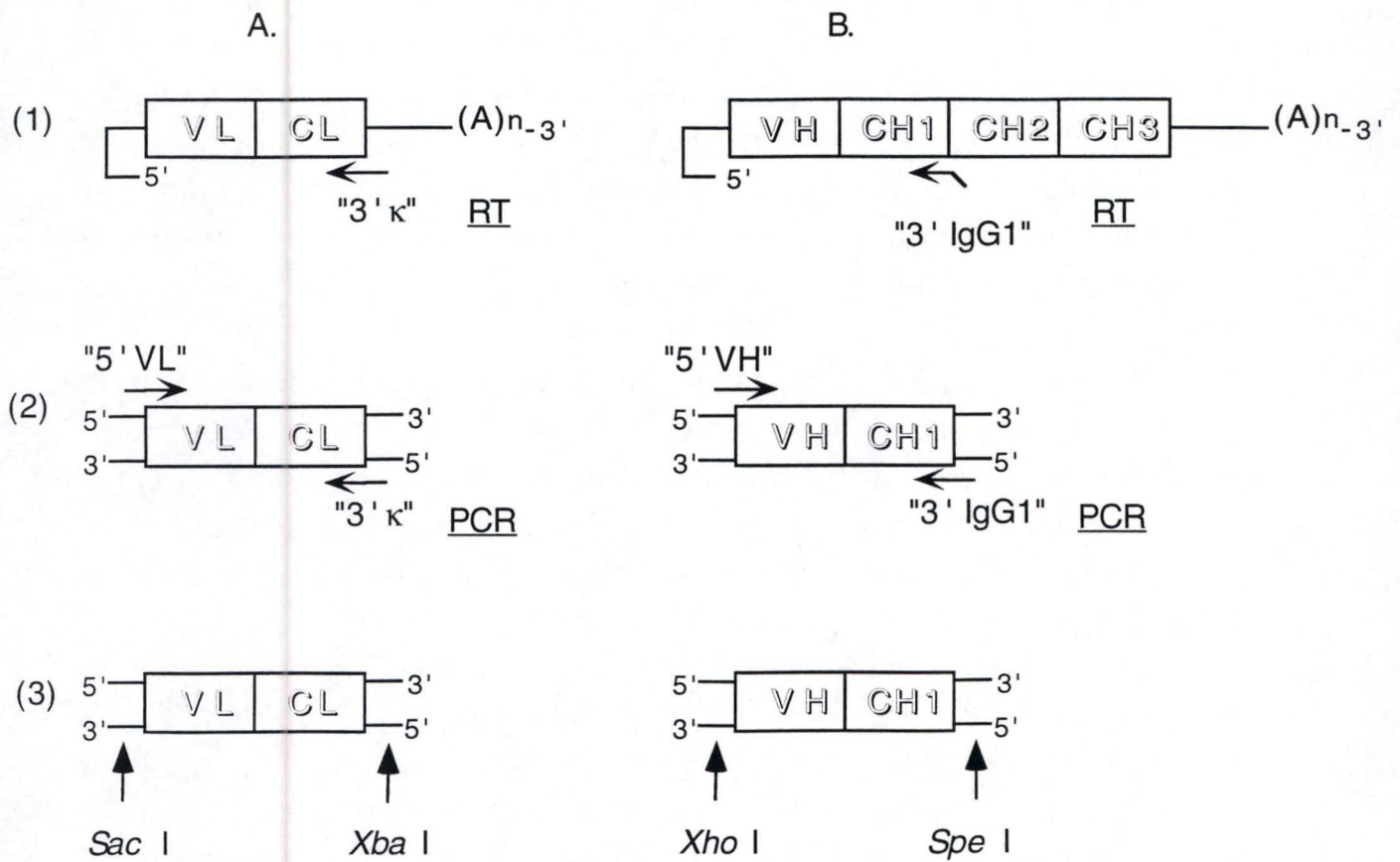


Figure 1:

Représentation schématique des différentes étapes qui ont permis l'insertion dans un vecteur plasmidique des fragments d'ADN encodant la chaîne légère (A) et les domaines VH et CH1 (B) de l'AcMo 12G12.

(1): transcription reverse (RT) sur les ARNm de la chaîne légère et de la chaîne lourde au moyen des amorces "3' κ" et "3' IgG1", respectivement. (2): amplification par PCR du double brin d'ADNc. Les amorces "5' VL" et "5' VH" sont complémentaires du début des segments encodant les domaines variables de la chaîne légère et de la chaîne lourde respectivement. L'amorce "3' κ" s'hybride au niveau de la séquence encodant le domaine constant déterminant la classe κ de chaîne légère. L'amorce "3' IgG1" est complémentaire de la fin de la séquence encodant le premier domaine constant déterminant la chaîne lourde d'IgG1. (3): les produits de l'amplification possèdent des sites de restriction à leurs extrémités, facilitant leur insertion dans un vecteur plasmidique.

1. Clonage de l'ADNc codant pour les fragments Fab de l'AcMo 12G12

1.1. Description des amorces nucléotidiques permettant d'amplifier par RT-PCR les ARNm encodant les fragments Fab d'un anticorps

L'amplification par RT-PCR des ARNm encodant les fragments Fab d'anticorps nécessite plusieurs types d'amorces. Tout d'abord, les amorces nucléotidiques dites "5'" s'hybrident au début de la séquence codante sur l'ADNc, donc au début des régions qui codent pour les domaines variables (VH et VL) de l'anticorps (Figure 1). Etant donné la variabilité au niveau de ces régions, l'amplification nécessite non pas une seule amorce mais en réalité un mélange de plusieurs amorces "5'". Celles-ci ont été déduites d'un grand nombre d'alignements de séquences qui ont permis de déterminer les nucléotides les plus fréquents au niveau de ces extrémités.

Les amorces dites "3'" s'hybrident quant à elles sur l'ADN et sur l'ARNm au niveau des régions terminales encodant les domaines constants CL et CH1. Il y a une amorce pour la chaîne légère κ et une amorce pour la chaîne lourde de type IgG1.

1.2. Insertion dans un vecteur plasmidique et séquençage des segments d'ADN encodant les fragments Fab de l'AcMo 12G12

Les différentes étapes qui ont permis de cloner et de séquencer les fragments Fab de l'AcMo 12G12 ont été réalisées en 1994 (Figure 1). Elles peuvent être résumées comme suit.

1) Extraction de l'ARN total à partir d'une culture de l'hybridome A76-12G12.

2) Transcription reverse sur l'ARN total, à l'aide de l'amorce "3' κ " de chaînes légères et de l'amorce "3'" de chaînes lourdes d'IgG1.

3) A partir de l'ADNc obtenu par transcription reverse, amplification par PCR des régions encodant la chaîne légère et le fragment Fd de la chaîne lourde. Les amorces nucléotidiques utilisées comprennent des sites de restriction à leurs extrémités, facilitant l'insertion des produits de la PCR dans un vecteur plasmidique.

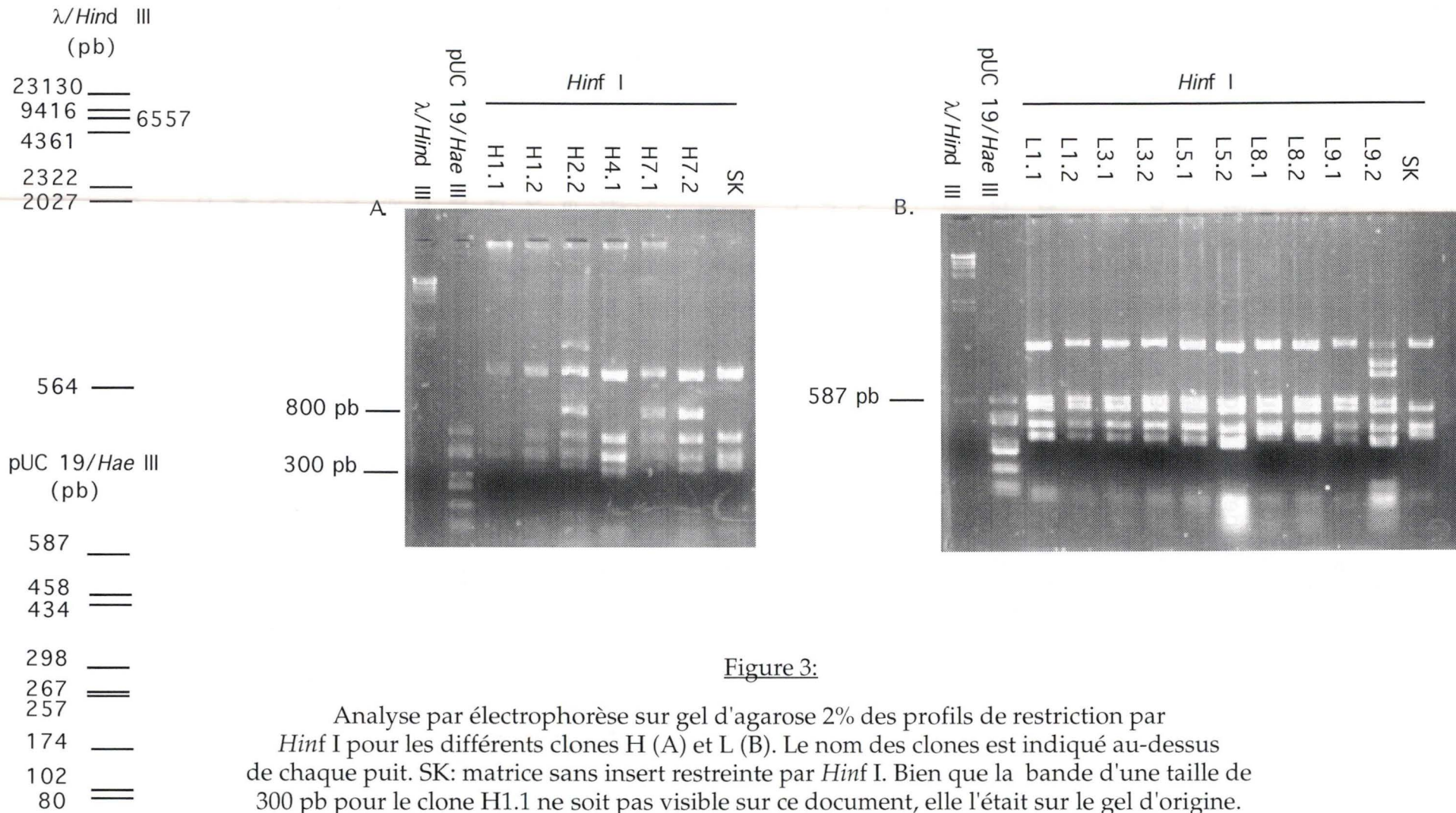


Figure 3:

Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 2% des profils de restriction par *Hinf* I pour les différents clones H (A) et L (B). Le nom des clones est indiqué au-dessus de chaque puit. SK: matrice sans insert restreinte par *Hinf* I. Bien que la bande d'une taille de 300 pb pour le clone H1.1 ne soit pas visible sur ce document, elle l'était sur le gel d'origine.

Marqueurs de taille utilisés: phage λ restreint par *Hind* III; pUC19 restreint par *Hae* III.

1. Clonage de l'ADNc codant pour les fragments Fab de l'AcMo 12G12

1.1. Description des amorces nucléotidiques permettant d'amplifier par RT-PCR les ARNm encodant les fragments Fab d'un anticorps

L'amplification par RT-PCR des ARNm encodant les fragments Fab d'anticorps nécessite plusieurs types d'amorces. Tout d'abord, les amorces nucléotidiques dites "5'" s'hybrident au début de la séquence codante sur l'ADNc, donc au début des régions qui codent pour les domaines variables (VH et VL) de l'anticorps (Figure 1). Etant donné la variabilité au niveau de ces régions, l'amplification nécessite non pas une seule amorce mais en réalité un mélange de plusieurs amorces "5'". Celles-ci ont été déduites d'un grand nombre d'alignements de séquences qui ont permis de déterminer les nucléotides les plus fréquents au niveau de ces extrémités.

Les amorces dites "3'" s'hybrident quant à elles sur l'ADN et sur l'ARNm au niveau des régions terminales encodant les domaines constants CL et CH1. Il y a une amorce pour la chaîne légère κ et une amorce pour la chaîne lourde de type IgG1.

1.2. Insertion dans un vecteur plasmidique et séquençage des segments d'ADN encodant les fragments Fab de l'AcMo 12G12

Les différentes étapes qui ont permis de cloner et de séquencer les fragments Fab de l'AcMo 12G12 ont été réalisées en 1994 (Figure 1). Elles peuvent être résumées comme suit.

1) Extraction de l'ARN total à partir d'une culture de l'hybridome A76-12G12.

2) Transcription reverse sur l'ARN total, à l'aide de l'amorce "3' κ " de chaînes légères et de l'amorce "3'" de chaînes lourdes d'IgG1.

3) A partir de l'ADNc obtenu par transcription reverse, amplification par PCR des régions encodant la chaîne légère et le fragment Fd de la chaîne lourde. Les amorces nucléotidiques utilisées comprennent des sites de restriction à leurs extrémités, facilitant l'insertion des produits de la PCR dans un vecteur plasmidique.

CDR 1

GCA GTG TCG ACT CAA GTA TAA GTT CAG CTA CTT GCA CTG GTA CCA
A V S T Q V * V Q L L A L V P
Q C R L K Y K F S Y L H W Y
S V D S S I S S A T C T G T

CDR 2

ACC CTG GAT TTA TGG CAC ATC CAA CCT GGC TTC TGG AGT CCC TGC
T L D L W H I Q P G F W S P C
P W I Y G T S N L A S G V P A
P G F M A H P T W L L E S L L

CDR 3

tta tta ctg tca cag tgg AGT AGT TcC CCA CCC TGC ACG TTC GGT
L L L S Q W S S S P P C T F G
Y Y C H S G V V P H P A R S
I T V T V E * F P T L H V R

Figure 2:

Localisation des trois CDR de la chaîne légère de l'AcMo 12G12 sur la séquence de l'insert porté par le clone L. La traduction en acides aminés est réalisée suivant trois phases possibles pour le sens de lecture. Les résidus qui constituent les CDR sont notés en caractères gras. Les résidus encodés par la phase "correcte" sont soulignés. Chaque ligne constitue une phase. *: stop. Les nucléotides sont notés en minuscules lorsque la lecture de la séquence est incertaine.

4) Restriction du vecteur pBluescriptSK (Stratagene) et des fragments obtenus après la PCR par les endonucléases *Xho* I et *Spe* I pour la chaîne lourde, et par *Sac* I et *Xba* I pour la chaîne légère. Ensuite, ligation des inserts avec la matrice plasmidique. Enfin, transformation par électroporation la souche d'*E. coli* XL1-Blue par les produits de ligation et obtention de plusieurs clones recombinants.

5) Mise en culture liquide de six clones pour la chaîne lourde (clones H) et dix clones pour la chaîne légère (clones L). Une mini-préparation d'ADN plasmidique est réalisée sur une partie de chaque culture. Un échantillon du reste de chaque culture est conservé à -80°C dans un milieu LB/glycérol 15%.

6) Pour chaque chaîne (H et L), sélection d'un clone et séquençage de son insert nucléotidique.

Au départ de ce mémoire, nous avons soumis les séquences peptidiques déduites des séquences nucléotidiques obtenues pour ces deux clones L et H au programme BlastX qui recherche, dans les banques de données, les séquences de protéines qui présentent les plus fortes similarités locales avec la séquence soumise (Altschul *et al.*, 1990; <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/Options/blast.html>).

Contre toute attente, la séquence du clone H choisi montre une similarité très forte avec le précurseur de la palmitoyl-protéine thioestérase (une enzyme intervenant dans le métabolisme des acides gras). Comme cette séquence ne correspond pas à celle d'une chaîne lourde d'IgG1 attendue, une analyse et un nouveau séquençage de l'insert porté par les six clones H stockés vont être entrepris.

La séquence de l'insert du clone L présente quant à elle de fortes similarités avec des chaînes légères κ d'IgG (sa séquence est présentée en annexe 1). L'alignement de cette séquence avec de nombreuses séquences de chaînes légères d'IgG a permis de localiser les trois CDR de notre chaîne. Cependant, au niveau des CDR 1 et 3, on constate un changement du cadre de lecture dans notre séquence (Figure 2). Comme il est impossible de localiser avec précision les bases responsables de ces changements de phase, et que ceux-ci peuvent être dûs soit à une erreur de lecture, soit à une erreur de l'ADN polymérase lors de l'amplification par PCR ou de la réaction de séquençage, il est nécessaire de recommencer le séquençage de l'insert porté par les clones L.

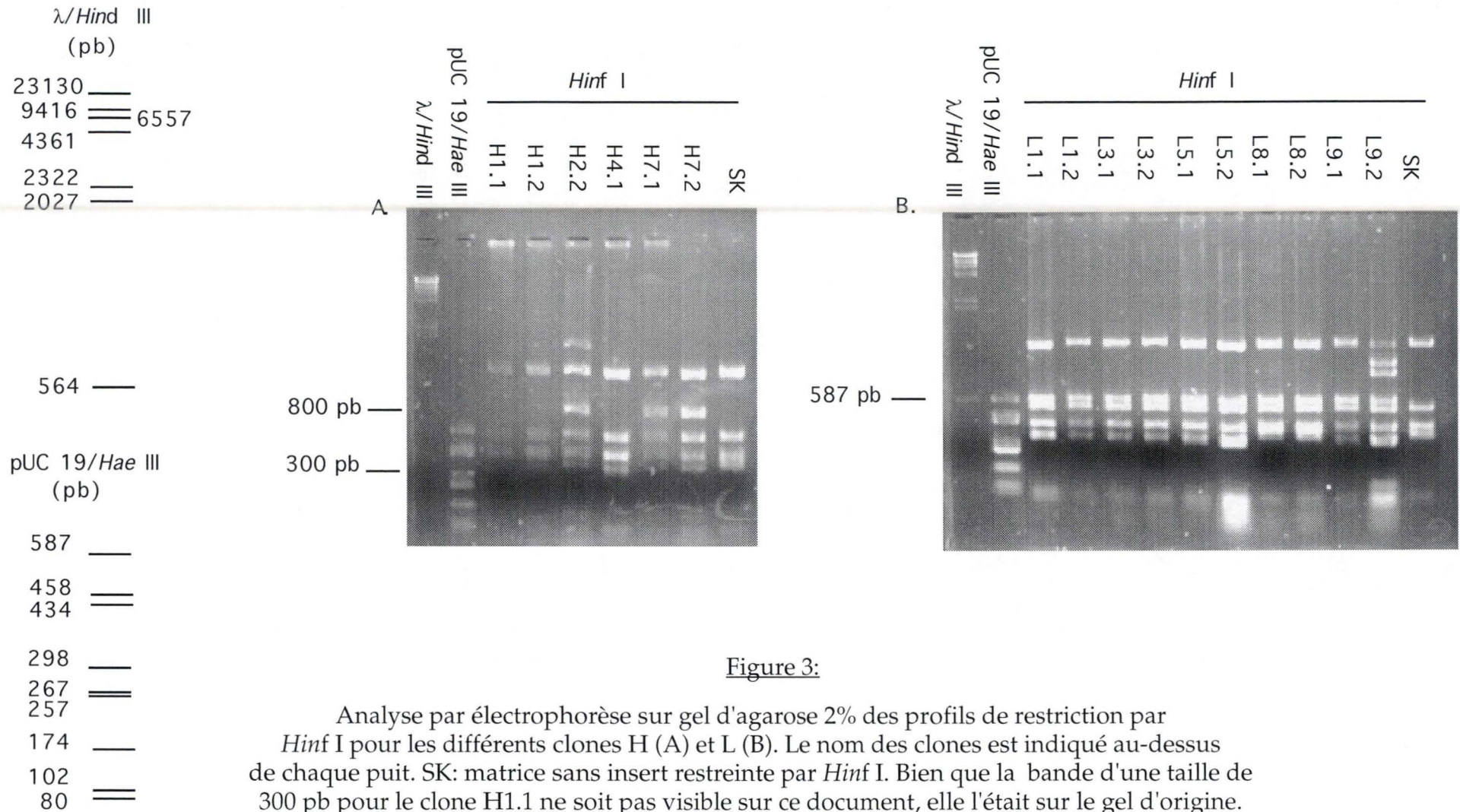


Figure 3:

Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 2% des profils de restriction par *Hinf I* pour les différents clones H (A) et L (B). Le nom des clones est indiqué au-dessus de chaque puit. SK: matrice sans insert restreinte par *Hinf I*. Bien que la bande d'une taille de 300 pb pour le clone H1.1 ne soit pas visible sur ce document, elle l'était sur le gel d'origine. Marqueurs de taille utilisés: phage λ restreint par *Hind III*; pUC19 restreint par *Hae III*.

1.3. Analyse des différents clones H et L

Après réveil des six clones H et des dix clones L, de nouvelles mini-préparations d'ADN plasmidiques sont réalisées. Un échantillon de chacune d'entre elles est restreint par l'endonucléase *Hinf* I. Un échantillon de vecteur sans insert est également restreint par la même enzyme. Cette endonucléase a été choisie *a priori* car les produits de restriction engendrés devraient présenter plusieurs bandes de tailles différentes sur gel d'agarose, constituant une "empreinte" caractéristique du clone étudié (les profils de restriction seront différents suivant la nature de l'insert). Ceci est dû au fait que l'enzyme *Hinf* I reconnaît un site à quatre bases spécifiques (la probabilité que ce site se retrouve dans une séquence donnée est donc plus élevée par rapport aux sites à six bases spécifiques).

Les produits de restriction sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (Figure 3). L'analyse du gel indique que tous les clones L sont porteurs d'un insert nucléotidique (Figure 3B). Le profil de restriction du clone L9.2 est toutefois différent de celui des autres clones L. Les clones L9.2 et L3.1 (qui est choisi parmi les neuf autres clones L montrant un profil de restriction identique) sont sélectionnés pour être séquencés.



Deux profils de restriction différents sont observés pour les clones H (Figure 3A). Les clones H2.2, H7.1 et H7.2 montrent une bande caractéristique, correspondant à un fragment d'une taille estimée à environ 800 pb, la bande supplémentaire observée pour le clone H2.2 correspondant à un fragment partiellement restreint. Les clones H1.1, H1.2 et H4.1 ne possèdent pas cette bande à 800 pb. Toutefois, ils possèdent une bande qui correspond à un fragment d'une taille de 300 pb environ, et qui est légèrement plus basse que celle observée pour le vecteur sans insert. Pour la chaîne lourde, les clones H4.1 et H7.1 sont sélectionnés en vue d'être séquencés.

L L S T V G V V P T H A R S
 I T V N S G **S S** P H P **C T F G**
Y Y C O Q W E * **S P P** M H V R
L3.1 TAT TAC TGT CAA CAG TGG GAG TAG TCC CCA CCC ATG CAC GTT CGG T
L9.2 TAT TAC TGT CAA CAG TGG AGT AGT TCC CCA CCC ATG CAC GTT CGG T
Y Y C O Q W S S S P P M H V R
 I T V N S G V V P H P **C T F G**
 L L S T V E * F P T H A R S

Figure 4:

Localisation du CDR 3 de la chaîne légère de l'AcMo 12G12 sur la séquence de l'insert porté par les clones L3.1 (haut) et L9.2 (bas). La traduction en acides aminés est réalisée suivant trois phases possibles pour le sens de lecture. Les résidus qui constituent les CDR sont notés en caractères gras. Les résidus encodés par la phase "correcte" sont soulignés.

*: stop.

Clone L TAT TAC TGT CA  CAG TGG AGT AGT TCC CCA CCC TGC ACG TTC GGT
 L9.2 TAT TAC TGT CAA CAG TGG AGT AGT TCC CCA CCC TGC ACG TTC GGT **A**
 L3.1 TAT TAC TGT CAA CAG TGG AGT AGT **G**  **A** CC CCA CCC TGC ACG TTC GGT

 TAT TAC TGT CAA CAG TGG AGT AGT TCC CCA CCC TGC ACG TTC GGT
 Y Y C Q Q W S S S P P C T F G

Figure 5:

Alignement des séquences des clones L3.1, L9.2 et du clone L (séquencé en 1994) en vue de résoudre les changements de phase au sein de la séquence encodant le CDR 3 de la chaîne légère de l'AcMo 12G12. Les bases surnuméraires sont notées en caractères gras italiques. Les flèches indiquent les bases manquantes. La séquence peptidique du CDR 3 est notée en caractères gras.

2. Séquençage des inserts nucléotidiques des clones L et H sélectionnés

Une midi-préparation d'ADN plasmidique (voir le paragraphe 1.2 du matériel et méthodes) est réalisée pour les quatre clones sélectionnés (L3.1, L9.2, H4.1 et H7.1). L'ADN purifié est ensuite quantifié par mesure de la densité optique à 260 nm: 5,35 µg sont récupérés pour le clone L3.1, 36 µg pour le clone L9.2, 10,8 µg pour le clone H4.1 et 7 µg pour le clone H7.1.

Les réactions de séquençage se font par PCR au moyen du "DNA Sequencing Kit" pour séquenceur automatique ABI Prism (Perkin Elmer). Pour les quatre clones, 400 ng d'ADN plasmidique purifié sont engagés dans la réaction de séquençage. Les produits obtenus soumis à l'analyse sur séquenceur automatique (377 DNA Sequencer ABI Prism, Perkin Elmer), au laboratoire de Physiologie et Physiopathologie (Pr. Goffinet).

2.1. Séquences obtenues pour les inserts des clones L

Les séquences obtenues pour les clones L3.1 et L9.2 sont présentées aux annexes 2 et 3, respectivement. Nous constatons que ces deux séquences sont quasiment identiques, excepté à certaines positions. Par exemple, une différence à la position 35 permet la présence d'un site de restriction *Hinf* I surnuméraire dans la séquence du clone L3.1. Ceci explique probablement la différence entre les profils de restriction par cette enzyme des clones L3.1 et L9.2.

Après avoir été analysées au moyen du programme BlastX, les séquences montrent toutes deux une forte similarité avec des chaînes légères d'IgG. Un alignement avec un grand nombre de séquences de ces chaînes légères permet la localisation de trois régions hypervariables. L'analyse des séquences révèle des changements du cadre de lecture situés au sein du CDR 3 (Figure 4). Mais en alignant les séquences des clones L3.1 et L9.2 avec celle obtenue pour le clone L sélectionné en 1994, ces changements de phase peuvent être corrigés (Figure 5).

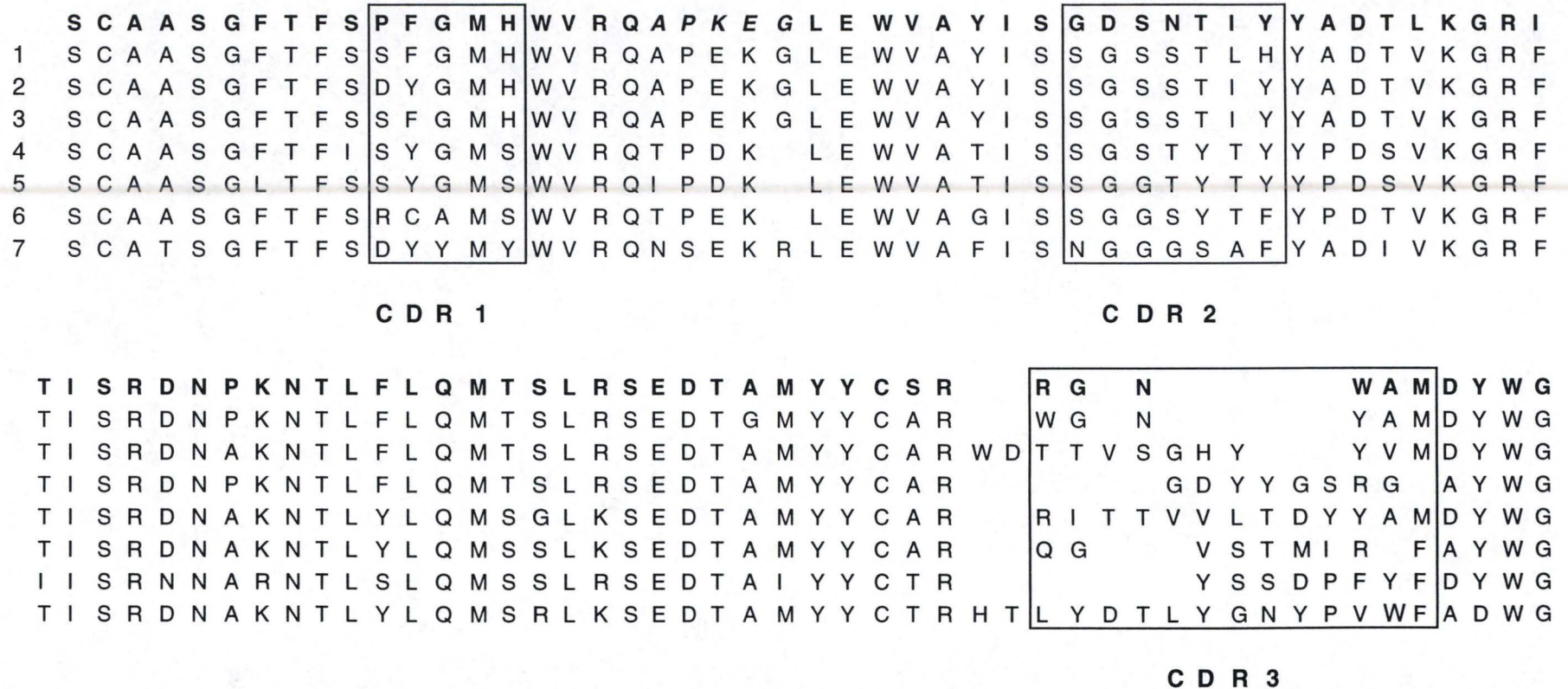


Figure 6:

Localisation par alignement de séquences des trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 (encadrés). La séquence de l'AcMo 12G12 est écrite en caractères gras. Les séquences 1 à 7 sont les sept séquences de chaîne lourde d'IgG qui présentent les plus fortes similarités avec celle de l'AcMo 12G12 (d'après le programme BlastX). La portion de la séquence de l'AcMo 12G12 écrite en italique correspond à une zone qui présente un changement du cadre de lecture. Les résidus dans le troisième cadre (CDR 3) ne sont pas alignés. Code des différentes séquences: 1, pdb1l1gc; 2, gi600716; 3, pdb2gfb; 4, gbi10446; 5, pirs38864; 6, pdb1l1gf; 7, pdb1l1kf.

2.2. Séquences obtenues pour les inserts des clones H

La séquence de l'insert du clone H4.1 est présentée en annexe 4. Soumise au programme BlastX, cette séquence présente une forte similarité avec celle du précurseur de la palmitoylprotéine thioestérase (le même résultat avait été obtenu pour le clone H séquencé en 1994).

Par contre, la séquence de l'insert du clone H7.1 (annexe 5) montre une forte similarité avec de nombreux fragments Fd de chaîne lourde d'IgG. Un alignement avec d'autres séquences de chaînes lourdes d'IgG nous permet de proposer un emplacement pour les trois CDR, qui ne sont pas interrompus par des changements de phase de lecture. Néanmoins, une analyse plus fine est nécessaire pour localiser précisément les trois CDR dans la séquence.

Pour la suite de ce travail, nous avons choisi de nous focaliser sur la chaîne lourde de l'AcMo 12G12. La chaîne légère ne sera pas traitée. Seuls les peptides complémentaires aux CDR de la chaîne lourde seront donc déterminés et testés.

3. Localisation précise des trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12

3.1. Localisation par alignement de séquences

Les CDR sont aussi appelés régions hypervariables, car ils présentent une variabilité très élevée au niveau de leur séquence en acides aminés (voir paragraphe 2.1 de l'introduction). Dès lors, de par cette variabilité, il est possible de localiser les trois CDR d'une chaîne d'un anticorps en alignant sa séquence avec celles d'autres anticorps. Les segments où la variabilité en acides aminés est plus marquée correspondent aux CDR.

Les trois régions hypervariables de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 sont localisées en alignant la séquence en acides aminés de cette chaîne avec les sept séquences de chaîne lourde d'IgG qui montrent les plus fortes similarités avec la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 au niveau des segments séparant les CDR (déterminées par le programme BlastX). (Figure 6):

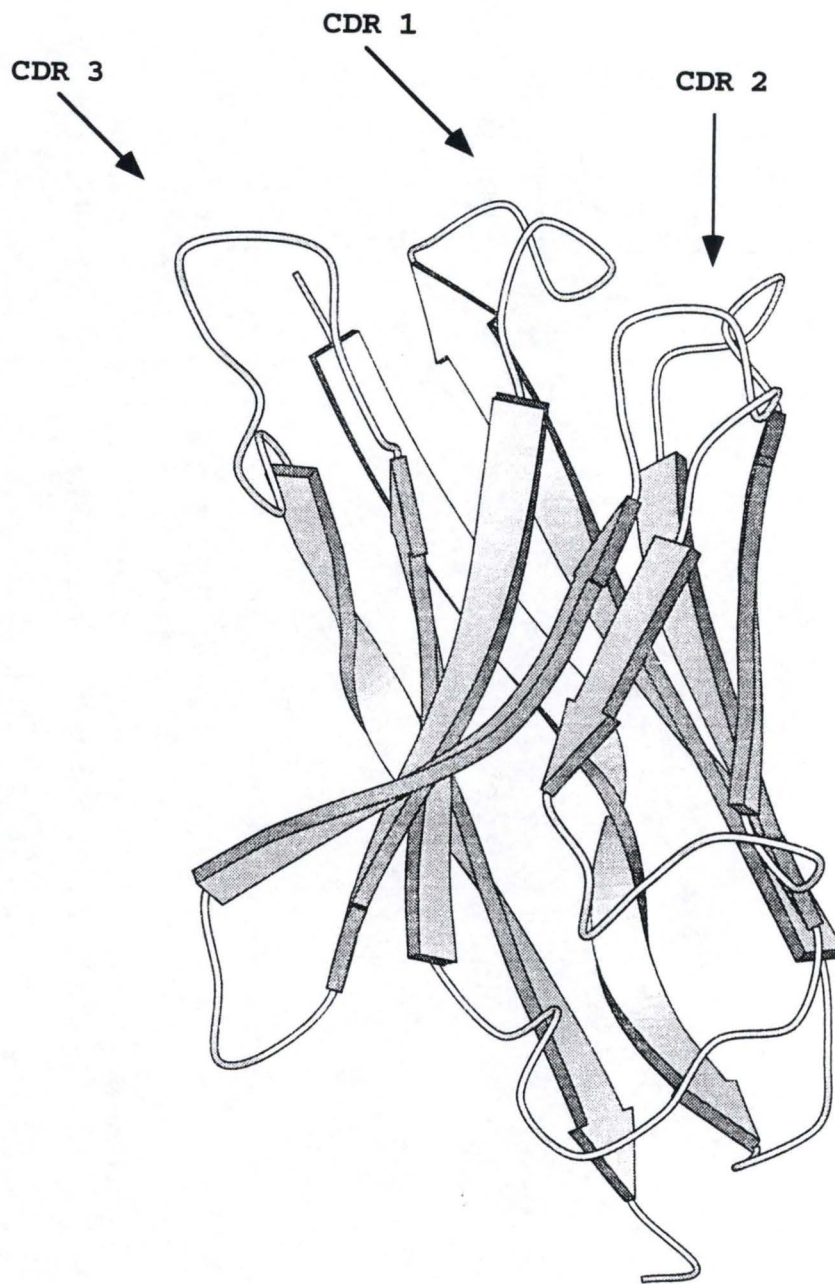


Figure 7:

Structure tridimensionnelle du domaine VH de l'anticorps montrant les plus fortes similarités avec la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 (PDB1IGC). Les flèches représentent les brins β . La direction suivie va de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Les CDR sont portés par les boucles reliant les brins β 2 et 3 (CDR 1), les brins β 4 et 5 (CDR 2) et les brins β 8 et 9 (CDR 3). Les boucles portant les CDR sont indiquées par les flèches.

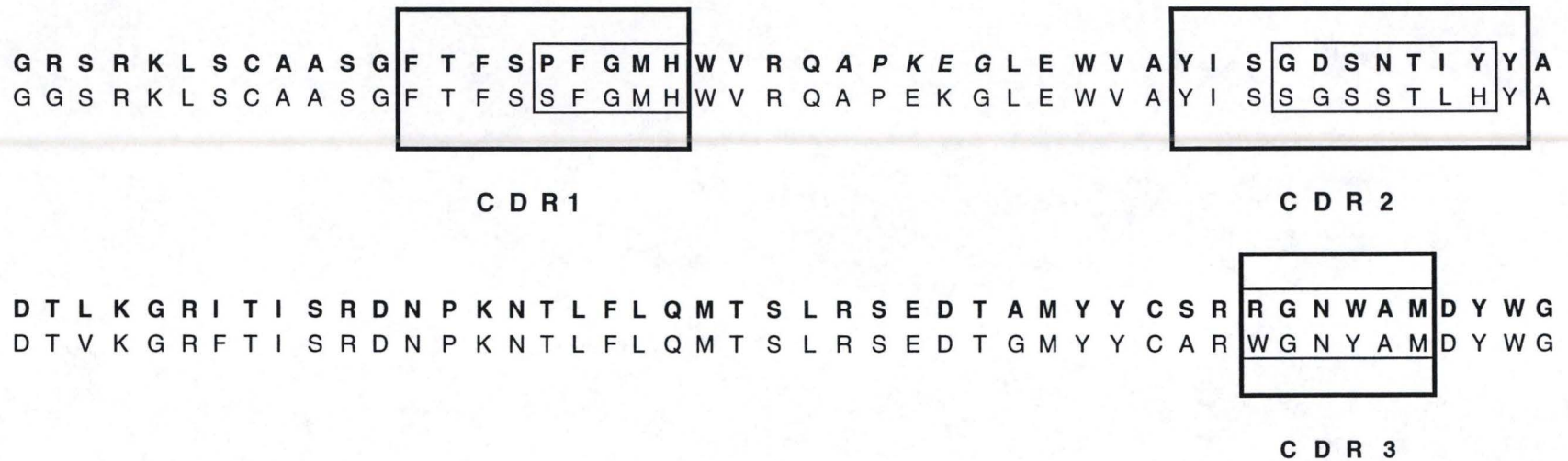


Figure 8:

Localisation des trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 par analyse de la structure 3D d'une chaîne lourde d'anticorps similaire. La séquence de l'AcMo 12G12 est écrite en caractères gras.

La séquence de l'anticorps montrant les plus fortes similarités avec celle de l'AcMo 12G12 est écrite en caractères simples. Les cadres simples représentent l'emplacement des CDR prédit par les alignements de séquences. Les cadres "gras" représentent l'emplacement des CDR prédits par analyse de la structure 3D de l'anticorps similaire.

- région hypervariable 1: PFGMH
- région hypervariable 2: GDSNTIY
- région hypervariable 3: RGNWAM

3.2. Localisation par analyse de la structure tridimensionnelle d'un anticorps similaire

Au niveau de la structure tridimensionnelle (3D) d'une immunoglobuline, chaque CDR est porté par une boucle reliant deux brins β . En analysant la structure d'une chaîne d'anticorps repliée, il est donc possible de localiser ces boucles.

La structure 3D de l'anticorps qui montre la plus forte similarité avec l'AcMo 12G12 (d'après BlastX) est connue. Elle est disponible dans la banque de données de structures de protéines PDB, sous l'appellation 1IGC (Figure 7). L'analyse de la structure de cette chaîne lourde d'anticorps permet la localisation des trois boucles qui portent les régions hypervariables (Figure 8). Les séquences peptidiques des trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 sont donc contenues dans les séquences suivantes:

- boucle 1: FTFSPFGMH
- boucle 2: YISGDSNTIYY
- boucle 3: RGNWAM

La localisation des CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 par analyse de la structure 3D de l'anticorps le plus similaire donne des segments de séquence qui sont plus étendus que ceux localisés par les alignements de séquences. Dès lors, pour être sûr de couvrir l'entièreté des CDR, ce sont les séquences déterminées par analyse de la structure 3D qui seront utilisées pour déterminer les peptides complémentaires. Pour la suite du travail, ces trois séquences seront appelées les "CDR 1, 2 et 3" de l'AcMo 12G12.

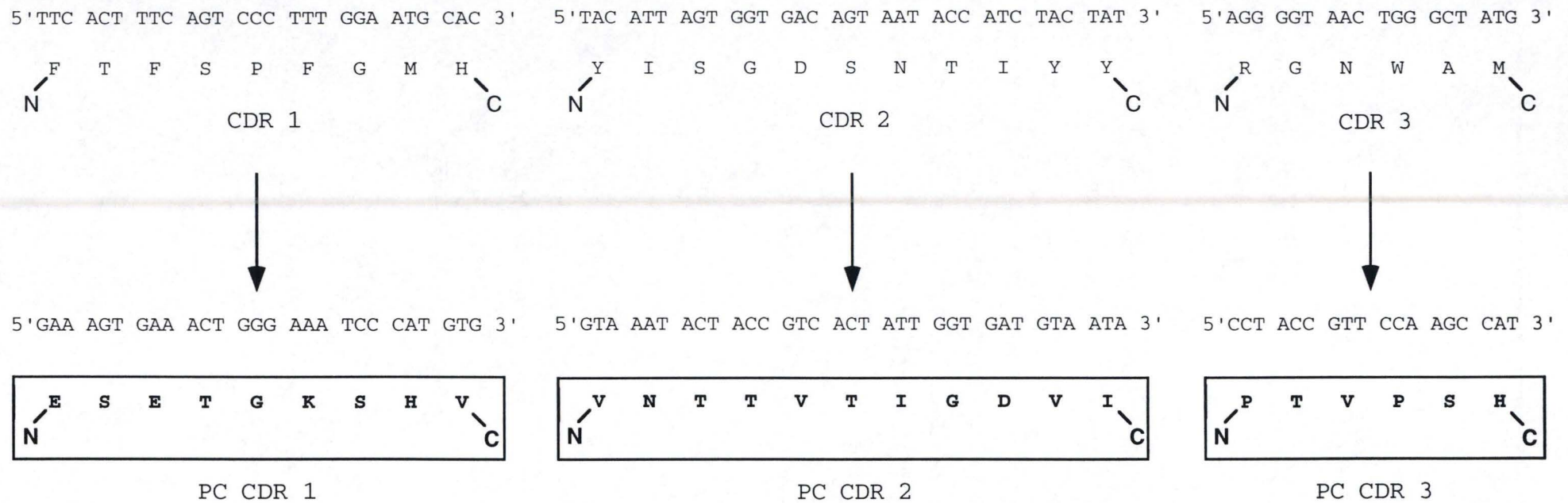


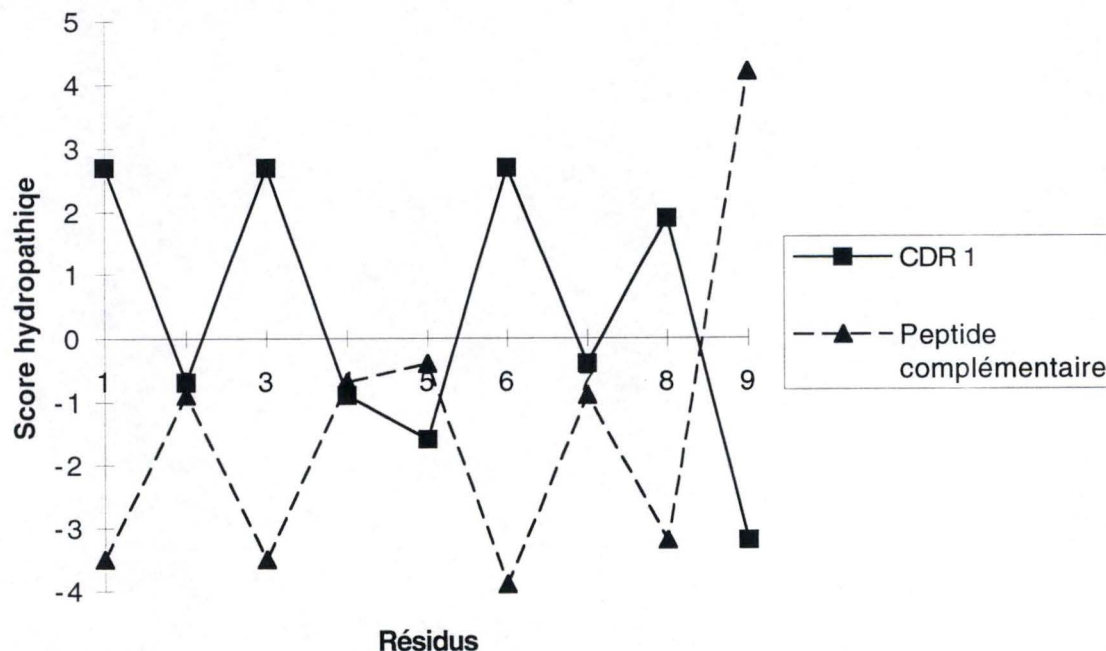
Figure 9:

Détermination de la séquence des peptides complémentaires des trois CDR (PC CDR) de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12. Les séquences nucléotidiques qui encodent les PC CDR sont déduites des séquences nucléotidiques encodant les trois CDR. Les codons complémentaires sont lus dans le sens 5'-3'. Le résidu N-terminal d'un PC CDR est l'acide aminé complémentaire du résidu N-terminal d'un CDR. Les séquences peptidiques des PC CDR sont encadrées et notées en caractères "gras". Les extrémités N-terminales et C-terminales sont représentées.

4. Conception d'un adaptateur encodant les peptides complémentaires aux trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12

4.1. Détermination des séquences peptidiques complémentaires aux CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12

Sur base de la séquence de l'insert du clone H7.1, les séquences nucléotidiques complémentaires de celles encodant les trois CDR ont été déterminées (Figure 9). Les codons complémentaires sont lus dans le sens 5'-3'. Les résidus N-terminaux des peptides complémentaires sont définis arbitrairement comme étant les acides aminés complémentaires aux résidus N-terminaux des CDR. Dans ce cas, l'inversion des profils hydrophatiques se produit lorsque l'extrémité N-terminale d'un CDR est alignée avec l'extrémité N-terminale de son peptide complémentaire (Figure 10).



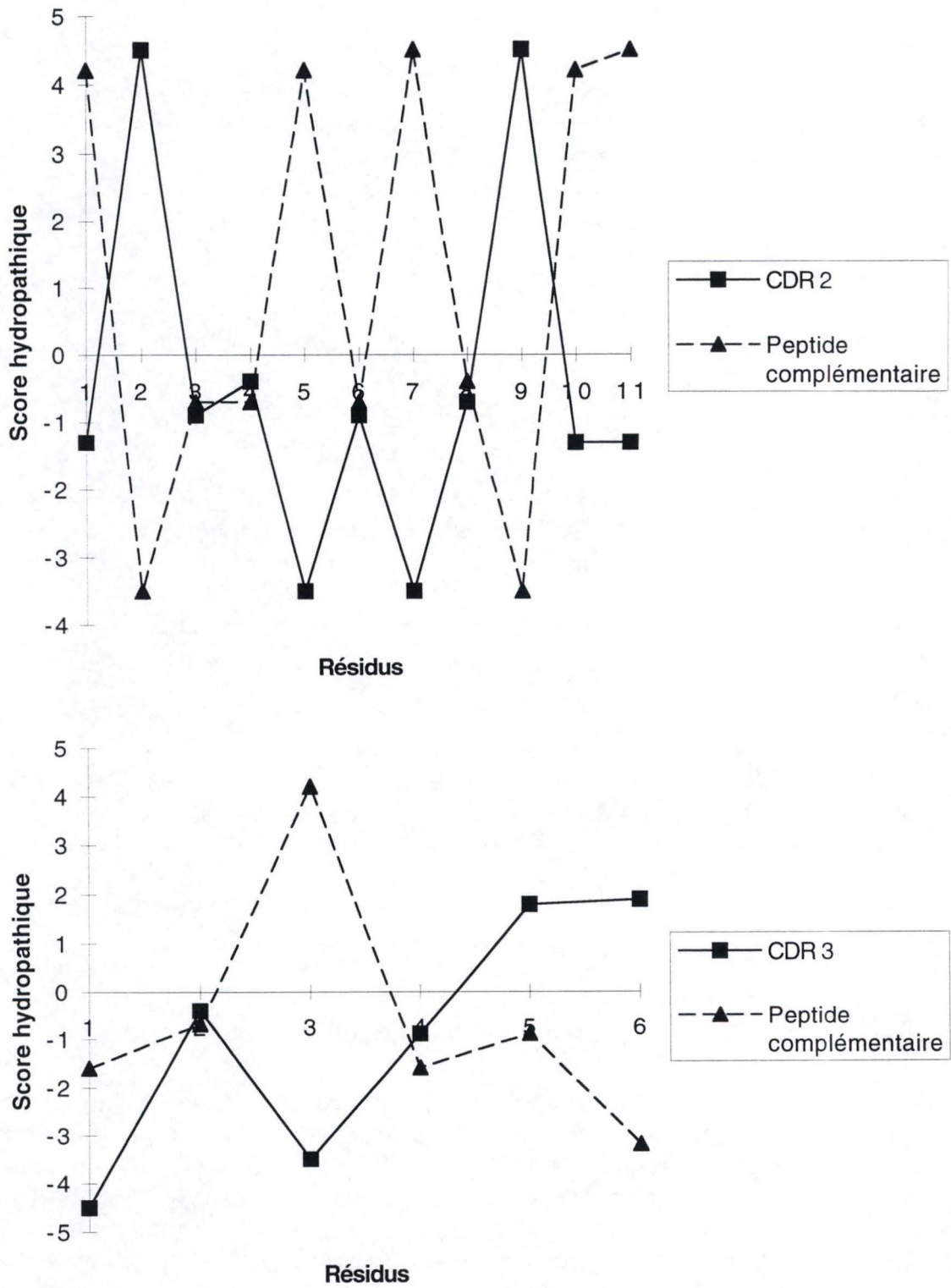
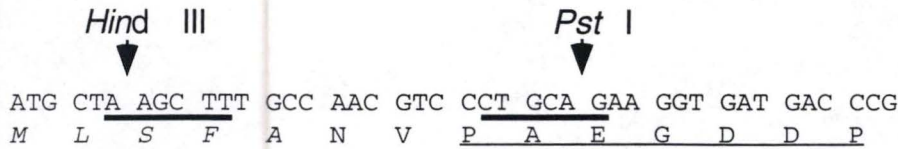


Figure 10:

Comparaison des profils hydrophatiques des trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 et de leurs peptides complémentaires respectifs. L'extrémité N-terminale d'un CDR est alignée avec l'extrémité N-terminale de son peptide complémentaire.

A.



B.

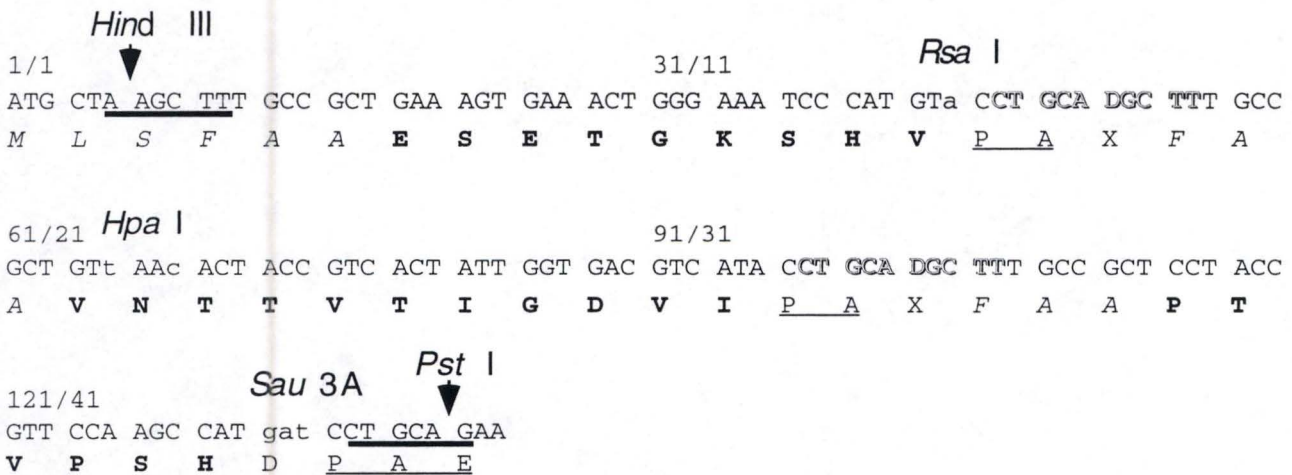


Figure 11:

Représentation de la séquence nucléotidique et peptidique de la portion de la protéine pVIII recombinante portant un insert étranger. La fin du peptide signal est notée en caractères italiques; le début de la partie non recombinante de la pVIII est noté en caractères soulignés; les peptides étrangers sont notés en caractères gras. Les sites de clivage *Hind* III et *Pst* I sont indiqués et leur séquence est soulignée. (A): peptide signal et début de la pVIII d'un phage f88-4 ne portant pas d'insert étranger. (B): adaptateur encodant les peptides complémentaires aux CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 inséré en phase dans le gène de la pVIII recombinante. La séquence issue de la superposition de sites *Hind* III (AAGCTT), *Pst* I (CTGCAG) et *Sph* I (GCATGC) est notée en caractères ombrés. Les nucléotides modifiés ou rajoutés afin de faire apparaître de nouveaux sites de restriction dans les séquences codant pour les peptides PC sont notés en minuscules.

4.2. Conception d'un adaptateur encodant les peptides complémentaires aux CDR de la chaîne lourde de 12G12

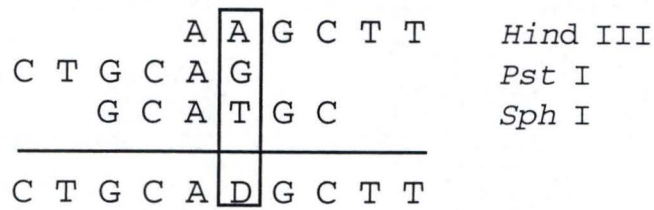
Nous avons conçu un adaptateur qui encode les peptides complémentaires des trois régions hypervariables de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12. Par définition, un adaptateur est un fragment d'ADN double brin synthétique qui possède des extrémités cohésives et compatibles avec celles d'un vecteur restreint, facilitant ainsi l'insertion de ce fragment dans le vecteur. L'insertion de cet adaptateur dans une des deux copies du gène encodant la pVIII du phage filamenteux (f88-4 ou un de ses dérivés) permettra, par la suite, de présenter les trois peptides complémentaires en surface du phage, en vue de tester leur éventuelle reconnaissance par l'AcMo 12G12. Lors de la conception, plusieurs contraintes ont dû être respectées:

- les trois peptides doivent se retrouver dans la même phase de lecture que la pVIII recombinante;
- de nouveaux sites de restriction ont été insérés entre les séquences encodant chacun des peptides pour permettre ensuite, par restriction, de réaliser différentes constructions où les peptides seront exprimés individuellement ou par combinaisons de deux ou de trois en surface des phages;
- toutes les constructions possibles doivent posséder la fin du peptide signal de la protéine pVIII (MLSFAA) en amont des peptides insérés, ainsi que son site de clivage (entre les deux alanines);
- enfin, au sein de chaque séquence encodant un peptide complémentaire, un ou plusieurs nucléotides ont été remplacés afin de créer de nouveaux sites de restrictions uniques, sans modifier la séquence peptidique. Ces sites permettront de discriminer les différentes constructions possibles.

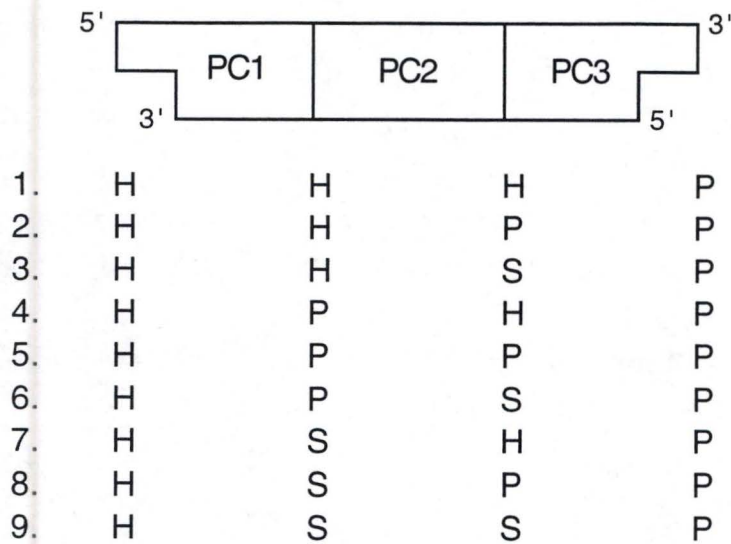
Ces différentes contraintes sont reprises sur la figure 11.

Pour pouvoir réaliser les différentes constructions où les peptides sont soit présentés seuls en surface du phage, soit par combinaisons de deux ou de trois, plusieurs sites de restrictions ont été superposés au niveau des séparations entre les séquences encodant les peptides complémentaires aux CDR 1 et 2 (PC1 et PC2), et les peptides complémentaires aux CDR 2 et 3 (PC2 et PC3). La séquence CTGCADGCTT où D est soit A, soit G, soit T, est ainsi le résultat de la superposition de sites *Hind* III, *Pst* I et *Sph* I (Figure

A.



B.



C.

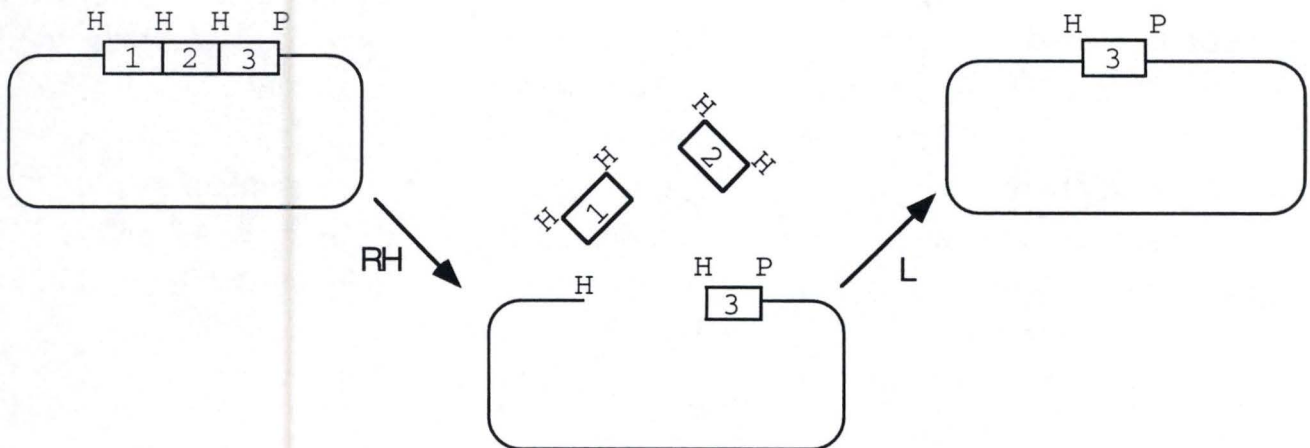


Figure 12:

(A): superposition des sites de restriction *Hind* III, *Pst* I et *Sph* I.
 (B): Représentation schématique des 9 produits possibles dans le mélange de synthèse l'oligonucléotide 12G12H. PC 1, 2 et 3 représentent respectivement les peptides complémentaires aux CDR 1, 2 et 3 de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12. H: site *Hind* III; P: site *Pst* I; S: site *Sph* I. (C): étapes permettant la présentation du PC3 seul en surface du phage, à partir de l'adaptateur n°1. RH: restriction *Hind* III. L: ligation.

12a). En effet, lorsque D=A, un site de restriction *Hind* III (AAGCTT) apparaît; lorsque D=G, un site *Pst* I (CTGCAG) est créé; et lorsque D=T, un site *Sph* I (GCATGC) est obtenu. Comme cette séquence se retrouve deux fois dans l'adaptateur (entre les peptides PC1 et PC2, et entre les peptides PC2 et PC3), lors de la synthèse chimique, c'est en réalité un mélange de neuf adaptateurs différents qui est produit (Figure 12B). Les sites *Hind* III et *Pst* I sont des sites uniques dans la séquence du vecteur sans insert. Celle-ci ne comporte aucun site *Sph* I.

Les différents constituants de ce mélange permettent chacun de réaliser au moins une construction (les numéros assignés aux différents adaptateurs ci-dessous sont ceux indiqués à la figure 12B). Par exemple, lorsque l'adaptateur n° 1 est inséré dans le génome du phage, une restriction par l'enzyme *Hind* III permet d'enlever le fragment qui encode les peptides PC1 et PC2; après ligation, seul le peptide PC3 est exprimé en surface du phage (Figure 12C). De même, quand l'adaptateur n° 2 est inséré dans le gène de la pVIII recombinante, une restriction par l'enzyme *Pst* I entraîne la perte du fragment qui code pour le peptide PC3; après ligation, les peptides PC1 et PC2 sont présentés ensemble en surface du phage. Par la suite, une restriction avec l'enzyme *Hind* III sur l'ADN de ce phage permet d'éliminer le fragment qui encode le peptide PC1; après ligation, seul le peptide PC2 est encore exprimé en surface du phage. Enfin, l'adaptateur n° 9 a un double intérêt. Tout d'abord, pour cet adaptateur, les deux codons DGC deviennent des codons TGC, qui encodent deux cystéines. Lorsque le grand peptide PC1+PC2+PC3 sera exposé au niveau de l'enveloppe en fusion avec la pVIII recombinante, ces deux cystéines pourront former un pont disulfure, et le peptide PC2 sera alors présenté sous une conformation contrainte. D'autre part, une restriction par l'enzyme *Sph* I sur ce clone permet d'éliminer le fragment qui encode le peptide PC2; après ligation, les peptides PC1 et PC3 sont exprimés en fusion avec la pVIII recombinante.

Pour les oligonucléotides n° 2, 4, 5, 6 et 8, toute restriction par l'enzyme *Pst* I entraîne non seulement la perte du fragment qui code pour le peptide PC3, mais entraîne aussi la perte d'un morceau du codon qui spécifie le premier acide aminé de la portion non recombinante de la pVIII (une proline). Lors de la conception théorique de l'adaptateur, l'ajout d'un C juste en amont des séquences CTGCADGCTT permet de prévenir la perte de cette proline suite à la

5' AGCTTTGCCGCTGAAAGTGAAACTGGGAAATCCCATGTACCTGCADGCTTTGCCGCTGTTAACTACTACC-
 3' AACGGCGACTTTCACTTTGACCCTTTAGGGTACATGGATGTHCGAAACGGCGACAATTGTGATGG-

 -GTCACTATTGGTGACGTCATACCTGCADGCTTTGCCGCTCCTACCGTTCCAAGCCATGATCCTGCA 3'
 -CAGTGATAACCCTGCAGTATGGACGTHCGAAACGGCGAGGATGGCAAGGTTCCGGTACTAGG 5'

Figure 13:

Séquence des deux oligonucléotides constituant l'adaptaeur 12G12H. L'hybridation des deux oligonucléotides génèrera des extrémités *Hind* III et *Pst* I qui pourront être liguées avec les extrémités *Hind* III et *Pst* I de la matrice phagienne restreinte. D représente A, G ou T. H représente A, C ou T.

restriction en reconstituant un codon CCT entier, quelle que soit la construction.

De même, toute restriction par l'enzyme *Hind* III qui entraîne la perte du peptide PC1, entraîne automatiquement la perte de la séquence qui code pour la fin du peptide signal. Lors de la conception théorique de l'adaptateur, l'ajout la séquence TGCCGCT en aval de la séquence CTGCADGCTT permet de prévenir la perte du peptide signal et de son site de clivage suite à une restriction par *Hind* III, quelle que soit la construction.

Enfin, certains nucléotides sont changés pour faire apparaître de nouveaux sites de restriction sans modifier la séquence en acides aminés. Plus tard (voir paragraphes 5.1.6 et 6.2), après l'amplification par PCR de la région encodant la pVIII recombinante, ces nouveaux sites de restriction permettront de diagnostiquer les différentes constructions possibles. Ainsi, au sein de la séquence encodant le peptide PC1, le codon GTG (valine) est remplacé par le codon GTA pour faire apparaître un site de restriction *Rsa* I (GTAC). Pour le peptide PC2, un site *Hpa* I (GTTAAC) est créé en changeant les codons GTA AAT (valine et asparagine) par GTT AAC. Enfin, un codon GAT est rajouté entre la fin de la séquence du peptide PC3 et la suite de la séquence de la pVIII pour faire apparaître un site *Sau* 3A (GATC).

La séquence définitive de l'adaptateur "12G12H" est montrée à la figure 13. Les deux oligonucléotides qui constituent cet adaptateur sont synthétisés individuellement par la firme Eurogentec (Liège). Plus tard, l'hybridation de ces deux oligonucléotides génèrera des extrémités protrudantes compatibles avec les extrémités *Hind* III et *Pst* I de la matrice phagienne restreinte.

5. Insertion de l'adaptateur encodant les peptides complémentaires dans le génome d'un phage filamenteux

5.1. Premières tentatives d'insertion

5.1.1. Description et préparation de la matrice.

La matrice utilisée pour l'insertion de l'adaptateur 12G12H est un phage filamenteux de type f88-4 (voir paragraphe 1.7 du matériel et méthodes). Ne possédant pas la matrice d'origine, c'est en réalité un phage contenant déjà un insert dans une des deux copies du gène de la protéine pVIII, entre les sites *Hind* III et *Pst* I, qui est utilisé pour l'insertion de l'adaptateur 12G12H.

Dans un premier temps, l'insert nucléotidique d'origine présent dans le gène de la pVIII recombinante est enlevé. Pour ce faire, une double restriction par les enzymes *Hind* III et *Pst* I est réalisée sur 2,5 µg de ce phage. Après la réaction, les endonucléases sont inactivées par extraction au phénol/chloroforme.

5.1.2. Première tentative d'insertion

L'adaptateur 12G12H a été produit sous la forme de deux simples brins d'ADN. Une étape préliminaire d'hybridation est réalisée en mélangeant 5 nmoles de chaque brin (203 µg pour le grand brin, 194 µg pour le petit) dans un tampon T₁₀E₁. Le mélange est chauffé durant cinq minutes à 95°C, puis refroidit lentement jusqu'à une température de 65°C, avant d'être transféré rapidement sur glace.

Ensuite, 200 ng de matrice restreinte sont ligués avec l'adaptateur 12G12H en différents excès molaires afin de favoriser la ligation: en excès de 3x (9,23 ng), de 20x (61,54 ng) et de 100x (307,7 ng).

Un contrôle de ligation où 200 ng de matrice restreinte sont reliqués avec l'insert d'origine, en l'absence de l'adaptateur 12G12H, est réalisé simultanément. Etant donné que l'insert d'origine et la matrice sont en quantité équimolaire, la ligation est moins favorisée par rapport aux autres ligations réalisées avec divers excès d'adaptateurs. La quantité attendue de matrice reliquée est plus faible dans ce cas, et le nombre de transformants obtenus pour ce

A. Souche K91kan d'<i>E. coli</i>	ADN	Milieu solide utilisé	Nombre de clones obtenus	Nombre de transformants par µg d'ADN
φ + 12G12H en excès 3x	20 ng φ + 0,92 ng 12G12H	LB Kan-Tet	0	0
φ + 12G12H en excès 20x	20 ng φ + 6,5 ng 12G12H	LB Kan-Tet	0	0
φ + 12G12H en excès 100x	20 ng φ + 30,8 ng 12G12H	LB Kan-Tet	0	0
Contrôle de viabilité	0	LB Kan	Tapis	/
Contrôle de transformation	0,1 ng pUC 18	LB Kan-Amp	10	1000000 (10E6)
Contrôle de transformation	5 ng φ non restreint	LB Kan-Tet	5	10000 (10E4)
Contrôle de restriction	5 ng φ restreint non ligué	LB Kan-Tet	0	0
Contrôle de ligation	20 ng φ reliqués sans 12G12H	LB Kan-Tet	0	0 !!!!!

B. Souche MC1061 d'<i>E. coli</i>	ADN	Milieu solide utilisé	Nombre de clones obtenus	Nombre de transformants par µg d'ADN
φ + 12G12H en excès 3x	20 ng φ + 0,92 ng 12G12H	LB Strepto-Tet	0	0
φ + 12G12H en excès 20x	20 ng φ + 6,5 ng 12G12H	LB Strepto-Tet	0	0
φ + 12G12H en excès 100x	20 ng φ + 30,8 ng 12G12H	LB Strepto-Tet	0	0
Contrôle de viabilité	0	LB Strepto	Tapis	/
Contrôle de transformation	0,1 ng pUC 18	LB Strepto-Amp	63	6300000 (6,3x10E6)
Contrôle de transformation	5 ng φ non restreint	LB Strepto-Tet	51	102000 (1,02x10E5)
Contrôle de restriction	5 ng φ restreint non ligué	LB Strepto-Tet	0	0
Contrôle de ligation	20 ng φ reliqués sans 12G12H	LB Strepto-Tet	0	0 !!!!!

Tableau 1:

Résultats obtenus après transformation de cellules électrocompétentes de la souche K91kan (A) et MC1061 (B) d'*E. coli*. La quantité de cellules engagées est identique pour tous les échantillons. ADN: quantité d'ADN engagé dans la transformation (un dixième des produits de ligation pour les trois tests et le contrôle de ligation). φ: matrice phagienne de type f88-4. 12G12H: produit de l'hybridation des deux oligonucléotides constituant l'adaptateur 12G12H. Le milieu contenant les cellules transformées est centrifugé pendant 5 minutes en microfuge, 900 µl environ de surnageant sont éliminés. Le culot est resuspendu avec le reste du surnageant (environ 100 µl), puis étalé sur milieu solide. Kan: kanamycine (100 µg/ml). Tet: tétracycline (20 µg/ml). Amp: ampicilline (100 µg/ml). Strepto: streptomycine (10 µg/ml). Tapis: toutes les colonies sont en contact avec d'autres.

contrôle devrait donc être inférieur à ceux obtenus pour les différents tests.

Un dixième de chaque produit de ligation est ensuite utilisé pour transformer par électroporation la souche d'*E. coli* K91kan. Plusieurs contrôles sont réalisés:

- un contrôle de viabilité, où des cellules électrocompétentes sans ADN étranger subissent toutes les étapes de la transformation et sont finalement étalées sur milieu solide sélectif pour la souche mais pas pour le plasmide ou le phage;
- un premier contrôle de transformation, où des cellules sont transformées avec 0,1 ng du vecteur plasmidique pUC18 (2686 pb) non restreint;
- un second contrôle de transformation, où un échantillon de cellules est transformé avec 5 ng d'ADN de phage non restreint. Du fait de sa plus grande taille, celui-ci rentre plus difficilement dans les cellules. De plus, le nombre de "molécules" d'ADN par unités de poids est plus faible comparé au vecteur plasmidique pUC18. Le nombre de transformants par μg d'ADN pour ce second contrôle de transformation devrait donc être plus petit par rapport au premier contrôle;
- un contrôle de restriction, où 5 ng de matrice restreinte et non reliquée sont mélangés avec un échantillon de cellules. Comme l'ADN linéaire (non reliqué) présente des taux de transformation très faibles, le nombre de transformants observés pour ce contrôle doit être très petit. Ce contrôle indique la qualité de la double restriction réalisée sur le vecteur.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1A. Etant donné l'absence de transformants pour le contrôle de ligation et les taux de transformation très faibles observés pour les deux contrôles de transformation de la souche K91kan, l'étape d'électroporation est recommencée en utilisant la souche d'*E. coli* MC1061, dont le taux de transformation par électroporation est plus élevé que celui de la souche K91kan. Les résultats de l'électroporation sont présentés dans le tableau 1B. Bien que les taux de transformation observés pour les deux contrôles de transformation soient légèrement supérieurs à ceux observés avec la souche K91kan, le contrôle de ligation est toujours insatisfaisant puisqu'aucun transformant n'est observé pour ce contrôle.

	ADN	Milieu solide utilisé	Nombre de clones obtenus	Nombre de transformants par μg d'ADN
ϕ + 12G12H en excès 3x	20 ng ϕ + 0,92 ng 12G12H	LB Strepto-Tet	2	952
ϕ + 12G12H en excès 3x *	"	LB Strepto-Tet	25	1100
ϕ + 12G12H en excès 20x	20 ng ϕ + 6,5 ng 12G12H	LB Strepto-Tet	1	380
ϕ + 12G12H en excès 20x *	"	LB Strepto-Tet	10	340
ϕ + 12G12H en excès 100x	20 ng ϕ + 30,8 ng 12G12H	LB Strepto-Tet	0	0
ϕ + 12G12H en excès 100x *	"	LB Strepto-Tet	0	0
Contrôle de viabilité	0	LB Strepto	Tapis	/
Contrôle de transformation	0,1 ng pUC 18	LB Strepto-Amp	175	17500000 (1,75x10E7)
Contrôle de transformation	5 ng ϕ non restreint	LB Strepto-Tet	32	64000 (6,4x10E4)
Contrôle de restriction	5 ng ϕ restreint non ligué	LB Strepto-Tet	0	0
Contrôle de ligation	20 ng ϕ religués sans 12G12H	LB Strepto-Tet	0	0 !!!!!

Tableau 2:

Résultats obtenus après transformation de cellules électrocompétentes de la souche MC1061 d'*E. coli*. La quantité de cellules engagées est identique pour tous les échantillons. ADN: quantité d'ADN engagé dans la transformation (un dixième des produits de ligation pour les trois tests et le contrôle de ligation). ϕ : matrice phagienne de type f88-4. 12G12H: produit de l'hybridation des deux oligonucléotides constituant l'adaptateur 12G12H. *: après avoir étalé 100 μl du milieu contenant les cellules après l'électroporation, le reste du milieu est centrifugé pendant 5 minutes sur microfuge, 850 μl environ de surnageant sont éliminés. Le culot est resuspendu avec le reste du surnageant, puis étalé sur milieu solide. Tet: tétracycline (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Amp: ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Strepto: streptomycine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Tapis: toutes les colonies sont en contact avec d'autres.

A la vue de ces résultats, il est probable que l'étape d'hybridation et/ou l'étape de ligation n'ait pas réussi. Une seconde tentative d'insertion doit être réalisée.

5.1.3. Seconde tentative d'insertion

L'étape d'hybridation des deux oligonucléotides constituant l'adaptateur 12G12H est cette fois réalisée en mélangeant 10 pmoles de chaque brin dans du tampon T₁₀E₁-KCl 50 mM. L'utilisation de plus faibles quantités d'ADN simple brin devrait permettre d'empêcher la formation hypothétique de polymères d'adaptateurs. Ensuite, la présence de sels dans le milieu de réaction devrait diminuer les répulsions entre les brins en annulant les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN.

Le mélange est chauffé cinq minutes à 95°C puis refroidit progressivement jusqu'à 65°C, avant d'être transféré rapidement sur glace.

Après la réaction, 200 ng de matrice restreinte sont ligués avec différents excès de produit d'hybridation (excès de 3x, 20x et 100x). En parallèle, 200 ng de matrice sont reliqués avec leur insert d'origine (contrôle de ligation). Un dixième de chaque produit de ligation est utilisé pour transformer par électroporation la souche MC1061. Les contrôles effectués sont les mêmes que lors de la première tentative d'insertion. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 2.

A nouveau, le contrôle de ligation n'est pas satisfaisant, car aucun transformant n'est observé pour ce contrôle. Les 38 clones obtenus après électroporation avec le produit de la ligation du phage avec l'oligonucléotide 12G12H en excès de 3x et 20x seront analysés. Pour la suite du travail, ces clones seront nommés "clones x.3" et "clones x.20", respectivement (x représente le numéro de chaque clone).

5.1.4. Analyse des clones obtenus après transformation

Afin de caractériser les différents clones obtenus après transformation avec les produits de ligation, des PCR sur colonies sont réalisées. Celles-ci doivent permettre d'amplifier la région du génome phagien qui comporte l'insert nucléotidique étranger (voir paragraphe 1.10 du matériel et méthodes).

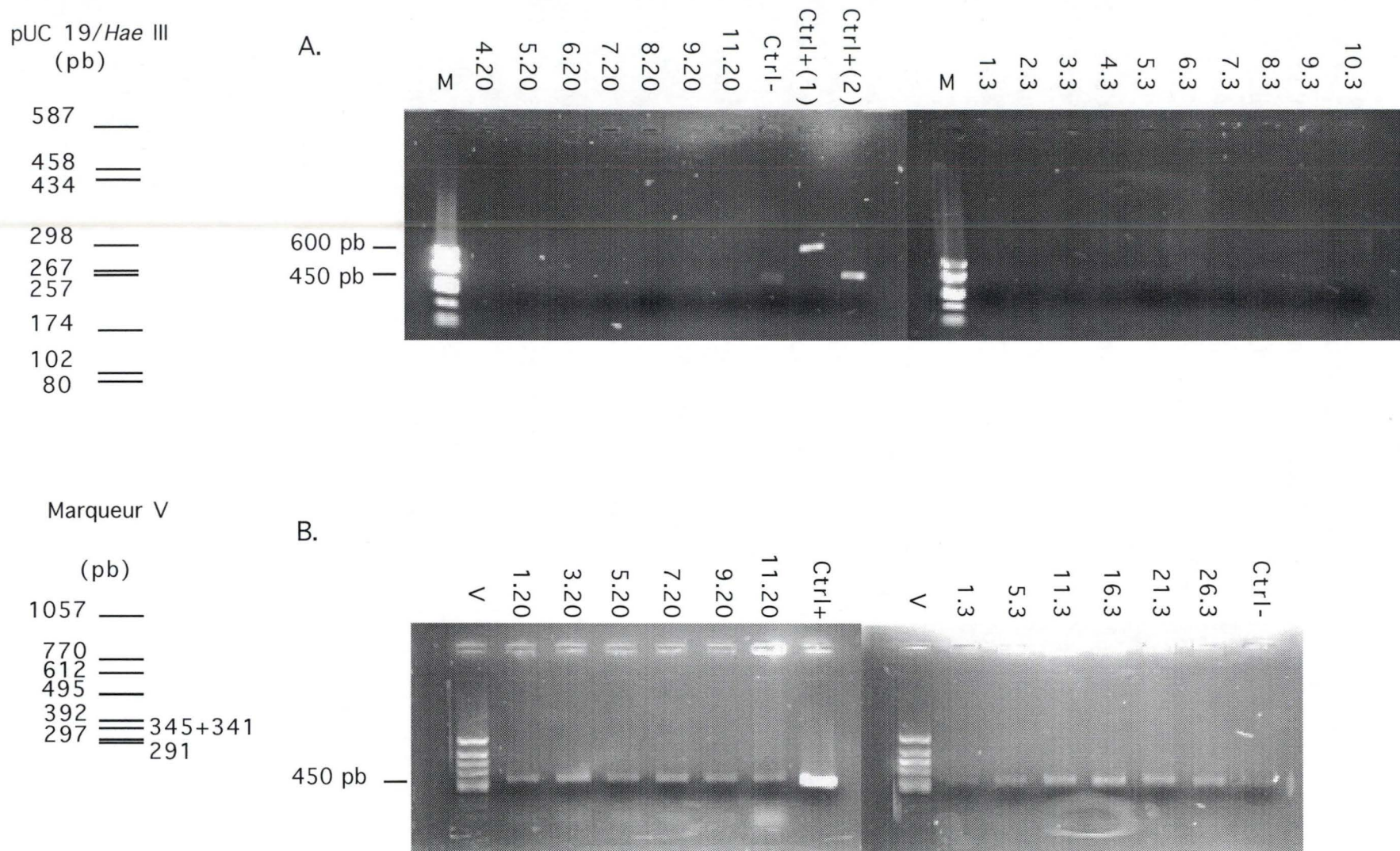


Figure 14:

Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits de PCR sur colonies pour 17 clones de la souche MC1061 (A) et pour 12 clones de la souche K91kan (après infection). Le nom des clones est indiqué au-dessus de chaque puit. Ctrl-: contrôle négatif. Ctrl+(1): premier contrôle positif (ADN simple brin d'un phage). Ctrl+(2): second contrôle positif (colonie infectée par le phage "2C8"). Marqueurs de taille: pUC19 restreint par *Hae* III (A), marqueur V (B).

Dans un premier temps, 35 des 38 clones obtenus sont soumis à la PCR sur colonies. Deux contrôles positifs sont effectués en même temps, dans des conditions identiques. Pour le premier contrôle, une préparation d'ADN phagien simple brin est utilisée. La PCR devrait entraîner l'amplification d'un fragment de 600 pb environ. Le second contrôle positif utilise une colonie infectée par un phage porteur d'un peptide de séquence connue (le phage "2C8"), utilisé au laboratoire dans le cadre d'autres applications. La PCR sur ce phage devrait entraîner l'amplification d'un fragment de 450 pb. Un contrôle négatif, sans ADN phagien, est également réalisé.

Après la réaction, les produits amplifiés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. Les résultats obtenus pour 17 des 35 clones sont montrés à la figure 14A. L'apparition d'une bande correspondant à un fragment d'une taille de 600 et 450 pb respectivement pour les deux contrôles positifs témoigne d'une amplification réussie. L'amplification de l'insert nucléotidique porté par les 17 clones testés semble par contre avoir échoué.

Il est intéressant de noter que la colonie utilisée comme second contrôle positif est de la souche K91kan, tandis que les 35 clones étudiés sont de la souche MC1061 (utilisée pour l'étape d'électroporation en raison de ses taux de transformation plus élevés).

Afin de vérifier si l'échec des amplifications par PCR sur colonies est lié à la souche bactérienne hôte, des échantillons de cellules de souche K91kan sont infectés avec les phages produits par la souche MC1061.

5.1.5. Infections de la souche K91kan d'*E. coli* et PCR sur colonies.

En vue d'une première tentative d'infection, les 35 clones sont cultivés individuellement dans des tubes de microfuge contenant 750 μ l de milieu liquide riche (2YT). Après une nuit à 37°C, sous agitation, les surnageants de cultures sont récupérés puis traités au PEG/NaCl, pour précipiter les particules phagiennes. Après centrifugation, les surnageants sont éliminés et les culots contenant les phages sont resuspendus dans du TBS 1x-azide 0,02%. Un échantillon de chaque préparation de phages est dilué 1000x, puis utilisé pour infecter des cellules "Terrific Broth" de la souche K91kan. Un dixième du volume des produits d'infection (100 μ l) est finalement étalé sur milieu LB

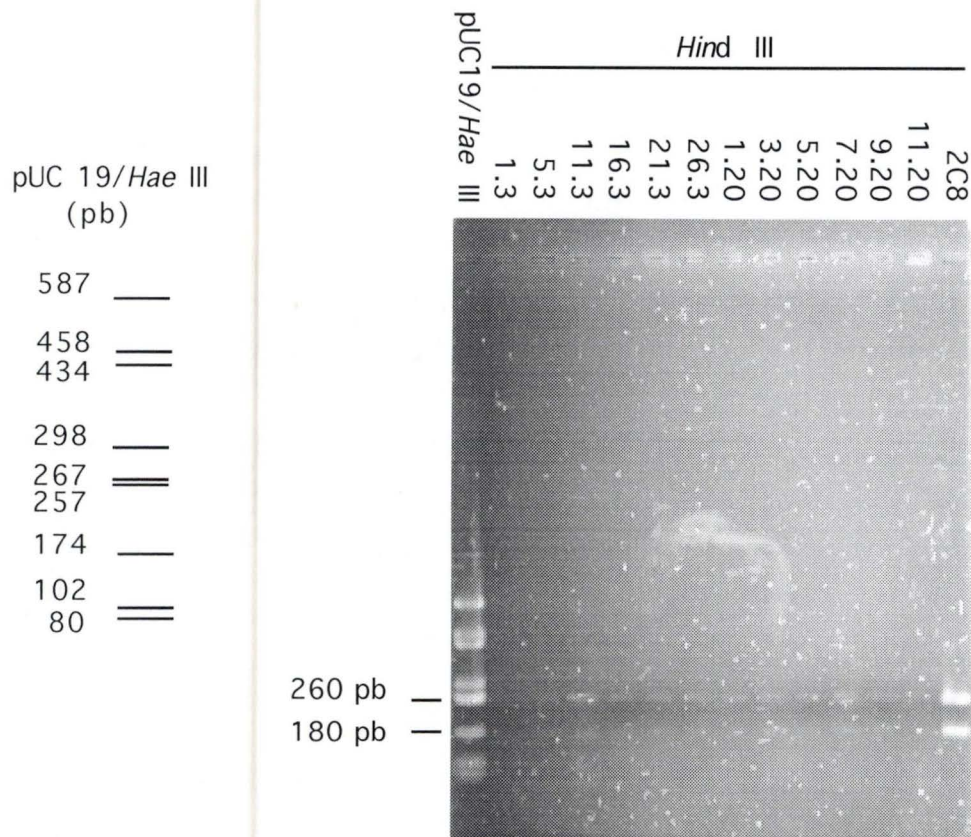


Figure 15:

Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits de restrictions par l'enzyme *Hind* III sur les produits PCR de douze clones. 2C8: phage utilisé comme contrôle positif pour la PCR, restreint par *Hind* III.
 Marqueur de taille: pUC 19 restreint par *Hae* III.

solide contenant 20 $\mu\text{g/ml}$ de tétracycline et 100 $\mu\text{g/ml}$ de kanamycine. Après une nuit à 37°C, aucune colonie infectée n'est détectée.

Une seconde production de phages est réalisée. Les clones 1.3, 5.3, 11.3, 16.3, 21.3, 26.3 et les clones 1.20, 3.20, 5.20, 7.20, 9.20 et 11.20 sont cultivés dans des tubes de 25 ml contenant environ 5 ml de milieu liquide riche (2YT). Après une nuit à 37°C, sous forte agitation, les surnageants de cultures sont récupérés. Ils sont utilisés tels quels pour infecter des échantillons de cellules K91kan "Terrific Broth". Finalement, 100 μl de chaque échantillon de cellules infectées est étalé sur milieu solide avec tétracycline et kanamycine. Après une nuit à 37°C, de nombreuses colonies infectées (plus de 1000 colonies) sont observées pour chacun des surnageants de cultures des douze clones de départ. Un isolement est réalisé pour chacun de ces clones.

De nouvelles PCR sont réalisées sur une colonie de chaque clone. Deux contrôles sont effectués simultanément: un contrôle positif, à partir d'une colonie de souche K91kan infectée par le phage "2C8"; un contrôle négatif, sans ADN phagien à amplifier. Après la réaction, les produits sont analysés sur gel d'agarose (Figure 14B). L'apparition d'une bande correspondant à un fragment de 450 pb environ pour les douze clones étudiés témoigne d'une amplification réussie, bien que faible dans certains cas.

A l'issue de ces expériences, il semble bien que la souche bactérienne hôte ait une influence sur le succès de l'amplification par PCR de l'insert nucléotidique porté par les phages infectants.

5.1.6. Analyse et séquençage de l'insert nucléotidique porté par les phages

Dans un premier temps, les produits de la PCR effectuée pour les douze clones sont analysés par restrictions enzymatiques.

Pour chacun de ces clones et pour le contrôle positif, un échantillon de produit PCR est restreint par l'enzyme *Sph* I. En parallèle, un échantillon de ces mêmes produits PCR est restreint par l'enzyme *Hind* III. Les produits de restrictions sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (non montré). Aucun de ces treize produits PCR n'est restreint par l'enzyme *Sph* I, alors que

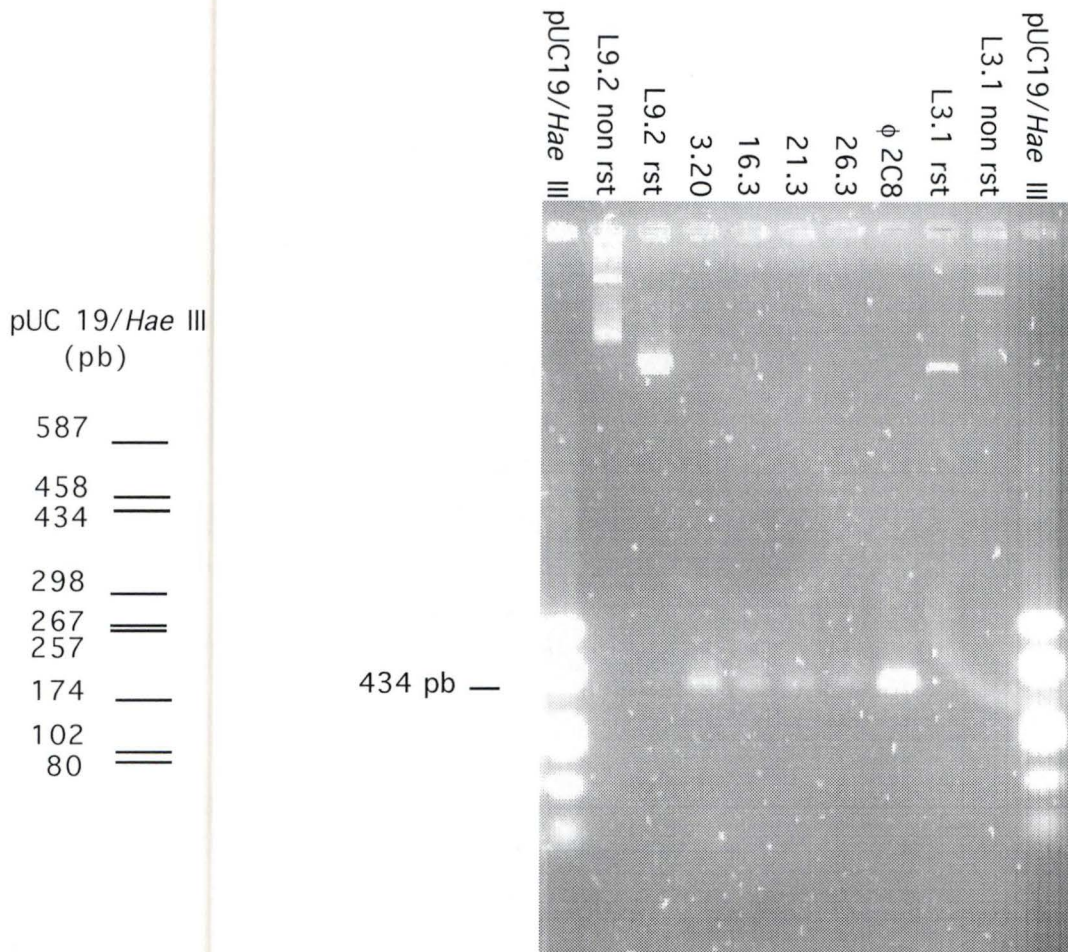


Figure 16:

Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits de restriction par *Hpa* I sur les produits de quatre clones et du phage "2C8". Le nom des clones est indiqué au-dessus de chaque puit. Contrôles positifs: échantillon d'une midipréparation d'ADN plasmidique des clones L3.1 et L9.2 (rst= restreint par *Hpa* I; non rst= non restreint par *Hpa* I). Marqueur de taille: pUC19 restreint par *Hae* III.

statistiquement, cinq adaptateurs 12G12H sur neuf devraient posséder au moins un site de restriction *Sph* I après synthèse chimique (Figure 12). Sur le second gel, suite au traitement par l'enzyme *Hind* III, un seul et même profil de restriction commun à tous les produits de PCR est observé (Figure 15). En effet, on observe deux bandes pour tous les clones, ce qui signifie que tous les produits PCR contiennent un site *Hind* III. Or statistiquement, parmi les neuf adaptateurs 12G12H synthétisés, cinq doivent comporter au moins deux sites *Hind* III (l'un d'eux étant le site terminal qui se lie avec l'extrémité du phage restreint par la même enzyme).

Ces deux expériences semblent évoquer la présence d'un phage contaminant. Afin de tester cette hypothèse, la séquence de l'insert nucléotidique porté par les clones 16.3, 21.3, 26.3 et 3.20 est déterminée par séquençage manuel sur produits PCR (voir le paragraphe 1.11.2 du matériel et méthodes).

Parallèlement à la réaction de séquençage, une restriction par l'enzyme *Hpa* I est réalisée sur les produits PCR de ces quatre clones et du contrôle positif de PCR (phage "2C8"). L'adaptateur 12G12H comporte en effet un site de restriction *Hpa* I au sein du fragment encodant le peptide PC2. Un échantillon des midipréparations d'ADN plasmidique des clones L9.2 et L3.1, décrites au paragraphe 2 des résultats, est utilisé comme contrôle de restriction (l'insert nucléotidique porté par ces deux clones contient en effet un site de restriction *Hpa* I unique). L'analyse du gel d'électrophorèse révèle deux profils de migration différents selon que les midipréparations L9.2 et L3.1 sont traitées ou non avec l'endonucléase, ce qui témoigne d'une restriction réussie (Figure 16). Par contre, aucun des produits PCR des quatre clones étudiés n'est restreint par *Hpa* I. L'insert porté par les phages n'est donc pas l'adaptateur 12G12H.

L'analyse du gel de séquençage confirme que les clones 3.16, 3.21, 3.26 et 20.3 contiennent le même insert nucléotidique que le phage "2C8", utilisé comme contrôle positif de PCR.

A la vue de ces résultats, aucun des quatre phages analysés par séquençage, et vraisemblablement aucun des 38 clones obtenus après l'électroporation, ne porte l'adaptateur 12G12H. C'est pourquoi deux nouvelles tentatives d'insertion vont être réalisées en parallèle.

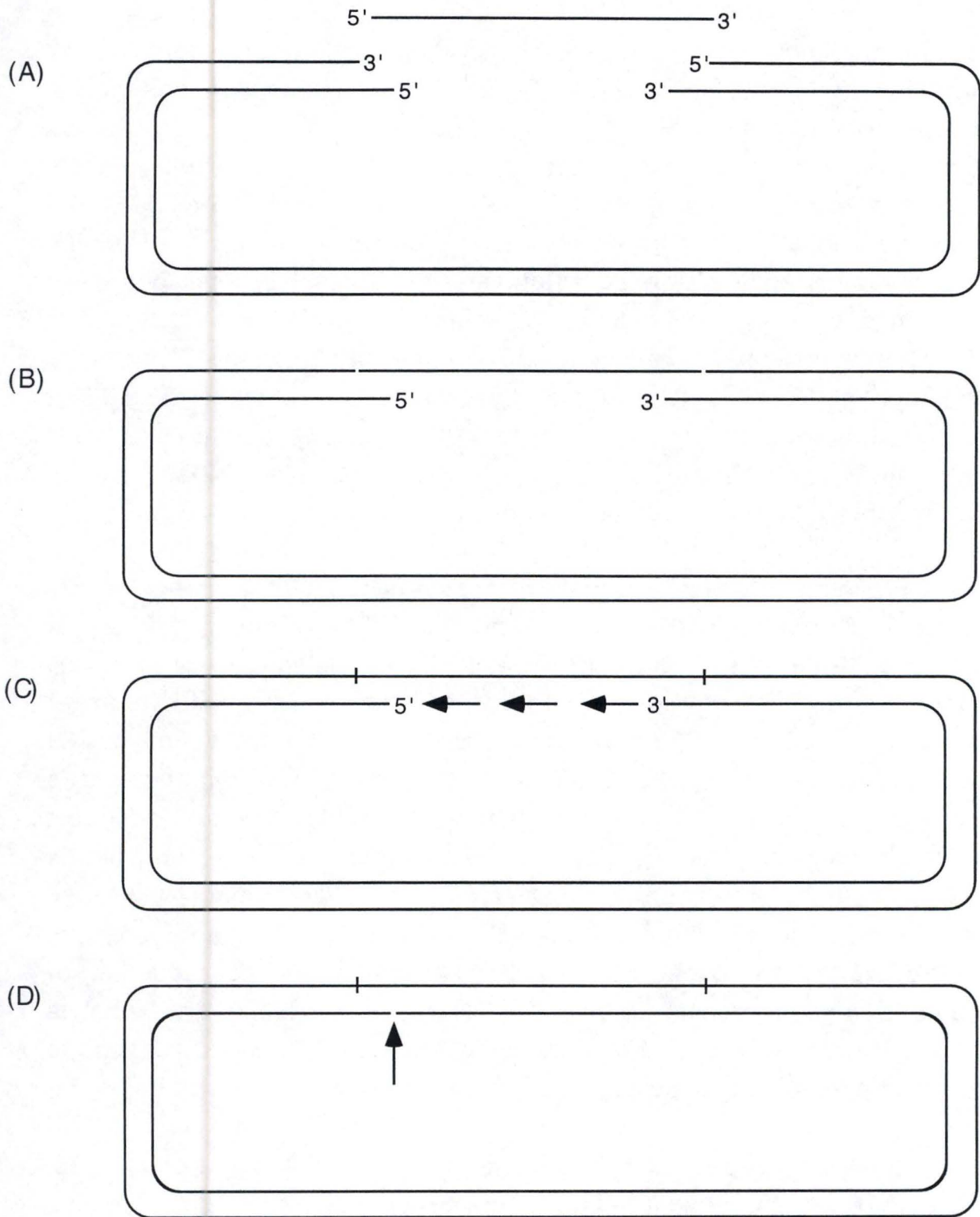


Figure 17:

Représentation schématique de l'insertion d'un oligonucléotide simple brin dans un vecteur double brin. (A): le vecteur est restreint par deux endonucléases générant respectivement une extrémité 5' protrudante (comme *Hind* III) et une extrémité 3' protrudante (comme *Pst* I). (B): l'oligonucléotide simple brin s'hybride avec les extrémités du vecteur. (C): après ligation, le brin complémentaire est synthétisé *in vitro* par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. (D): l'adaptateur double brin est inséré dans le vecteur. La flèche indique la coupure qui demeure dans le brin néosynthétisé.

5.2. Troisième et quatrième tentatives d'insertion

Afin de contourner les problèmes éventuels liés à l'étape d'hybridation des deux oligonucléotides constituant l'adaptateur 12G12H, nous avons utilisé une méthode qui permet l'insertion d'un oligonucléotide simple brin dans un vecteur lorsque celle-ci se fait au moyen de deux sites comme *Hind* III et *Pst* I (Mounts *et al.*, 1989). En effet, la coupure d'un double brin d'ADN par l'enzyme *Hind* III génère des extrémités simple brin 5' protrudantes. Une restriction par l'enzyme *Pst* I génère quant à elle des extrémités simple brin 3' protrudantes. Les extrémités 5' et 3' de l'oligonucléotide (simple brin) peuvent donc s'hybrider avec les extrémités protrudantes du vecteur doublement restreint par les enzymes *Hind* III et *Pst* I (Figure 17). Les extrémités cohésives sont ensuite liguées par une ADN-ligase. Le brin complémentaire est alors synthétisé *in vitro* par le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I d'*E. coli*, et le produit de la réaction est utilisé pour transformer des cellules électrocompétentes d'une souche d'*E. coli*.

Ainsi, 800 ng de matrice phagienne restreinte par les enzymes *Hind* III et *Pst* I sont ligués avec 400 ng du grand brin de l'adaptateur 12G12H par l'ADN-ligase du phage T4 (Boehringer Mannheim). Après la réaction, le produit de ligation est précipité puis resuspendu dans de l'eau distillée stérile. Une moitié du produit de ligation est alors incubée 30 minutes à 22°C avec le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I (1 µl à 2 U/µl, Boehringer Mannheim) pour synthétiser le brin complémentaire, et reformer une matrice circulaire double brin. Toutefois, l'extrémité 5' du brin synthétisé par le fragment de Klenow ne peut être liguée avec l'extrémité 3' de la matrice puisque le fragment de Klenow ne possède pas d'activité ligase (ces extrémités seront liguées *in vivo*, après transformation). Après précipitation, le produit de la réaction est resuspendu dans 10 µl de T₁₀E₁. Un échantillon de cellules électrocompétentes de la souche MC1061 est transformé avec 5 µl de ce mélange. Après une nuit à 37°C, aucun transformant n'est observé. Mais comme nous ne disposons d'aucun contrôle de ligation, aucune conclusion ne peut être tirée à l'issue de cette troisième tentative d'insertion.

Une quatrième tentative est réalisée en vue d'insérer l'adaptateur 12G12H dans le gène de la pVIII recombinante d'un phage. Deux

A.

H 5' TAT GCT AAG CTT TGC CGC T 3'

P 5' CT CGG ACT GCA GGA TCA 3'

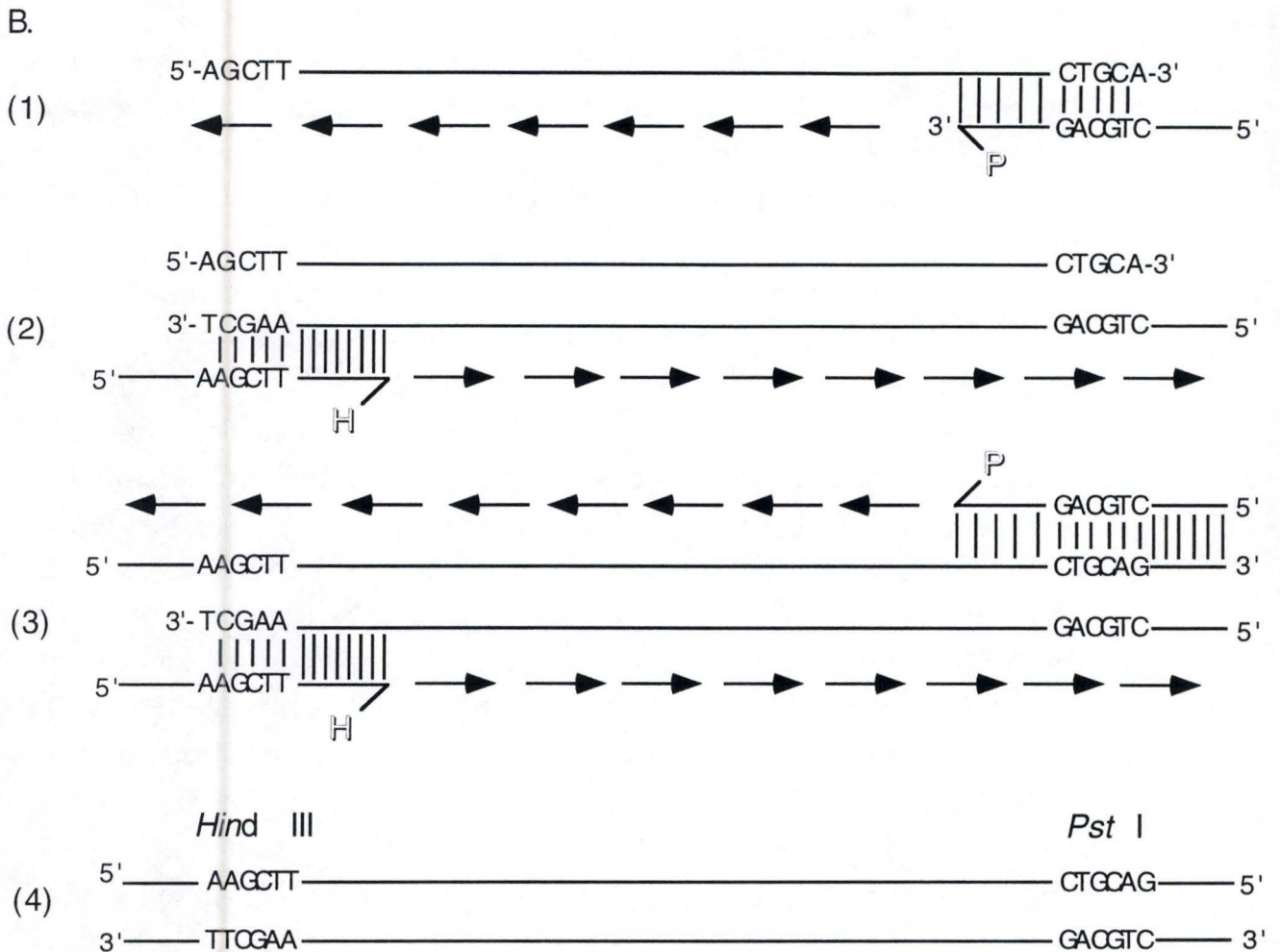


Figure 18:

A. Séquence des deux amorces utilisées pour l'amplification du grand brin de l'adaptateur 12G12H. Les sites de restriction qu'elles contiennent sont soulignés.

B. Représentation schématique de l'amplification par PCR du grand brin de l'adaptateur 12G12H. (1): une portion de l'amorce P s'hybride à l'extrémité 3' du grand brin de 12G12H; le brin complémentaire est synthétisé. (2): une portion de l'amorce H s'hybride à l'extrémité 3' du brin néosynthétisé; le brin complémentaire est synthétisé. (3): deux nouveaux brins sont synthétisés. (4): produit de l'amplification, double brin, avec de nouveaux site *Hind* III et *Pst* I aux extrémités.

amorces nucléotidiques, les amorces "H" et "P", sont conçues (Figure 18.A). La portion 3' de l'amorce "P" est complémentaire de extrémité 3' du long brin de l'adaptateur 12G12H. La portion 5' de cette amorce comporte quant à elle une séquence qui restaure un site de restriction *Pst* I entier. La portion 3' de l'amorce "H" s'hybride quant à elle au niveau de l'extrémité 3' du brin complémentaire à l'oligonucléotide 12G12H 5'-3', tandis que la portion 5' comporte une séquence qui restaure un site de restriction *Hind* III entier. A partir de ces amorces, une PCR sur le grand oligonucléotide de l'adaptateur 12G12H est réalisée afin de générer une grande quantité d'adaptateur 12G12H double brin, avec de nouveaux sites de restriction *Hind* III et *Pst* I aux extrémités (Figure 18). Après l'amplification, les produits seront restreints par les enzymes *Hind* III et *Pst* I, puis ligués avec une matrice phagienne. Le produit de ligation sera alors utilisé pour transformer par électroporation des cellules de la souche MC1061.

La réaction d'amplification se déroule comme suit:

- 3 minutes à 95°C
- 10x (1 minute à 95°C/ 1 minute à 35°C/ 1 minute à 72°C)
- 30x (1 minute à 95°C/ 1 minute à 60°C/ 1 minute à 72°C)
- 5 minutes à 72°C

Le but des dix premiers cycles de la PCR est de générer une petite quantité d'adaptateur 12G12H double brin qui servira de matrice à amplifier pour la seconde partie de la réaction. Lors de cette première partie de la PCR, les amorces "P" et "H" ne peuvent s'hybrider que sur les dix et les treize bases, respectivement, du grand brin 12G12H qui leur sont complémentaires (Figure 17). C'est pourquoi la température d'hybridation au cours des 10 premiers cycles est de 35°C. Mais dès que la réaction a généré suffisamment de produit double brin, les amorces peuvent s'hybrider totalement sur la matrice. La température d'hybridation peut donc être augmentée.

Lors d'un premier essai, la réaction est réalisée avec quatre quantités différentes du long brin de l'adaptateur 12G12H: 300 pmoles, 30 pmoles, 3 pmoles et 0,3 pmoles. Pour chaque amplification, 100 pmoles de chaque amorce sont utilisées. L'amplification d'un échantillon de produit PCR du clone 16.3 décrit au paragraphe 5.1.6 servira de contrôle positif pour la réaction (les

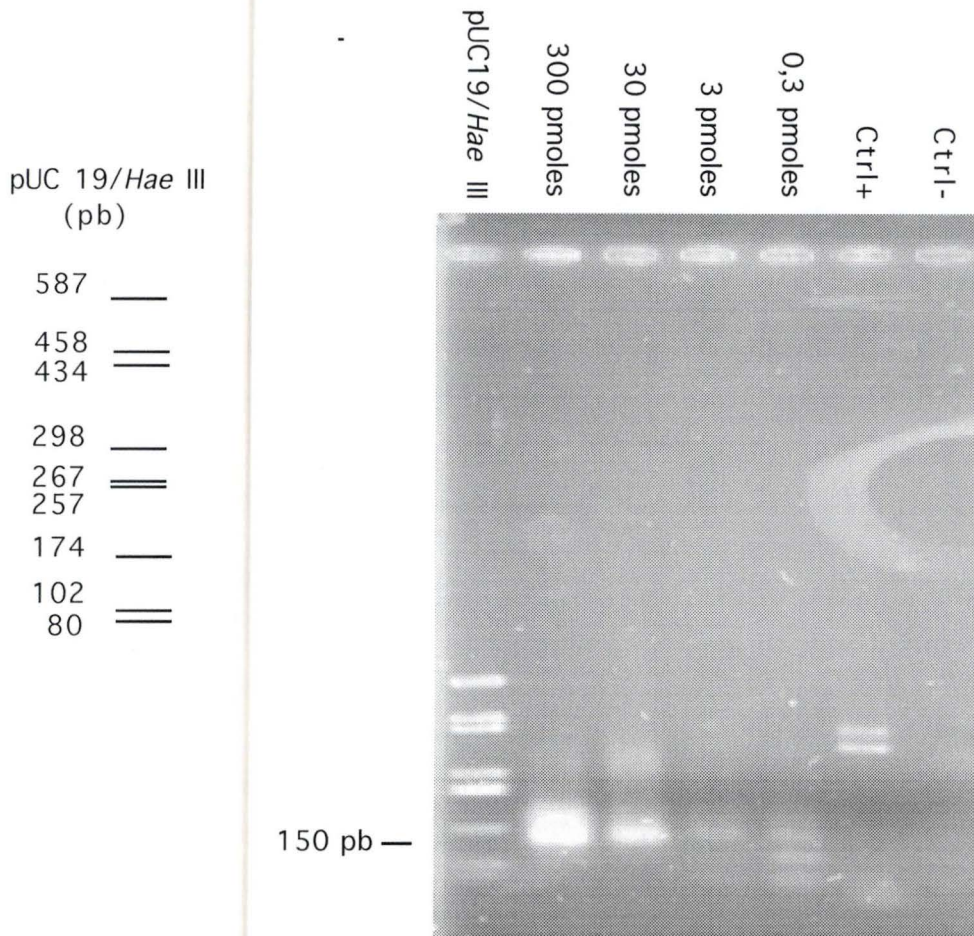


Figure 19:

Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits de la PCR sur le grand brin de l'oligonucléotide 12G12H. Pour chaque produit, la quantité d'ADN engagé dans la réaction est indiquée. Ctrl+: contrôle positif. Ctrl-: contrôle négatif. Marqueur de taille: pUC19 restreint par *Hae* III.

amorces utilisées pour ce contrôle sont les mêmes que celles qui avaient été utilisées pour les PCR sur colonies).

Après la réaction, les différents produits sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 19). La présence de deux bandes de tailles correspondant respectivement à des fragments de 430 et de 380 pb environ témoigne d'une amplification réussie mais non spécifique dans le cas du contrôle positif. Pour l'amplification du grand oligonucléotide 12G12H, une bande correspondant à un fragment d'une taille de 155 pb environ est observable pour les quatre échantillons. L'épaisseur de cette bande est cependant fonction de la quantité d'ADN simple brin engagée dans la réaction. De plus, lorsque la quantité d'ADN simple brin utilisée est inférieure ou égale à 3 pmoles, plusieurs bandes correspondant probablement à des polymères d'amorces apparaissent.

Avant les étapes de restriction et de ligation, il est nécessaire de purifier les produits de la PCR, afin d'éliminer le reste des amorces, les nucléotides et les sels présents dans le mélange de réaction. Un premier essai de purification au moyen du kit "Wizard PCR Preps DNA Purification System" (Promega) entraîne la perte d'une grande partie des produits amplifiés.

Plusieurs tests de purification sur des petites colonnes contenant 1 ml de biogel P10 sont réalisées sur un produit d'amplification à partir de 30 pmoles du grand brin 12G12H. La quantité de matériel perdu après purification au moyen de ces colonnes est en effet moins importante qu'avec le kit "Wizard PCR Preps DNA Purification System". A l'issue de ces expériences, il apparaît cependant que la quantité d'ADN récupérée après un second passage sur colonne (après une restriction) est trop faible pour permettre la ligation avec la matrice phagienne et la détection de transformants. Ceci est vraisemblablement lié à la plus petite taille des produits restreints qui sont alors retenus dans le gel.

Une nouvelle amplification est donc réalisée à partir de 300 pmoles du grand oligonucléotide de l'adaptateur 12G12H dans le but de générer une quantité importante de produit PCR double brin. La moitié du produit de réaction est purifié sur une colonne contenant 250 μ l de biogel P10. Une double restriction par les enzymes *Hind* III et *Pst* I est ensuite réalisée sur deux échantillons de produit PCR purifié et non purifié (entre 0,5 et 1 μ g environ), et également sur 5 μ g d'une préparation de phage f88-4 recombinant (voir le paragraphe 1.7 du

	ADN	Milieu solide utilisé	Nombre de clones obtenus	Nombre de transformants par μg d'ADN
Echantillon 1	83 ng ϕ + 37 ng 12G12H	LB Strepto-Tet	4	482
Echantillon 1 *	"	LB Strepto-Tet	61	816
Echantillon 2	83 ng ϕ + 37 ng 12G12H	LB Strepto-Tet	3	361
Echantillon 2 *	"	LB Strepto-Tet	62	830
Echantillon 3	66 ng ϕ + 29,6 ng 12G12H	LB Strepto-Tet	3	455
Echantillon 3 *	"	LB Strepto-Tet	28	471
Contrôle de viabilité	0	LB Strepto	Tapis	/
Contrôle de transformation	0,1 ng pUC 18	LB Strepto-Amp	>1000	>10E8
Contrôle de transformation	5 ng ϕ non restreint	LB Strepto-Tet	500	1000000 (10E6)
Contrôle de ligation	83 ng ϕ reliqués sans 12G12H	LB Strepto-Tet	1	120
Contrôle de ligation *	83 ng ϕ reliqués sans 12G12H	LB Strepto-Tet	20	268

Tableau 3:

Résultats obtenus après transformation de cellules électrocompétentes de la souche MC1061 d'*E. coli*. La quantité de cellules engagées est identique pour tous les échantillons. ADN: quantité d'ADN engagée dans la transformation. ϕ : matrice phagienne de type f88-4. 12G12H: produit de la PCR sur 300 pmoles du grand brin de l'oligonucléotide 12G12H. *: après avoir étalé 100 μl du milieu contenant les cellules après l'électroporation, le reste du milieu est centrifugé pendant 5 minutes en microfuge, 850 μl environ de surnageant sont éliminés. Le culot est resuspendu avec le reste du surnageant, puis étalé sur milieu solide. Tet: tétracycline (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Amp: ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Strepto: streptomycine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Tapis: toutes les colonies sont en contact avec d'autres.

matériel et méthodes). Après la réaction, les endonucléases sont inactivées par extraction au phénol/chloroforme.

Un échantillon de matrice restreinte (f88-4, environ 1 µg) est ligué avec 450 ng de produit PCR (purifié sur colonne et restreint) au moyen du "DNA Rapid Ligation Kit" (Boehringer Mannheim). Parallèlement, un second échantillon de matrice restreinte (1 µg) est reliqué avec son insert d'origine, en l'absence du produit PCR restreint (contrôle de ligation). Trois échantillons du produit de ligation sont utilisés pour transformer trois échantillons d'une nouvelle préparation de cellules électrocompétentes de la souche MC1061. Un échantillon du produit de ligation de la matrice avec son insert d'origine est utilisé pour transformer un quatrième échantillon de cellules électrocompétentes. Les résultats de la transformation sont présentés au tableau 3.

Pour la première fois, un contrôle de ligation satisfaisant est observé. De plus, environ 150 clones potentiellement intéressants sont obtenus.

6. Infections et criblage des clones obtenus

6.1. Infections et PCR sur colonies

La boîte contenant les 61 colonies (tableau 3, "échantillon 1*") est raclée avec 2 ml de milieu liquide riche (2YT). Le milieu est ensuite transféré dans un tube stérile de 25 ml. Le volume est porté à 10 ml avec du milieu 2YT. De la streptomycine et de la tétracycline (10 µg/ml et 20 µg/ml, respectivement) sont ajoutées au milieu. La culture est incubée à 37°C, sous forte agitation. Après sept heures d'incubation, un échantillon du surnageant de culture est utilisé à différentes dilutions pour infecter des cellules "Terrific Broth" de la souche K91kan. Un dixième du volume final de chaque infection est étalé sur milieu LB solide contenant 100 µg/ml de kanamycine et 20 µg/ml de tétracycline. Des colonies isolées sont observables à partir d'une dilution 10³. Pour une dilution 10⁴, 274 clones sont obtenus. Douze de ces clones sont isolés. Pour la suite du travail, ces clones seront nommés "clones x.1".

D'autres infections sont réalisées individuellement pour 26 clones de la boîte contenant 62 colonies (tableau 3, "échantillon 2 Ct"). Pour chaque infection, un clone est isolé. Les 26 clones isolés sont nommés "clones x.2".

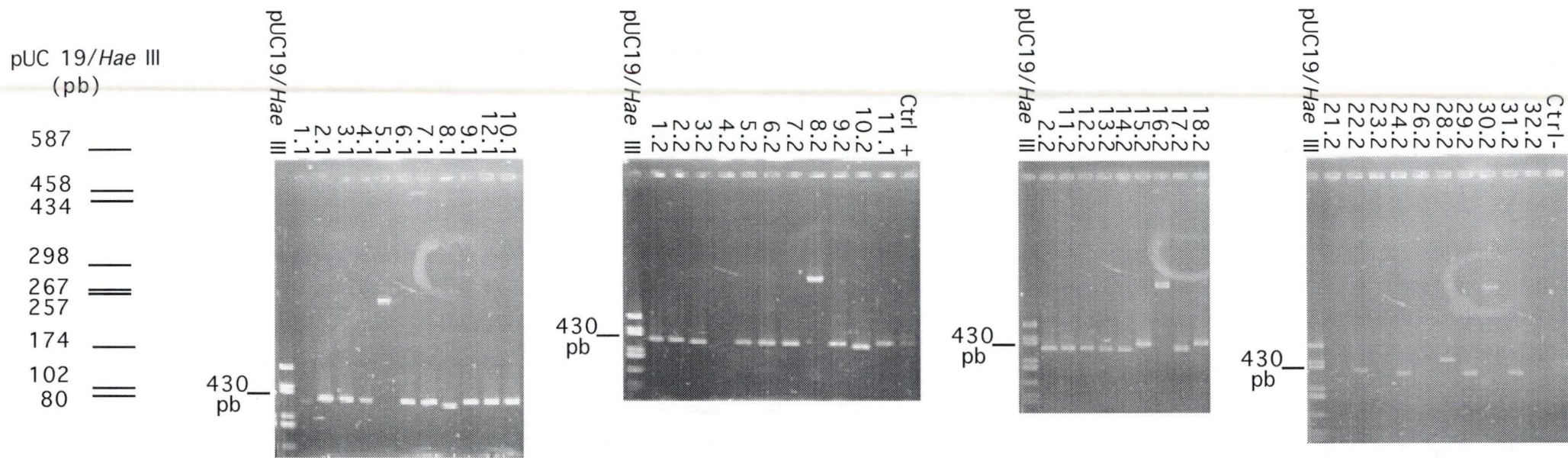


Figure 20:

Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits des PCR sur colonies de la souche K91kan. Marqueur de taille: pUC19 restreint par l'enzyme *Hae* III. Le nom des clones est indiqué au-dessus des puits.

Ctrl-: contrôle négatif. Ctrl+: contrôle positif.

Des PCR sur colonies sont réalisées sur l'ensemble des clones infectés isolés (les 12 clones x.1 et les 26 clones x.2). Les produits de la réaction sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 20). Des bandes correspondant à des fragments de tailles différentes sont observés pour plusieurs clones.

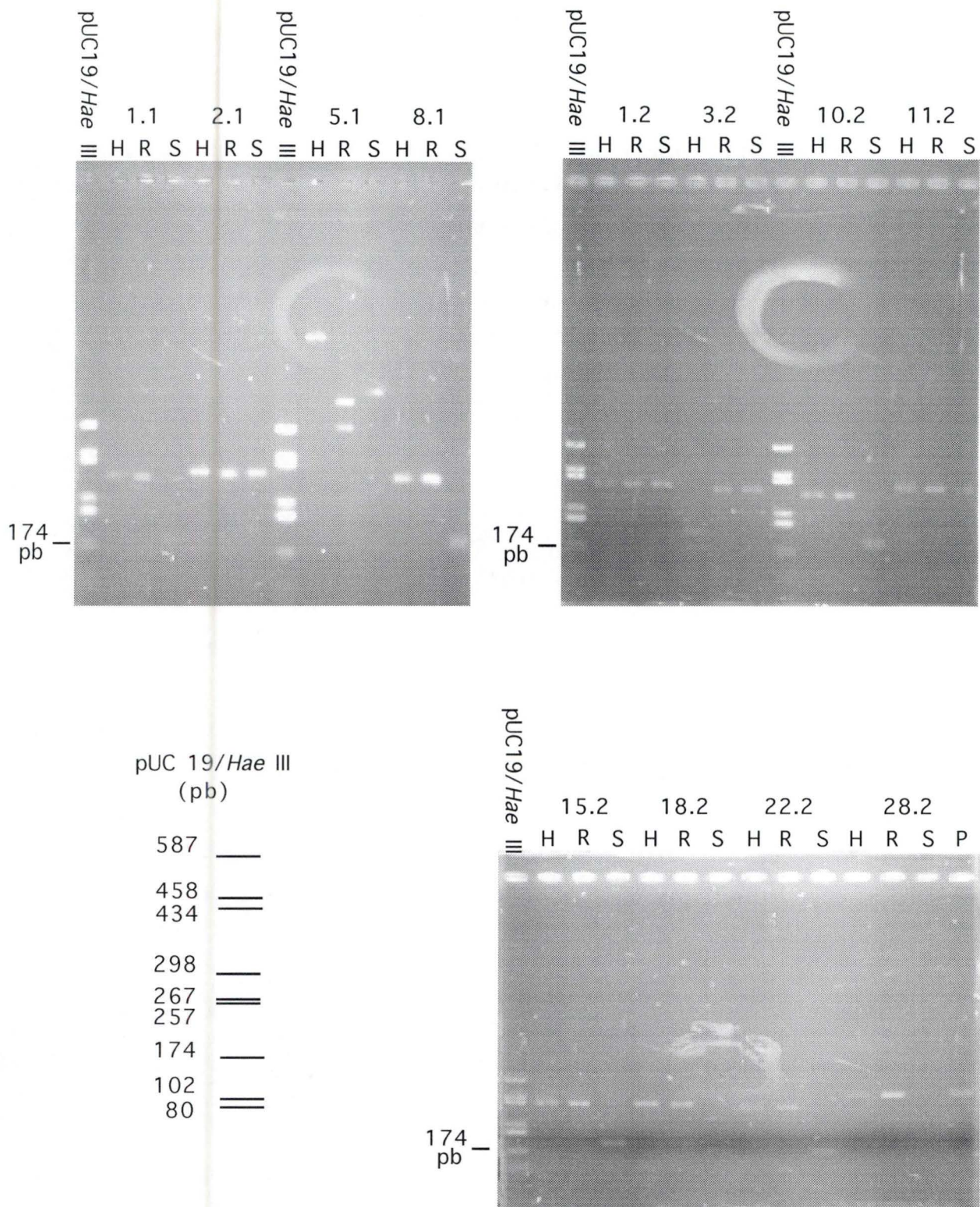


Figure 21:

Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits de restriction par *Hpa* I (H), *Rsa* I (R) et *Sau* 3A (S) sur les produits des PCR sur colonies. Le nom des clones est indiqué au-dessus des puits. Une restriction supplémentaire par *Sph* I (P) a été réalisée pour le clone 28.2. Marqueur de taille: pUC19 restreint par *Hae* III.

6.2. Analyse de l'insert nucléotidique des phages par restrictions enzymatiques

Sur base du profil de migration de leurs produits PCR respectifs, plusieurs clones sont sélectionnés en vue d'une étude plus fine. Les produits PCR des clones 1.1, 2.1, 5.1, 8.1, 11.1, 1.2, 3.2, 10.2, 15.2, 18.2, 22.2 et 28.2 sont ainsi restreints au moyen des enzymes *Rsa* I, *Hpa* I et *Sau* 3A. Un tableau récapitulatif présentant les fragments théoriquement obtenus après restriction par *Rsa* I, *Hpa* I et *Sau* 3A pour chacune des neuf constructions attendues est disponible en annexe 6 et est repris sur le signet.

Une restriction *Sph* I supplémentaire est réalisée pour le clone 28.2, dans le but de vérifier si ce clone est bien porteur de l'insert qui encode les trois peptides complémentaires, et s'il comporte ou non un voire deux sites *Sph* I (et donc aucune, une ou deux cystéines). La taille du fragment obtenu après PCR correspond en effet à celle attendue après amplification sur un phage portant l'insert encodant les trois peptides PC 1, 2 et 3.

Après la réaction, les produits restreints sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 21). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant. Le signe "+" signifie que le produit PCR est restreint, le signe "-" signifie que le produit PCR n'est pas restreint.

Clone	<i>Hpa</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3A
1.1	-	-	+
2.1	-	-	-
5.1	-	+	+
8.1	-	-	+
11.1	-	-	-
1.2	-	-	-
3.2	+	-	-
10.2	-	-	+
15.2	-	-	+
18.2	-	-	+
22.2	-	-	+
28.2	-	-	+

Une restriction par *Sau* 3A (spécifique au fragment encodant le peptide PC3) est constatée pour plusieurs clones. Cependant, seuls les

clones 1.1, 8.1, 10.2 et 22.2 présentent une bande correspondant à un fragment d'une taille de 180 pb, ce qui est la taille attendue pour la construction comportant la séquence qui encode le peptide PC3 (180 pb). Parmi ces clones, le clone 10.2 est sélectionné pour être produit, testé et séquencé. Parmi les autres clones dont les produits PCR sont restreints par *Sau* 3A sans montrer la bande à 180 pb, les clones 18.2 et 28.2 (qui contre toute attente n'est restreint que par cette enzyme) sont aussi sélectionnés.

Le profil observé pour le clone 3.2 correspond quant à lui à celui attendu pour la construction comportant le peptide PC2 avec l'apparition sur gel de deux bandes correspondant respectivement à des fragments longs de 210 et 160 pb environ. Le clone 3.2 est donc également sélectionné en vue des tests fonctionnels et du séquençage.

7. Production des phages pour quatre clones, tests fonctionnels et séquençage

Parmi les douze clones analysés par les différentes restrictions, quatre clones sont donc sélectionnés en vue des étapes ultimes de production des phages, des tests fonctionnels et du séquençage.

7.1. Production et quantification de quatre phages

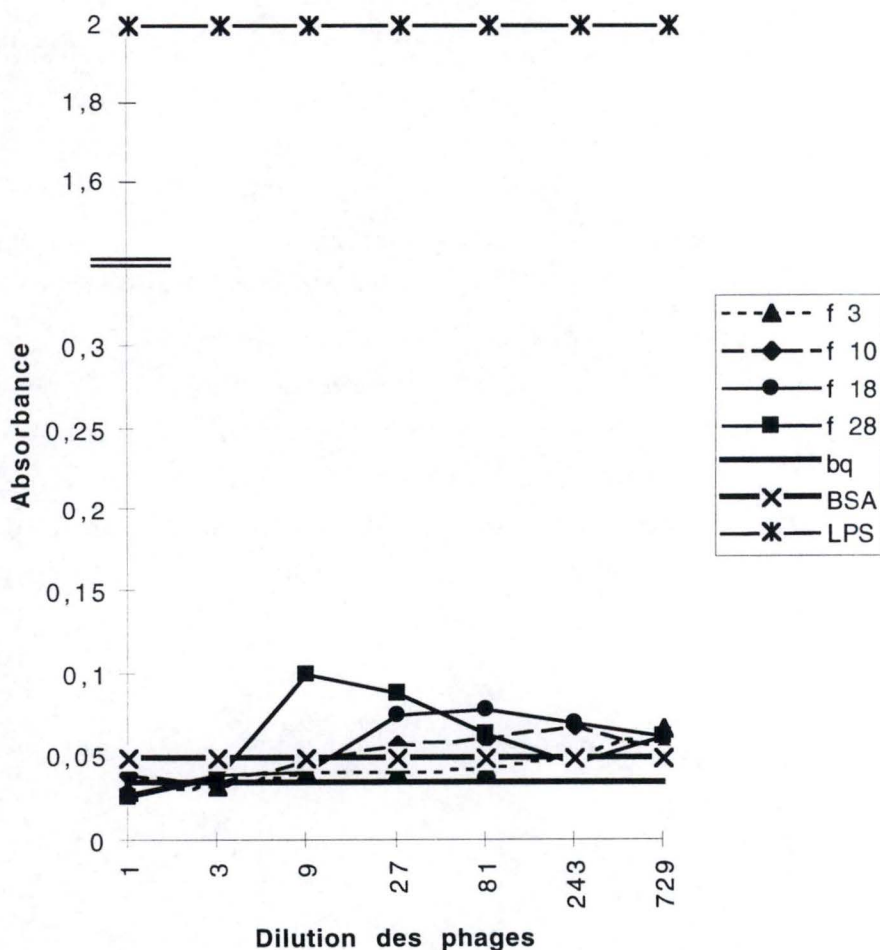
Les clones 3.2, 10.2, 18.2 et 28.2 sont produits selon le protocole décrit au paragraphe 2.1 du matériel et méthodes. Après production, la concentration en particules phagiennes des quatre échantillons est dosée au spectrophotomètre. Pour chaque préparation, l'absorbance à 260 nm, 269 nm et 280 nm est mesurée. Les préparations de phages sont diluées 40 fois. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant:

	ΔA_{280} nm	ΔA_{260} nm	ΔA_{269} nm	Nombre de ϕ /ml ($\times 10^{14}$)
Phage 3	0,503	0,462	0,553	1,48
Phage 10	0,265	0,199	0,283	0,76
Phage 18	0,243	0,171	0,252	0,67
Phage 28	0,243	0,176	0,257	0,69

La valeur ΔA est obtenue en retirant la valeur de l'absorbance du blanc à une longueur d'onde donnée à la valeur de l'absorbance de l'échantillon à cette même longueur d'onde.

7.2. Test ELISA

Dans un premier temps, un test ELISA est réalisé. Différentes quantités de phages sont adsorbées sur une plaque Maxisorp: ainsi, les puits sont tapissés avec les préparations de phages à 5×10^{12} particules phagiennes/ml, puis diluées de trois en trois. Plusieurs contrôles sont réalisés: un contrôle négatif utilisant une préparation d'une librairie de peptides présentés en phages (5×10^{12} particules phagiennes/ μ l); deux contrôles positifs utilisant une préparation de LPS "Rev 1" (LPS de type M dominant, 0,1 μ g/ml) et une préparation de LPS "W99" (LPS de type A dominant, 0,1 μ g/ml); enfin, un contrôle négatif utilisant un échantillon d'albumine sérique de boeuf (100 μ g/ml). Les résultats obtenus sont représentés sur le graphique ci-après.



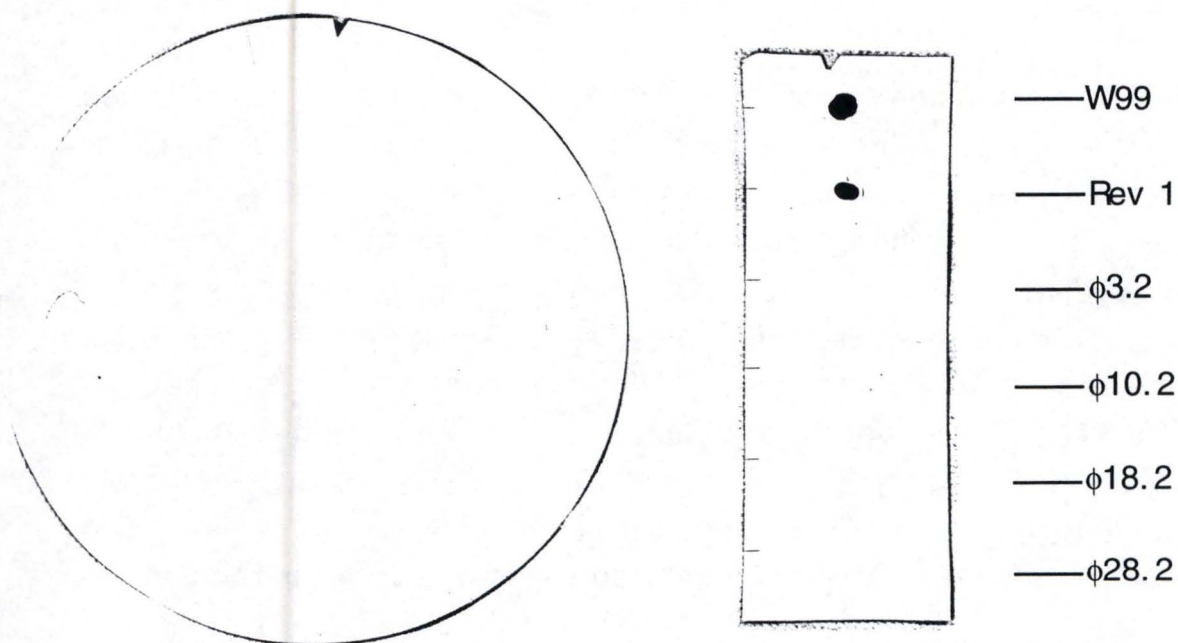


Figure 22:

Résultats obtenus pour l'immuno-empreinte sur colonies (gauche) et le dot blot (droite). Pour le dot blot, 1 μ l de chaque préparation de phages a été déposé sur le filtre (les préparations sont à environ 10^{14} phages /ml). Contrôles positifs, valables pour les deux tests: 1 μ l d'une préparation de LPS "Rev 1" (M dominant) et 1 μ l d'une préparation de LPS "W99" (A dominant). Pour l'immuno-empreinte sur colonies, le filtre a été déposé sur une boîte contenant une colonie infectée fraîchement repiquée pour chaque clone.

L'absence de signal significatif lorsque les puits sont sensibilisés avec un échantillon de la banque de phages démontre la spécificité de l'anticorps. Par contre, aucun signal positif (c'est-à-dire significativement supérieur au bruit de fond, qui est donné par le contrôle négatif) n'est détecté pour les quatre phages testés. Enfin, vu l'ampleur des signaux détectés pour les deux contrôles positifs, l'échelle du graphique a dû être interrompue.

7.3. Immuno-empreintes sur colonies et dot blot

Afin de confirmer ces résultats, une immuno-empreinte sur colonies est réalisée pour les quatre clones étudiés. Un dot blot est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions. Pour celui-ci, environ 10^8 particules phagiennes sont déposées sur le filtre de nitrocellulose pour chaque clone. Comme contrôle positif pour le dot blot, $1 \mu\text{l}$ ($1 \mu\text{g}$) de LPS "Rev 1" et $1 \mu\text{g}$ de LPS "W99" sont déposés sur le filtre de nitrocellulose. L'immuno-empreinte sur colonies utilise le même contrôle positif. L'analyse des résultats obtenus confirme que l'AcMo 12G12 ne reconnaît aucun des peptides présentés en surface des quatre phages testés (Figure 22).

7.4. Séquençage de l'insert nucléotidique des quatre phages

La séquence des inserts nucléotidiques portés par les phages 3.2, 10.2, 18.2 et 28.2 sont déterminées par séquençage manuel sur produits PCR. Les séquences obtenues sont présentées à la figure 23.

Tout d'abord, l'analyse de la séquence obtenue pour le phage 3 révèle que ce phage porte bien le fragment de l'oligonucléotide 12G12H qui encode le peptide PC2 (Figure 23.a). Mais ce peptide n'est pas dans la même phase de lecture que la fin de la séquence signal. La présence d'un C surnuméraire entre la séquence TTT GCC et la séquence GCT GTT AAC provoque en effet un changement de la phase de lecture, qui empêche la présentation du peptide PC2 en fusion avec la pVIII recombinante du phage.

Le phage 10.2 porte quant à lui l'insert nucléotidique qui encode le peptide PC3 (Figure 23.b). Mais à nouveau, un changement de phase provoqué par l'absence d'un G entre la séquence TTT GCC et la

a.

1/1		31/11
TTC CTA TGC TAA GCT TTG CCC GCT GTT AAC	ACT ACC GTC ACT ATT GGT GAC GTC ATA CCT	
F L C * A L P <u>A</u> V N T T V T I G D V I <u>P</u>		
S Y A K L C P L L T L P S L L V T S Y L		
<u>P M L S F A</u> R C * H Y R H Y W * R H T C		

61/21

GCA GAA GG

A E

Q K

R R

b.

1/1		31/11
TTC CTA TGC TAA GCT TTG CCC TCC TAC CGT	TCC AAG CCA TGA TCC TGC AGA AGG	
F L C * A L P S Y R S K P * S C R R		
S Y A K L C P P T V P S H D <u>P A E</u>		
<u>P M L S F A</u> L L P F Q A M I L Q K		

c.

1/1		31/11
TCC TAT GCT AAG CTT TGC CGC TAA TAA TAA	TCG TTG TCA TAG GCG TGC GTG TCC TTA GTC	
S Y A K L C R * * *	S L S * A C V S L V	
<u>P M L S F A A</u> N N N R C H R R A C P * S		
L C * A L P L I I I V V I G V R V L S L		

61/21

91/31

TAC TCC TGC AGC TTT GCC GCT CCT ACC GTT CCA AGC CAT GAT CCT GCA GAA GG

Y S C S F A A **P** **T** **V** **P** **S** **H** D P A E

T P A A L P L L P F Q A M I L Q K

L L Q L C R S Y R S K P * S C R R

d.

1/1		31/11
TTC CTA TGC TAA GCT TCT GTG TTC TGA CAT	TGC CAA ATT GTT GCA ATT CTG TAT CCA GCC	
F L C * A S V F * H	C Q I V A I L Y P A	
S Y A K L L C S D I A K L L Q F C I Q P		
<u>P M L S F</u> C V L T L P N C C N S V S S L		

61/21

91/31

TTC TTT CAG TCA TAG CTT CGG GCC GCG ATA AGA CTC ACT GAT CTG ACC CTG ATT CCT CTT

F F Q S * L R A A I R L T D L T L I P L

S F S H S F G P R * D S L I * P * F L L

L S V I A S G R D K T H * S D P D S S C

121/41

151/51

GCA GAC TTT ATA GAG GAA TTA AAA TGC AGT TTC TGC AGA AGG

A D F I E E L K C S F C R R

Q T L * R N * N A V S A E

R L Y R G I K M Q F L Q K

Figure 23:

Séquences nucléotidiques et peptidiques des inserts portés par les phages 3.2 (a), 10.2 (b), 18.2 (c) et 28.2 (d). La traduction en acides aminés est présentée suivant trois phases de lecture. Les résidus constituant les peptides complémentaires des CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 sont notés en caractères gras. Les acides aminés constituant le peptide signal et le début de la portion non recombinante de la pVIII sont soulignés. *: stop.

séquence CT CTT ACC empêche la présentation de ce peptide en surface du phage.

L'analyse de la séquence obtenue pour le phage 18.2 indique que ce phage est porteur de l'insert nucléotidique encodant le peptide PC3 (Figure 23.c). Mais il porte encore son insert d'origine en amont de la séquence du PC3. La présence de cette séquence est certainement la conséquence d'une restriction partielle au site *Hind* III. L'insert d'origine est ainsi resté attaché à la matrice phagienne par ce site. Les extrémités *Pst* I du fragment encodant le peptide PC3 ont pu venir s'hybrider et être liguées avec les extrémités *Pst* I de la matrice d'un côté et de l'insert d'origine de l'autre. Une analyse plus fine montre que les deux inserts ne sont pas dans la même phase de lecture. Le changement de phase est lié à la ligation entre les deux sites *Pst* I. De plus, au sein de l'insert d'origine se trouve un codon "stop".

Enfin, la séquence obtenue pour le phage 28.2 ne montre aucune ressemblance avec les séquences attendues (Figure 23.d). De plus, des "stop" se retrouve dans toutes les phases de lecture. L'analyse de cette séquence précise toutefois la présence d'un site de restriction *Sau* 3A et l'absence de sites *Hpa* I et *Rsa* I, confirmant les profils de restriction observés pour ce clone.

Aucun des quatre phages testés n'expriment donc un peptide complémentaire à l'un des CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12, ce qui apporte une explication simple aux résultats négatifs obtenus suite aux tests fonctionnels réalisés.

Enfin, sur quatre phages séquencés, trois portent donc un fragment encodant un des peptides complémentaires. Cependant une erreur de séquence au niveau de ces fragments est détectée chez deux de ces phages. Etant donné la probabilité très faible que l'ADN-polymérase commette une erreur lors de l'amplification d'un fragment long de 150 pb environ, il est probable que l'origine de ces erreurs se situe plutôt lors de la synthèse chimique des oligonucléotides qui constituent l'adaptateur 12G12H.

**Conclusions
et
perspectives**

Lors de ce mémoire, nous avons mis en oeuvre l'expression, en surface de phages filamenteux, de peptides complémentaires aux trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 qui reconnaît un épitope spécifique du LPS de *Brucella* et ce dans le but d'obtenir un peptide reconnu par cet anticorps. La stratégie suivie pour présenter ces peptides en surface des phages a été d'insérer l'adaptateur 12G12H, qui encode ces peptides, dans une des deux copies du gène de la protéine pVIII de l'ADN phagien. Après analyse de douze clones au moyen de restrictions diagnostiques sur produits PCR, quatre phages différents ont été sélectionnés et produits avant d'être soumis aux tests de reconnaissance par l'anticorps. Les trois tests fonctionnels réalisés (ELISA, dot blot et immuno-empreinte sur colonies) n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction spécifique entre ces quatre phages et l'AcMo 12G12. Le séquençage de l'insert nucléotidique porté par ces phages a toutefois permis d'apporter une explication simple à ces résultats. Tout d'abord, l'insert nucléotidique d'un de ces phages (le phage 28.2) ne montre aucune ressemblance avec l'adaptateur 12G12H. Bien que le phage 3.2 porte le fragment encodant le peptide PC2 et que les phages 10.2 et 18.2 portent le fragment encodant le peptide PC3, l'analyse des séquences indique qu'aucun de ces fragments ne se retrouve dans la même phase de lecture que le reste du gène de la pVIII recombinante. Ces peptides ne peuvent donc pas être présentés en surface des phages. Les phages 3, 10 et 18 n'expriment donc pas les peptides complémentaires, et par conséquent, il est impossible à ce stade du travail de formuler une conclusion quant à la reconnaissance ou non des peptides PC2 et PC3 par l'AcMo 12G12.

Parmi les 150 clones environ potentiellement recombinants obtenus après l'étape de transformation, seuls douze clones ont été analysés par restrictions sur produits PCR, et quatre d'entre eux ont été testés et soumis au séquençage. Dans un premier temps, il serait donc nécessaire de poursuivre l'analyse des clones restants. Cependant, l'étape de séquençage serait cette fois réalisée avant les tests fonctionnels, dans le but d'éviter de tester des phages qui n'expriment aucun des peptides d'intérêt.

De plus, des erreurs dans la séquence de l'adaptateur 12G12H ont été détectées (bases manquantes ou surnuméraires). L'origine de ces erreurs peut se situer soit lors de la PCR, soit lors de la synthèse chimique de l'oligonucléotide servant à produire l'adaptateur. Dès lors, tout en poursuivant l'analyse des clones, il serait intéressant de séquencer l'adaptateur 12G12H. Le séquençage permettrait ainsi de visualiser le type d'erreurs (bases manquantes et/ou surnuméraires) et de vérifier la présence de la dégénérescence désirée. Les échantillons d'adaptateurs ne présentant aucune erreur après le séquençage pourraient alors être sélectionnés et utilisés pour être insérés dans la copie recombinante du gène de la pVIII des phages. Les différentes constructions d'intérêt, avec les peptides présentés seuls ou par combinaison de deux ou de trois, seraient alors réalisées, puis soumises aux tests fonctionnels.

Dans le cas où des erreurs seraient détectées pour tous les échantillons séquencés, il serait nécessaire de concevoir de nouveaux adaptateurs plus petits encodant chacun un des peptides complémentaires. L'insertion de ces nouveaux adaptateurs dans la copie recombinante du gène de la pVIII permettrait de présenter les peptides complémentaires aux CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 individuellement en surface des phages. Les adaptateurs pourraient également être insérés dans d'autres matrices phagiennes que celle décrite au cours de ce travail. Ainsi, plusieurs matrices disponibles au laboratoire, permettent la présentation de peptides sous une conformation contrainte en surface des phages. C'est le cas, notamment, des matrices de type "C-X_n-C" où un peptide composé de n résidus est présenté sous forme contrainte entre deux cystéines formant un pont disulfure. Les peptides complémentaires pourraient aussi être présentés en fusion avec des domaines protéiques de structure définie, comme dans le cas du "minibody", un domaine "immunoglobulin-like" où les peptides sont insérés au niveau des boucles qui relient les brins β . Toutes ces constructions seraient alors soumises aux tests fonctionnels.

En cas de résultats négatifs, de nouveaux peptides complémentaires pourraient être déterminés. Il existe en effet

plusieurs façons de définir des peptides complémentaires (par exemple en inversant le sens de lecture des ARNm complémentaires, voir figures 15 et 16 de l'introduction), une seule d'entre elles ayant été envisagée dans le cadre de ce travail (voir figure 9 des résultats).

Parallèlement à la voie "biologique" qui tente de présenter les peptides en surface de phages filamenteux, une voie chimique pourrait aussi être envisagée. Les peptides complémentaires seraient alors synthétisés chimiquement et utilisés tels quels pour les tests fonctionnels.

Enfin, que les peptides complémentaires des trois CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 soient reconnus ou non par cet anticorps, il serait intéressant de déterminer les peptides complémentaires des CDR de la chaîne légère de celui-ci. La capacité de ces peptides complémentaires à être reconnus par l'anticorps serait alors testée. En cas de reconnaissance, l'obtention d'un plus grand nombre de peptides reconnus par l'AcMo 12G12 permettrait de baser le diagnostic de la brucellose non pas sur un seul mais sur plusieurs peptides, améliorant ainsi la spécificité des tests. A plus long terme, l'immunisation future d'animaux avec un ou plusieurs des peptides complémentaires aux CDR de l'AcMo 12G12, qui entraînerait la production d'anticorps capables de reconnaître le LPS de *Brucella*, ouvrirait la voie à de nouveaux types de vaccins anti-*Brucella*.

**Matériel
et
méthodes**

1. Techniques relatives à l'ADN recombinant

1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique

Cette technique permet de purifier les plasmides produits par *E. coli*. L'opération est conçue pour séparer l'ADN plasmidique de l'ADN génomique et des protéines bactériennes.

Une minipréparation comprend 5 étapes: la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et enfin sa resuspension.

SOLUTIONS :

- milieu 2YT: 16 g/l de tryptone (Gibco BRL), 10 g/l de yeast extract (Gibco BRL), 5 g/l de NaCl (chlorure de sodium, Merck).
- solution P1 + RNase: 50 mM Tris (hydroxyméthyl aminométhane)/HCl (Acros Chemica), 10 mM Na₂.EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid, UCB), 100 µg/ml de RNase A. Ajuster à pH 8,0 avec de l'HCl (acide chlorhydrique) 1N, et stocker à 4°C.
- solution P2: 200 mM NaOH (hydroxyde de sodium, Merck), 1% SDS (sodium dodecyl sulfate, Sigma).
- solution P3: 2,55 M KAc (acétate de potassium, Merck). Ajuster à pH 4,8 avec de l'acide acétique.

1. Inoculer 5 ml de milieu liquide (2YT+antibiotiques) avec une colonie isolée obtenue sur milieu solide.
2. Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation (environ 200 révolutions par minute).
3. Mettre 1,5 ml de culture dans un tube de microcentrifugeuse ("Eppendorf"). Centrifuger 5 minutes à 12500 rpm, en microfuge. Eliminer le surnageant.
4. Resuspendre le culot dans 300 µl de solution P1 + RNase A, ajouter 300 µl de solution P2 et mélanger doucement. Incuber 5 minutes à température ambiante.
5. Ajouter 300 µl de solution P3 et mélanger doucement, incuber 10 minutes sur glace.
6. Centrifuger 25 minutes à 12500 rpm, en microfuge. Récupérer le surnageant.

7. Précipiter l'ADN en ajoutant 720 μ l d'isopropanol, homogénéiser. Centrifuger 20 minutes à 12500 rpm, en microfuge. Eliminer le surnageant.
8. Laver l'ADN en ajoutant 1 ml d'éthanol 70%. Centrifuger 15 minutes à 12500 rpm, en microfuge. Eliminer prudemment le surnageant.
9. Sécher le culot sous vide quelques minutes, ou laisser le reste d'éthanol s'évaporer à température ambiante, pendant 15 minutes. Resuspendre dans 20 à 50 μ l d'H₂O distillée stérile (suivant le nombre de copies de plasmide par cellule).
10. Stocker à -20°C.

1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique

La midipréparation d'ADN plasmidique suit les mêmes étapes que la minipréparation. La culture préliminaire est toutefois réalisée dans un plus grand volume, et la quantité d'ADN plasmidique récupérée est plus importante.

SOLUTIONS :

- milieu 2YT: 16 g/l de tryptone, 10 g/l de yeast extract, 5 g/l de NaCl.
- solution P1 + RNase: 50 mM Tris/HCl, 10 mM Na₂.EDTA, 100 μ g/ml de RNase A. Ajuster à pH 8,0 avec de l'HCl 1N, et stocker à 4°C.
- solution P2: 200 mM NaOH, 1% SDS.
- solution P3: 2,55 M KAc. Ajuster à pH 4,8 avec de l'acide acétique.
- tampon T₁₀E₁: 10 mM Tris, 1 mM Na₂.EDTA, pH 8,0.

1. Inoculer 20 ml de milieu liquide (2YT+antibiotiques) avec une colonie isolée obtenue sur milieu solide.
2. Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
3. Transférer chaque culture dans un tube de 50 ml, et centrifuger 10 minutes, à 3000 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Jouan CR412. Eliminer le surnageant.
4. Resuspendre le culot avec 2 ml de solution P1 + RNaseA. Transvaser dans un tube de centrifugation "Corex" (Du Pont

Instruments), ajouter 2 ml de solution P2 et mélanger doucement. Incuber 5 minutes à température ambiante.

5. Ajouter 2 ml de solution P3 et mélanger doucement, incuber 15 minutes sur glace.

6. Centrifuger 30 minutes, à 13000 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor SS-34).

7. Récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes "Corex". Ajouter 2 ml de phénol. Homogénéiser au vortex, puis remettre directement sur glace.

8. Centrifuger 5 minutes, à 3000 rpm sur centrifugeuse 4225.

9. Avec une micropipette, transvaser la phase aqueuse supérieure dans de nouveaux tubes "Corex". Précipiter l'ADN en ajoutant 4,2 ml d'isopropanol (environ 0,7 volume). Homogénéiser au vortex.

10. Centrifuger 30 minutes, à 13000 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor SS-34). Eliminer le surnageant.

11. Laver l'ADN en ajoutant 2 ml d'éthanol 70%. Mélanger.

12. Centrifuger 5 minutes, à 13000 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor SS-34). Eliminer l'éthanol.

13. Sécher l'ADN en laissant s'évaporer le reste d'éthanol pendant 15 minutes, à température ambiante.

14. Resuspendre l'ADN avec 100 µl de tampon T₁₀E₁, et transvaser dans un tube de microcentrifugeuse.

Il est souvent nécessaire de purifier une midipréparation lorsque l'ADN est destiné à être séquencé par séquençage automatique. Cette purification se fait sur des colonnes échangeuses d'ions (Qiagen).

SOLUTIONS :

- solution QBT: dissoudre 4,383 g de NaCl et 1,046 g de MOPS (acide 3-N-Morpholinopropanesulfonique, Sigma) dans 80 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,0. Ajouter 15 ml d'éthanol pur et 1,5 ml de Triton X-100 10% (octylphénol polyéthylène glycol éther, Serva). Porter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée.

- solution QC: dissoudre 5,844 g de NaCl et 1,046 g de MOPS dans 80 ml d'eau distillée. Ajuster à pH 7,0. Ajouter 15 ml d'éthanol pur. Porter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée.

- solution QC: dissoudre 7,305 g de NaCl et 0,606 g de Tris base (ICN biomedical) dans 80 ml d'eau distillée. Ajouter 15 ml d'éthanol pur. Attendre que la solution soit revenue à température ambiante. Ajuster le pH à 8,5 avec de l'HCl 1N. Porter le volume à 100 ml.

15. Mettre un échantillon de la midipréparation d'ADN plasmidique (environ 50 µg) dans un tube pour microfuge. Porter le volume à 1 ml avec la solution QBT.
16. Equilibrer la colonne Qiagen-tip 20 avec 1 ml de solution QBT.
17. Déposer l'échantillon au sommet de la colonne.
18. Laver 4 fois la colonne avec 1 ml de solution QC (élue les ARN).
19. Eluer l'ADN avec 0,8 ml de solution QF. Récupérer l'éluat dans un tube de microfuge de 2 ml.
20. Précipiter l'ADN avec 560 µl d'isopropanol. Centrifuger 30 minutes à 14000 rpm en microfuge.
21. Laver l'ADN avec 1 ml d'éthanol 70%. Centrifuger 5 minutes à 14000 rpm sur microfuge.
22. Sécher l'ADN pendant 15 minutes, à température ambiante.
23. Resuspendre l'ADN dans 100 µl de tampon T₁₀E₁. Stocker à -20°C.

1.3. Extraction au phénol:

Afin d'extraire les protéines d'une solution d'ADN, on utilise le phénol, solvant non-miscible à l'eau. Les protéines précipitent à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse. Cette opération s'effectue entre deux restrictions ou entre une restriction et une ligation.

SOLUTIONS :

- phénol/chloroforme: phénol saturé au TEN buffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM Na₂.EDTA, 10 mM NaCl). Ajouter un volume de phénol à un volume de TEN. Mélanger et centrifuger, éliminer la phase supérieure et recommencer jusqu'à ce que le pH de la phase aqueuse soit supérieur à 7,8. Ajouter à ce mélange un même volume de chloroforme (UCB) + alcool isoamylique (UCB) dans une proportion 24/1.

1. Porter le volume de la solution à 200 µl avec de l'eau pure.

2. Ajouter 200 μ l de phénol saturé en TEN.
3. Agiter au vortex pendant 30 secondes.
4. Centrifuger 5 minutes à la microfuge.
5. Prélever avec précaution la phase supérieure, en évitant de reprendre l'interface phénol-phase aqueuse.

1.4. Précipitation de l'ADN.

Il est souvent nécessaire de concentrer une solution d'ADN, par exemple après une extraction au phénol. A cet effet, on précipite l'ADN pour le resuspendre dans un volume inférieur.

1. Ajouter à la solution 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 4,8 et 2,5 volumes d'éthanol absolu.
2. Mélanger vigoureusement.
3. Précipiter l'ADN 20 minutes à -80°C ou sur glace.
4. Centrifuger 30 minutes à 14000 rpm, en microfuge.
5. Eliminer le surnageant. Eliminer les sels en ajoutant 1 ml d'éthanol 70%.
6. Centrifuger 5 minutes à 14000 rpm, en microfuge.
7. Eliminer le surnageant.
8. Sécher le culot en laissant s'évaporer le reste d'éthanol, 15 minutes, à température ambiante.
9. Resuspendre l'ADN précipité dans le volume désiré d'eau pure.

1.5. Restriction d'ADN purifié:

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences palindromiques de 4 à 8 paires de bases. Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par la firme Boehringer Mannheim.

1. Dans un Eppendorf, déposer x μ l d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée. Ajouter un dixième du volume final de tampon de restriction concentré $10\times$, et 2 à 10 unités d'enzymes par μ g d'ADN (1 unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 μ g d'ADN du phage λ

en une heure à la température optimale de l'enzyme). Amener au volume final avec de l'eau pure.

2. Incuber une à deux heures à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C).

3. La réaction peut être stoppée (inactivation de l'enzyme) soit par chauffage (15 à 20 minutes à 65°C) si l'enzyme est thermosensible, soit par une extraction au phénol/chloroforme, soit par addition d'EDTA.

1.6. Electrophorèse en gel d'agarose:

Cette technique permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser est inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. L'utilisation du bromure d'éthidium, une molécule fluorescente liant l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice, permet la visualisation des fragments sous illumination UV ($\lambda = 302 \text{ nm}$). La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à la quantité de bromure d'éthidium qu'il contient et donc à sa taille et à la quantité d'ADN présente; ainsi, en connaissant la quantité d'ADN du marqueur de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison des intensités de fluorescence.

SOLUTIONS :

- tampon TAE 50x: 242 g Tris/HCl, 57,1 g d'acide acétique glacial (VEL), 100 ml d'une solution de Na₂.EDTA 0,5 M à pH 8,0. Porter le volume à un litre avec de l'eau distillée.
- solution de coloration et d'alourdisseur 10x: 50% sucrose, 100 mM Na₂.EDTA, 1% SDS, 0,1% bleu de bromophénol (Bio-Rad).
- tampon de marqueur de taille: 10 mM Tris, 5 mM NaCl, 0,1 mM Na₂.EDTA.
- marqueur de taille λ /Hind III: 100 μ l phage λ restreint par Hind III (Gibco BRL), 800 μ l de tampon de marqueur, 100 μ l de solution de coloration et d'alourdisseur 10x. Incuber 10

minutes à 65°C et échantillonner par 10 µl. Conserver à -20°C.

- Autres marqueurs de taille: marqueur V (Eurogentec), pUC19 restreint par *Hae* III, à 300 ng/µl.

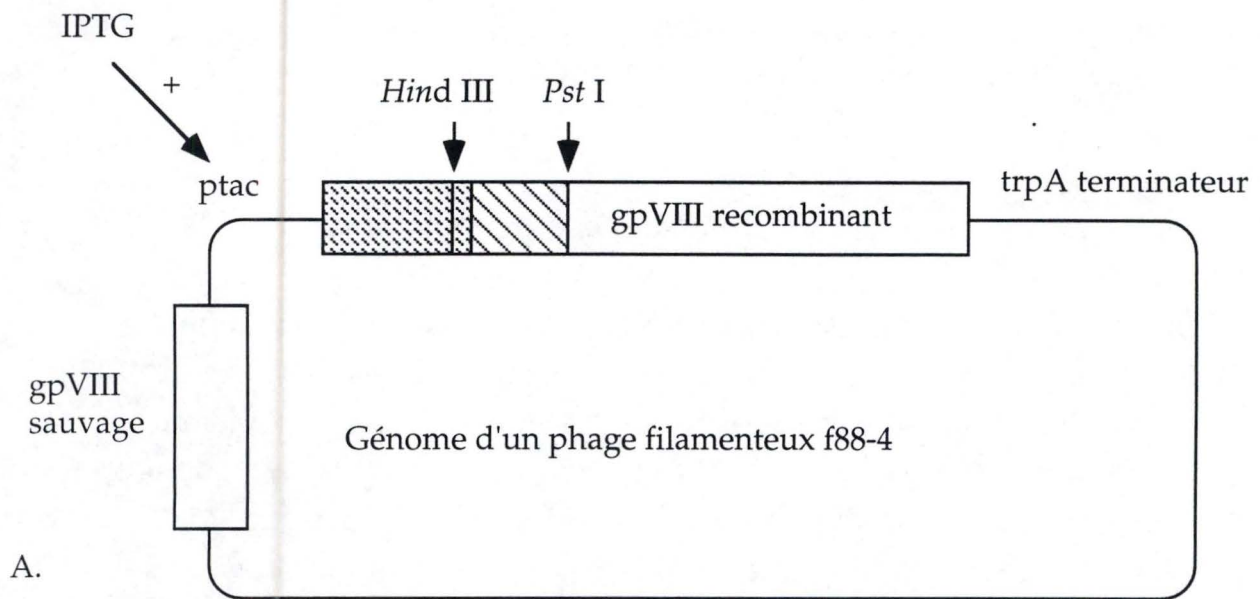
1. Ajouter 1 µl de solution de coloration et d'alourdisseur à 9 µl d'ADN.
2. Dissoudre l'agarose (Boehringer Mannheim) par ébullition dans le TAE 1x (de 0,8 à 2% d'agarose selon la séparation désirée).
3. Placer les peignes dans la cuve. Couler l'agarose dans la cuve quand la solution a refroidi à environ 50°C, ajouter 2 µl de bromure d'éthidium (stock à 2 mg/ml) par 50 ml de gel. Laisser le gel se solidifier au moins 20 minutes. Retirer les peignes. Placer le gel dans la cuve et le recouvrir de TAE 1x.
4. Déposer les échantillons préparés dans les puits.
5. Migrer avec une différence de potentiel de 2,5 à 5 Volts/cm pendant une à deux heures.
6. Visualiser sur table UV.

1.7. Insertion d'un oligonucléotide dans un vecteur

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4, qui catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'enzyme pour être active nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg⁺⁺. La réaction exige que l'ADN soit purifié des endonucléases et des sels qui pourraient le contaminer. Une extraction au phénol est donc nécessaire entre une restriction et une ligation, afin surtout d'éliminer toute trace des enzymes de restriction.

Dans notre cas, les vecteurs utilisés sont tous des phages filamenteux fd-tet de type f88-4. Les phages fd-tet sont dérivés de phages fd par insertion d'un transposon contenant le gène de résistance à la tétracycline au sein de la grande région intergénique.

Lors des premières tentatives d'insertion, la matrice utilisée est un phage isolé issu d'une banque dite "Cys 6", où un fragment encodant un peptide de séquence X₄CX₆CX₄ (X étant un des vingt acides aminés),



▨ = séquence encodant le peptide signal

▧ = oligonucléotide inséré



Portion exposée
en surface des phages

▨ = peptide signal

▧ = peptide recombinant

□ = partie non recombinante de la pVIII

Figure 1:

Représentation schématique de l'ADN d'un phage de type f88 (A). Le gène de la pVIII recombinante est bordé par le promoteur de transcription ptac (inductible à l'IPTG) en amont et par le terminateur trpA. Un fragment d'ADN étranger peut être inséré dans le gène de la pVIII recombinante entre les sites de restriction *Hind III* et *Pst I*. (B): représentation du précurseur de la pVIII recombinante (1) et de la pVIII mature (2).

est inséré dans le gène de la protéine pVIII recombinante entre deux sites de restriction: *Hind* III en amont et *Pst* I en aval (Figure 1).

Lors de la dernière tentative d'insertion, c'est un échantillon d'une banque dite "Cys 4" et non plus un phage isolé qui sera utilisé comme matrice. Dans une banque "Cys 4", un fragment encodant un peptide de séquence aléatoire $X_4CX_4CX_4$ est inséré dans le gène de la protéine pVIII recombinante.

SOLUTIONS:

-tampon $T_{10}E_1$ -KCl 50 mM: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 50 mM
(chlorure de potassium, Merck)

1. Hybrider les 2 brins d'oligonucléotide en les mélangeant en quantités équimolaires (de l'ordre du nM ou pM) dans un tampon $T_{10}E_1$ -KCl 50 mM. Chauffer 5 minutes à 95°C au bain-marie, puis laisser refroidir lentement jusqu'à 65°C. Mettre sur glace.
2. Dans un Eppendorf, mélanger les fragments d'ADN à liguer, le nombre d'inserts étant un peu plus élevé que le nombre de vecteurs. La quantité de vecteurs (phage f88-4, 9,2 kb) doit être de 200 ng au moins.
3. Rajouter un dixième du volume final de tampon ligase concentré 10x livré avec l'enzyme, et le nombre d'unités d'ADN-ligase du phage T4 nécessaire (dépendant de la quantité d'ADN: en général, 1 μ l à 1 U/ μ l, Boehringer Mannheim). Compléter avec de l'eau distillée stérile.
4. Incuber une nuit à 16°C.
5. Conserver le mélange de ligation à -20°C.

Le "DNA Rapid Ligation Kit" (Boehringer Mannheim) permet la ligation d'un insert nucléotidique dans un vecteur en 5 minutes. Les tampons sont livrés avec l'enzyme.

1. Dans un Eppendorf, mélanger les fragments d'ADN à liguer dans 2 μ l de "DNA dilution buffer" concentré 5x, de manière à arriver à un volume de 10 μ l.
2. Rajouter 10 μ l de "T4 DNA ligation buffer" concentré 2x. Mélanger au vortex.
3. Mettre 1 μ l de "T4 DNA ligase" (5 U/ μ l).
4. Incuber 5 minutes à température ambiante.

5. Conserver à -20°C.

1.8. Transformation

1.8.1. Transformation par électroporation

Cette technique utilise un bref choc électrique pour permettre l'entrée d'ADN étranger dans une cellule bactérienne. La survie et la transformation bactérienne dépendent de l'intensité et de la durée du choc électrique.

1.8.1.1. Préparation de cellules électrocompétentes

Caractéristiques de la souche E. coli MC1061:

Son génotype est araD139 Δ (ara-leu)7696 Δ lacI74 galU⁻ galK⁻ hsr⁻ hsm⁺ strA. Le génotype strA confère à la souche MC1061 une résistance à la streptomycine.

SOLUTIONS:

- milieu LB (Luria Bertani) solide: 10 g/l tryptone, 5 g/l NaCl, 5 g/l yeast extract, 2% agar (Difco).
- milieu 2YT: 16 g/l de tryptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl.
- solution d'HEPES 1 mM: dissoudre 0,117 g d'HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazine-ethane-sulfonic acid, Boehringer Mannheim) dans 500 ml d'eau distillée. Autoclaver. Refroidir sur glace avant utilisation.
- solution de glycérol 10%: diluer 20 ml de glycérol (UCB) dans 180 ml d'eau distillée. Autoclaver. Refroidir sur glace avant utilisation.

1. A partir d'une colonie de la souche *E. coli* MC1061, obtenue sur milieu solide (LB Agar + Streptomycine), inoculer 5 ml de milieu 2YT contenant 10 μ g/ml de streptomycine. Incuber une nuit, à 37°C sous forte agitation.
2. Transférer la préculture dans un erlen de 3 litres muni de contre-pales contenant 500 ml du même milieu.
3. Incuber à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. à 600 nm de 0,5 à 0,7 et placer 30 minutes sur glace.

4. Répartir la culture dans 4 tubes stériles. Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4)
5. Eliminer le surnageant et resuspendre chaque culot avec 50 ml d'une solution d'HEPES 1 mM froide et stérile.
6. Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4).
7. Eliminer le surnageant et resuspendre chaque culot avec 50 ml d'une solution d'HEPES 1 mM froide et stérile.
8. Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4).
9. Eliminer le surnageant et resuspendre avec 50 ml d'une solution de glycérol 10% froid et stérile pour deux culots.
10. Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4°C dans centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4)..
11. Eliminer le surnageant et resuspendre chaque culot avec 1,5 ml d'une solution de glycérol 10% froide et stérile.
12. Echantillonner par 200 µl et stocker à - 80°C.

1.8.1.2. Electroporation:

1. Dégeler les cellules "électrocompétentes" 20 minutes sur glace.
2. Dans un Eppendorf stérile froid, mélanger 50 µl de cellules avec 10 ng d'ADN (de 1 à 10 µl maximum) et laisser au moins 1 minute sur glace.
3. Placer le "Gene Pulser" à 25 µF et 2000 volts et le "Gene Controller" à 200 Ω.
4. Transférer, sans faire de bulles, le mélange d'ADN et de cellules dans une cuvette à électroporation de 0,2 cm de largeur (Bio-Rad). Placer cette cuvette entre les 2 électrodes de l'électroporateur et mettre sous tension.
5. Enlever la cuvette et y ajouter immédiatement 1 ml de milieu 2YT.
6. Transférer le mélange dans un Eppendorf stérile et incuber 1 heure à 37°C. Lorsque l'ADN introduit est celui d'un phage filamenteux apportant une résistance à la tétracycline (phage fd-tet), incuber plutôt 30 minutes à 37°C, puis rajouter de la tétracycline à une concentration finale de 0,2 mg/ml, incuber 30 minutes à 37°C.

7. Etaler sur milieu LB solide avec antibiotique, et incuber une nuit à 37°C.

1.8.2. Transformation par choc thermique

1.8.2.1. Préparation de cellules compétentes

Caractéristiques de la souche E. coli XL1-Blue:

Son génotype est recA1, endA1, gyr A96, thi-1, hsd R-17, Sup E44, rel A1, Δ lac, (F', lac lqZ Δ M15, Tn10).

- recA1 réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène;
- endA1 améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique en diminuant le taux d'endonucléases;
- Δ lac, délétion de l'opéron lactose qui la rend incapable de métaboliser le lactose.

L'épisome F' (facteur de conjugaison bactérienne) porte les caractères suivant:

- Tn10 contient un marqueur de résistance à la tétracycline (Tet^R) permettant de sélectionner les bactéries contenant l'épisome F';
- lac lq renforce la production du répresseur de l'opéron lactose;
- lac Z Δ M15, fragment du gène lacZ codant pour le peptide ω qui, par complémentation intragénique avec un plasmide portant le fragment du gène lacZ encodant le peptide α (lacZ'), donne une coloration bleue à la colonie en présence d'un chromogène, le X-gal. Si, au niveau du plasmide, le fragment lacZ' est disrupté (plasmide recombinant), la colonie sera blanche en présence de X-gal.

SOLUTIONS :

- milieu LB solide: 10 g/l tryptone, 5 g/l NaCl, 5 g/l yeast extract, 2% agar.
- milieu 2YT: 16 g/l de tryptone, 10 g/l de yeast extract, 5 g/l de NaCl.
- solution de CaCl₂ 50 mM: dissoudre 1,838 g de CaCl₂ (chlorure de calcium, Merck) dans 250 ml d'eau distillée. Autoclaver. Refroidir sur glace avant utilisation.
- solution de CaCl₂ 50 mM-20% glycérol. Autoclaver. Refroidir avant utilisation.

1. A partir d'une colonie de la souche *E. coli* XL1-Blue, obtenue sur milieu solide (LB Agar + 10 µg/ml de tétracycline), inoculer 5 ml de milieu 2YT contenant 10 µg/ml de tétracycline. Incuber une nuit, à 37°C sous forte agitation.
2. Transférer la préculture dans un erlen de 2 litres contenant 400 ml du même milieu.
3. Incuber à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. à 600 nm de 0,3 et placer 20 minutes sur glace.
4. Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4).
5. Resuspendre le culot dans 50 ml d'une solution de CaCl₂ 50 mM stérile et froide. Laisser 20 minutes sur glace.
6. Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4).
7. Resuspendre le culot dans 30 ml d'une solution de CaCl₂ 50 mM stérile et froide. Laisser 20 minutes sur glace.
8. Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4).
9. Resuspendre le culot dans 4 ml d'une solution de CaCl₂ 50 mM-20% glycérol.
10. Echantillonner par 300 µl et stocker à -80°C.

1.8.2.2. Transformation par choc thermique

1. Dégeler les cellules 20 minutes sur glace.
2. Dans un Eppendorf stérile froid, mélanger 50 µl de cellules avec 1 à 100 ng d'ADN (de 1 à 10 µl maximum) et laisser 20 minutes sur glace.
3. Incuber 2 minutes maximum à 42°C.
4. Rajouter 1 ml de milieu 2YT et incuber 1h à 37°C.
5. Etaler 100 µl sur boîte LB solide avec antibiotique, et incuber une nuit à 37°C.

1.9. Infection

La souche d'*E. coli* MC1061 présente des taux de transformation par électroporation plus élevés que la souche K91kan. Mais la souche MC1061 ne peut pas être infectée parce qu'elle ne possède pas de pilus.

Nous avons constaté que les PCR sur des colonies de la souche MC1061 ne donnent aucun résultat. Par contre, les PCR sur des

colonies de la souche K91kan fonctionne bien. Il faut donc infecter des cellules K91kan avec les phages produits par les cellules MC1061.

SOLUTIONS :

- milieu 2YT: 16 g/l de tryptone, 10 g/l de yeast extract, 5 g/l de NaCl.
- milieu LB solide: 10 g/l tryptone, 5 g/l NaCl, 5 g/l yeast extract, 2% agar.
- milieu "Terrific broth": 900 ml d'H₂O; 12 g bacto-tryptone; 24 g d'extrait de levure; 4 ml de glycérol. Autoclaver et puis rajouter 100 ml de tampon potassium autoclavé séparément (0,17 M KH₂PO₄, dihydrogénophosphate de potassium, Merck; 0,72 M K₂HPO₄, dipotassium hydrogénophosphate, Merck).

Caractéristiques de la souche K91kan :

- un gène de résistance à la kanamycine est inséré dans le gène lac Z.
- elle possède en moyenne 5 pili par cellule (la plupart des souches mâles n'en possédant que 0,5 par cellule), ce qui lui confère une bonne infection par les phages.

1.9.1. Préparation des phages

1. Inoculer 5 ml de milieu 2YT contenant 20 µg/ml de tétracycline et 10 µg/ml de streptomycine avec une colonie de la souche MC1061 transformée. Agiter une nuit à 37°C.
2. Mettre 1,5 ml de cette culture dans un Eppendorf stérile.
3. Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm en microfuge.
4. Transférer le surnageant contenant les phages dans un nouvel Eppendorf stérile.

1.9.2. Préparation de "Terrific broth cells".

1. Ensemencer 5 ml de milieu 2YT contenant 100 µg/ml de kanamycine à partir d'une colonie de la souche K91kan, obtenue sur milieu solide (LB + kanamycine). Agiter une nuit à 37°C.
2. Prendre 200 µl de cette culture pour ensemencer 10 ml de milieu "Terrific broth". Agiter vigoureusement à 37°C.

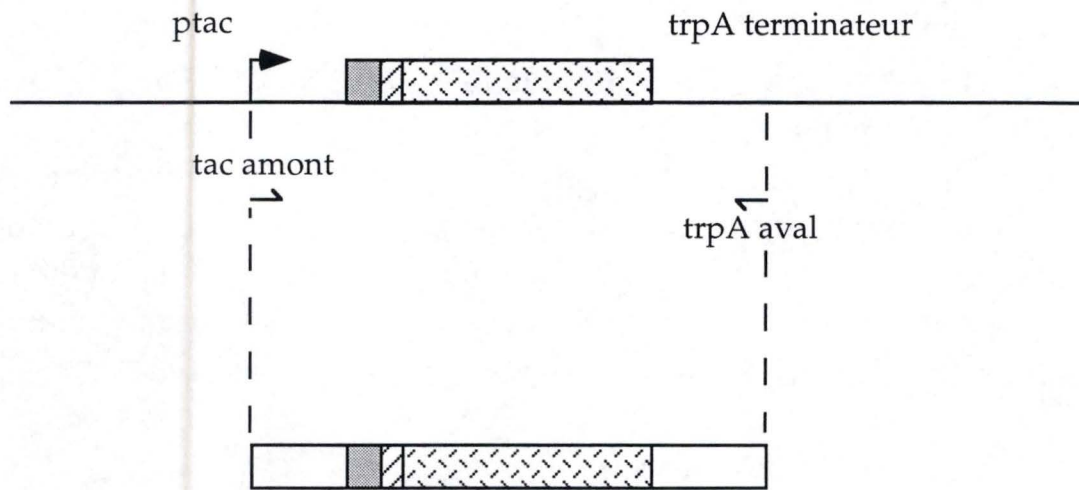






Figure 2:

Représentation schématique de l'amplification du gène de la pVIII recombinante portant un insert nucléotidique étranger par PCR sur colonies au moyen des amorces "tac amont" et "trpA aval".

-  = séquence encodant le peptide signal
-  = séquence encodant le peptide recombinant
-  = séquence encodant partie non recombinante de la pVIII
-  = séquence bordante

3. Quand la culture atteint une DO de 0,125-0,250 à 600 nm pour une dilution 10x, diminuer l'agitation pendant 5 minutes pour permettre la régénération des pili bactériens abîmés.
4. Utiliser ces cellules dans l'heure. La concentration de cellules viables est d'environ 5×10^9 cellules/ml.

1.9.3. Infection de "Terrific broth cells"

1. Dans un Eppendorf stérile, mettre 10 μ l de "Terrific broth cells" et 10 μ l de surnageant d'une culture de cellules MC1061 infectée.
2. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante.
3. Ajouter 1 ml de milieu 2YT et 1 μ l de tétracycline diluée de sorte qu'elle soit à une concentration finale de 0,2 μ g/ml.
4. Incuber 30 minutes à 37°C.
5. Etaler 100 μ l sur boîte LB contenant 20 μ g/ml de tétracycline et 100 μ g/ml de kanamycine. Incuber une nuit à 37°C.

1.10. Amplification par PCR sur colonies infectées

Afin de différencier les phages portant un insert d'intérêt des phages non recombinants, il est possible d'amplifier par PCR la région comprenant le site de clonage. Par la suite, diverses restrictions sur les produits PCR devraient permettre de discriminer entre elles les différentes constructions.

Les amorces utilisées sont (Figure 2):

- tac amont: 5'-CCCATCCCCCTGTTGACAAT-3' ($T_m = 62^\circ\text{C}$)
- trpA aval: 5'-GATACCCAGCCCGCCTAAT-3' ($T_m = 60^\circ\text{C}$)

1. Dans un microtube de 500 μ l pour PCR, mélanger 5 μ l d'amorce "Tac amont" (20 μ M), 5 μ l d'amorce "TrpA terminator aval" (20 μ M), 2 μ l de dNTP (10 mM chacun), 10 μ l de tampon d'ADN polymérase concentré 10x (DynaZyme, Finnzymes Oy), et 76 μ l d'eau distillée stérile.
2. Au moyen d'un tips stérile, effleurer le centre d'une colonie infectée de la souche K91kan d'*E. coli*. Plonger ce tips dans le microtube contenant le mélange de réaction, remuer quelques instants. Jeter le tips.
3. Ajouter 1 μ l de DynaZyme (2 U/ μ l).

4. Déposer 100 μ l d'huile minérale ultra-pure au-dessus du mélange de réaction afin d'empêcher toute évaporation.
5. Programmer l'appareil à PCR :
 - 5 minutes à 95°C (dénaturation)
 - 35 cycles d'amplification présentés comme suit:
 - * 1 min. à 95°C (dénaturation)
 - * 1 min. à 60°C (hybridation des amorces)
 - * 1 min. à 72°C (élongation)
 - 10 minutes à 72°C (élongation finale)
6. Eliminer l'huile minérale en congelant les tubes de PCR à -20°C. A cette température, les produits PCR gèlent, mais pas l'huile minérale. Une fois que la phase aqueuse contenant les produits PCR est bien gelée, retirer rapidement l'huile minérale à la micropipette.
7. Analyser un dixième de chaque produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. Conserver le reste des produits à -20°C.

1.11. Séquençage de l'ADN

1.11.1. Préparation de l'ADN pour séquençage automatique

La réaction de séquençage se fait par PCR au moyen du "DNA Sequencing Kit" pour séquenceur automatique ABI Prism (Perkin Elmer).

1. Dans deux tube de 500 μ l pour PCR, déposer 250 à 500 ng d'ADN à séquencer, 3,2 pmoles de chaque amorce (lorsque les deux brins sont séquencés, une amorce par tube) et 8 μ l de "Terminator Ready Mix" (disponible dans le kit). Porter le volume à 20 μ l avec de l'eau distillée stérile.
2. Ajouter 100 μ l d'huile minérale pour éviter toute évaporation.
3. Programmer l'appareil PCR comme suit (répéter 25 fois le cycle):

- 30 secondes à 96°C (dénaturation)
- 15 secondes à 50°C (hybridation)
- 4 minutes à 60°C (élongation)

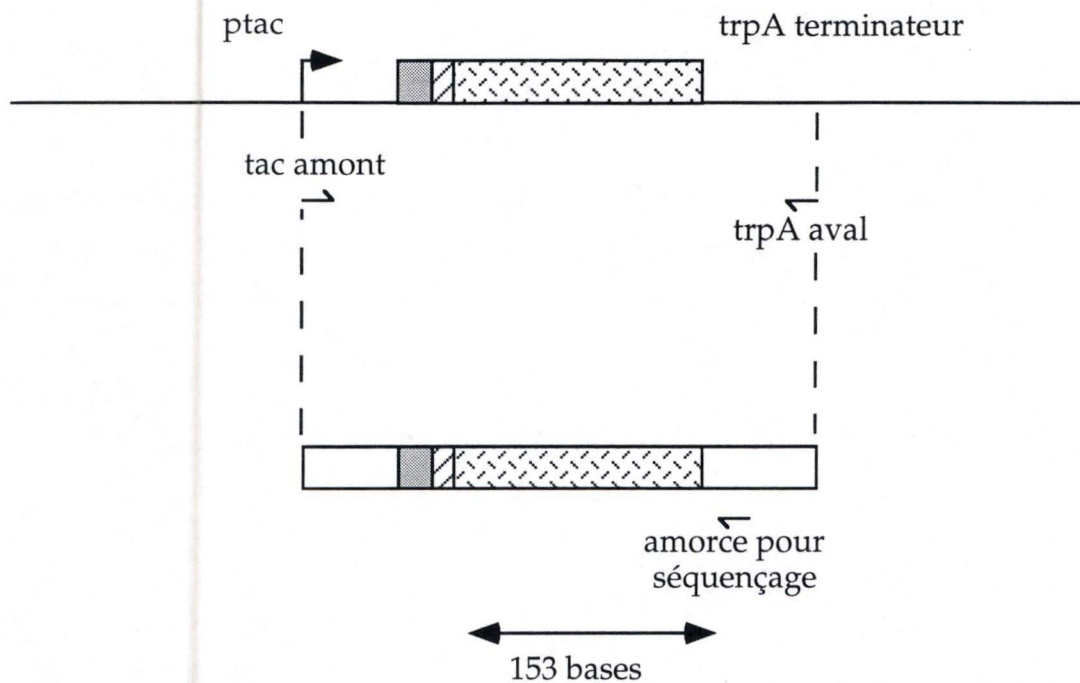






Figure 3:

Représentation schématique d'une réaction de séquençage sur produits PCR. L'utilisation des amorces "tac amont" et "trpA aval" permet l'amplification d'un gène de la pVIII recombinante. L'amorce utilisée pour la réaction de séquençage s'hybride à 153 bases de la séquence encodant le peptide recombinant

-  = séquence encodant le peptide signal
-  = séquence encodant le peptide recombinant
-  = séquence encodant partie non recombinante de la pVIII
-  = séquence bordante

4. Après la réaction, éliminer l'huile minérale.
5. Transférer les 20 μ l de produits dans un tube de microcentrifugeuse. Précipiter l'ADN en ajoutant 2 μ l d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 et 50 μ l d'éthanol 95%. Mélanger au vortex et incubé 10 minutes sur glace.
6. Centrifuger 30 minutes à 14000 rpm en microfuge.
7. Éliminer le surnageant. Laver le culot avec 250 μ l d'éthanol 70%.
8. Centrifuger 15 minutes à 14000 rpm en microfuge.
9. Éliminer l'éthanol. Sécher l'ADN en laissant évaporer le reste d'éthanol à température ambiante pendant 15 minutes.
10. Stocker l'ADN à -20°C.

Le séquençage est réalisé sur séquenceur automatique 377 DNA Sequencer ABI Prism (Perkin Elmer), au laboratoire de Physiologie et Physiopathologie (Pr. Goffinet).

1.11.2. Séquençage manuel de l'ADN des phages

Le séquençage de l'insert nucléotidique porté par les phages s'effectue directement sur les produits PCR. Le kit utilisé est le "Sequenase PCR Product Sequencing Kit" (Amersham LIFE SCIENCE).

L'amorce utilisée est : 5'-ACG CTT TAG AAG TGA AT-3'. Cette amorce s'hybride à une distance de 153 nucléotides de la séquence d'intérêt (Figure 3).

1.11.2.1. Réaction de séquençage.

Pré-traitement enzymatique des produits PCR

1. Mettre 5 μ l de produits PCR dans un tube de microcentrifugeuse stérile.
2. Ajouter 1 μ l d'Exonucléase I (10 Unités/ μ l, disponible dans le kit) et 1 μ l de Phosphatase alcaline de crevette (2 Unités/ μ l, disponible dans le kit) afin d'éliminer les amorces de PCR et les dNTP résiduels.
3. Incuber 15 minutes à 37°C.
4. Incuber 15 minutes à 80°C pour inactiver les enzymes.

Réaction d'hybridation

1. Ajouter 3 μ l d'amorce (2,5 μ M) au 7 μ l de produits PCR traités.
2. Dénaturer en chauffant 2 à 3 minutes à 100°C.
3. Refroidir rapidement sur glace. Laisser minimum 5 minutes.

Réaction de marquage

1. Au tube contenant l'ADN, ajouter 2 μ l de tampon concentré pour la polymérase (disponible dans le kit), 2 μ l de "labelling mix" (disponible dans le kit) dilué 4 fois dans de l'eau, 1 μ l de DTT 0,1M (disponible dans le kit), 0,5 μ l de α^{35} SdATP et 2 μ l de Sequenase DNA Polymerase (1,6 U/ μ l, disponible dans le kit).
2. Laisser 2 à 3 minutes maximum à température ambiante.
3. Pendant cette incubation, dispenser 2,5 μ l des quatre mélanges de terminaison (ddATP, ddCTP, ddGTP, et ddTTP Termination Mix for dGTP Sequencing, disponibles dans le kit) dans 4 tubes séparés.

Réaction de terminaison

1. Echantillonner à raison de 3,5 μ l de mélange marqué dans chaque tube contenant les mélanges de terminaison (A, C, G, T).
2. Incuber 5 à 10 minutes à 37°C.
3. Ajouter 4 μ l de solution stop (disponible dans le kit).
4. Conserver à -20°C.

1.11.2.2. Préparation et utilisation du gel d'électrophorèse.**SOLUTIONS :**

- tampon TBE 10x: 0,89 M H_3BO_3 (acide borique, Merck), 0,89 M Tris base, 50 mM $Na_2.EDTA$, pH 8,3.
- solution acrylamide 40% / bisacrylamide 5% (Ready Sol, Pharmacia)

1. Laver les plaques successivement au NaOH 2N (2 fois), à l'HCl 2N (2 fois), à l'eau, au détergent (Instanet), à l'eau distillée, à l'acétone et au norvanol.
2. Etaler environ 2 fois 10 ml de Repel Silane sur la petite plaque, et 1 fois 10 ml sur la grande plaque. Laisser sécher.
3. Placer les spacers.
4. Préparer un gel à 4,5% d'acrylamide en mélangeant 11,3 ml de solution d'acrylamide 40% / bisacrylamide 5%, 10 ml de tampon TBE 10x, 48 ml d'eau distillée et 42 g d'urée. Filtrer (filtre 0,45 μm) et dégazer cette solution 10 minutes, ajouter 300 μl de persulfate d'ammonium 10% et 40 μl de TEMED (Merck).
5. Couler le gel entre les plaques et laisser polymériser au moins deux heures.
6. Préchauffer le gel 45 minutes à 1600 V et 60 W.
7. Mettre les peignes, rincer les puits pour éliminer l'excès d'urée et charger les échantillons (3 μl par puit) préalablement chauffés 2 minutes à 85°C.
8. Laisser migrer les échantillons le temps nécessaire (si la séquence à lire est grande, deux voire trois chargements à intervalles d'une heure seront nécessaires). Arrêter la migration.
9. Fixer le gel avec une solution d'acide acétique 10%-méthanol 10%.
10. Transférer le gel sur du papier Wathmann 17Chr et faire sécher 2 à 3 heures à 80°C, sous vide.
11. Mettre le gel sous film autoradiographique (Fuji medical X-Ray film) pendant 16 heures minimum.
12. Le film est révélé grâce au "Fuji FPM-100A Medical Film Processor" (Laboratoire de Physiologie et de Physiopathologie, Pr. Goffinet).

2. Production des phages

Les différentes restrictions réalisées sur les produits de PCR permettent d'identifier les clones porteurs d'un insert d'intérêt. Avant de tester la reconnaissance de ces phages par l'anticorps en ELISA et en dot blot, une étape de production des phages est nécessaire.

2.1. Production des phages

SOLUTIONS:

- milieu 2YT: 16 g/l tryptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl.
- TBS 10x: 0,5 M Tris base; 1,5 M NaCl; porter à pH 7,5 avec de l'HCl 6N.
- PEG-NaCl: 100 g PEG 8000; 116,9 g NaCl; 475 ml H₂O. Dissoudre en chauffant légèrement, puis autoclaver, et homogénéiser en refroidissant.

1. Inoculer une culture dans un erlen de 250 ml muni de contre-pales contenant 50 ml de milieu 2YT avec tétracycline (20 µg/ml) avec une colonie infectée par le phage d'intérêt.
2. Incuber 17 à 18h à 37°C sous forte agitation.
3. Transférer la culture dans un tube de 50 ml. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Jouan CR412.
4. Transférer le surnageant dans un nouveau tube. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm dans une centrifugeuse Jouan CR412.
5. Récupérer 40ml de surnageant, diviser en 2 fractions de 20 ml. Déposer chaque fraction sur 3 ml (0,15 volume) de PEG-NaCl. Incuber 4h à 4°C.
6. Centrifuger 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor SS-34).
7. Eliminer le surnageant, et resuspendre chaque culot dans 1 ml de TBS 1x stérile. Centrifuger 5 minutes en microfuge pour éliminer les débris insolubles.
8. Déposer le surnageant sur 150 µl (0,15 volume) de PEG-NaCl (dans un tube pour microfuge). Mélanger et incuber éventuellement quelques minutes sur glace.

9. Centrifuger 10 minutes à 10000 rpm en microfuge.
10. Eliminer le surnageant, et resuspendre chaque culot dans 200 μ l de TBS 1x-NaN₃ (azide) 0,025%. Pour chaque clone, rassembler les 2 fractions de 200 μ l.
11. Centrifuger 2 minutes à 14000 rpm en microfuge.
12. Récupérer le surnageant dans un Eppendorf stérile et stocker à 4°C.

2.2. Evaluation du nombre de particules virales

L'évaluation du nombre de particules virales peut se faire en déterminant l'absorbance à 269 nm de la solution contenant les phages. Le profil d'absorbance entre 240 et 320 nm des phages présente en effet un maximum à 269 nm. Ce maximum d'absorbance à 269 nm résulte de l'addition des profils d'absorbance des deux composants des particules phagiennes, à savoir l'ADN et les protéines, qui présentent des maxima à 260 et 280 nm, respectivement.

Pratiquement, calibrer le spectrophotomètre avec un échantillon de TBS 1x - azide 0,025% (absorbance à 280 nm = 0). Mesurer l'absorbance à 260 (A_{260}) et à 269 nm (A_{269}). Pour chaque préparation de phages diluée 40x, mesurer l' A_{260} , l' A_{269} et l' A_{280} . Calculer les ΔA_{260} et ΔA_{269} en retirant les valeurs de l' A_{260} et l' A_{269} du "blanc" aux valeurs d' A_{260} et d' A_{269} mesurées pour les préparations de phages. La valeur ΔA_{269} obtenue doit être supérieure à ΔA_{260} . Le nombre de particules phagiennes par unité de volume est calculé grâce à la formule:

$$\Delta A_{269} \times 40/15 \times 10^{14} \text{ phages/ml} = \text{nombre de phages/ml } (\phi/\text{ml})$$

3. Immuno-empreinte sur colonies et dot blot

L'immuno-empreinte sur colonies et le dot blot sont deux méthodes qui permettent de tester rapidement les capacités de reconnaissance des phages par l'anticorps.

L'avantage qu'offre le dot blot par rapport aux autres tests est que de grands nombres de phages sont concentrés sur une petite surface du filtre de nitrocellulose. La quantité de particules phagiennes par unité de surface est donc très élevée. Cependant, comme pour le test ELISA, le dot blot nécessite l'amplification des clones de phages individuellement.

L'avantage de l'immuno-empreinte sur colonies tient au fait que ce test ne nécessite aucune amplification des phages.

Ces deux tests restent néanmoins qualitatifs. Ils ne permettent pas d'obtenir des valeurs numériques comparables qui reflètent l'affinité de l'anticorps vis-à-vis des peptides portés par les phages testés.

3.1. Dot blot

SOLUTIONS :

- solution de saturation: TBS-lait écrémé en poudre 5% ; pH 7,5
- TBS 10x: 0,5 M Tris base ; 1,5 M NaCl ; ajuster à pH 7,5
- solution de révélation: 25 ml de TBS 1x + 15 µl d'une solution d'H₂O₂ 30% (Merck) + 15 mg de "HRP substrate" (Bio-Rad) dissous dans 5 ml de méthanol

1. Déposer 1 µl de chaque amplificat de phages (environ 10¹⁴ phages/ml) sur un filtre de nitrocellulose. Laisser sécher quelques minutes.
2. Mettre le filtre dans la solution de saturation. Laisser 1h à température ambiante.
3. Laver une fois dans du TBS 1x Tween₂₀ 0,1%.
4. Mettre le filtre dans le surnageant de culture d'hybridome (le surnageant de culture contient l'anticorps produit par l'hybridome) dilué 3 fois dans la solution de saturation. Incuber 2h à température ambiante, sous agitation.
5. Laver 5 fois dans du TBS 1x Tween₂₀ 0,1%.

6. Mettre le filtre dans du GAM-HRP (Goat Anti Mouse couplé à la "Horseradish Peroxydase", Prosan Dako) dilué 1000 fois dans le tampon de saturation. Incuber 1h à température ambiante et à l'obscurité, sous agitation.
7. Laver 4 fois dans du TBS 1x Tween₂₀ 0,1% et une fois dans du TBS 1x.
8. Transférer le filtre dans la solution de révélation. Laisser 45 minutes ou une nuit à température ambiante et à l'obscurité, sous agitation.
9. Stopper le réaction par deux lavages à l'eau distillée.

3.2. Immuno-empreinte sur colonies

SOLUTIONS :

- solution de saturation: TBS-lait écrémé en poudre 5% ; pH 7,5
- TBS 10x: 0,5 M Tris base ; 1,5 M NaCl ; pH 7,5
- solution de révélation: 25ml de TBS 1x + 15 µl d'une solution d'H₂O₂ 30% (Merck) + 15 mg de "HRP substrate" (Bio-Rad) dissout dans 5 ml de méthanol

1. Déposer les filtres sur les boîtes de Petri contenant les colonies (les filtres sont imprégnés d'IPTG 1 mM avant d'être déposés sur les boîtes).
2. Mettre 2h à 37°C.
3. Mettre les filtres dans la solution de saturation. Laisser 1h à température ambiante.
4. Laver une fois dans du TBS 1x Tween₂₀ 0,1%.
5. Mettre les filtres dans le surnageant de culture d'hybridome dilué 3 fois dans la solution de saturation. Incuber 2h à température ambiante, sous agitation.
6. Laver 5 fois dans du TBS 1x Tween₂₀ 0,1%.
7. Mettre les filtres dans du GAM-HRP dilué 1000 fois dans la solution de saturation. Incuber 1h à température ambiante et à l'obscurité, sous agitation.
8. Laver 4 fois dans du TBS 1x Tween₂₀ 0,1% et une fois 2 minutes dans du TBS 1x.

9. Transférer les filtres dans la solution de révélation. Laisser 45 minutes ou une nuit à température ambiante et à l'obscurité, sous agitation.

10. Stopper la réaction par deux lavages à l'eau distillée.

4. Test ELISA

Par rapport aux deux autres tests déjà décrits (immuno-empreinte sur colonies et dot blot), le test l'ELISA permet d'obtenir des valeurs numériques qui reflètent l'affinité de l'anticorps vis-à-vis des peptides présentés en surface des phages. Pour que ces valeurs puissent être comparables entre les différents clones de phages, le test est réalisé avec des quantités équivalentes de virions dans chaque puit.

SOLUTIONS :

- solution de saturation: PBS-lait écrémé en poudre 5%
- TBS 10x: 0,5 M Tris base ; 1,5 M NaCl ; ajuster à pH 7,5
- PBS 10x: 2 g/l KH_2PO_4 , 11,49 g/l Na_2HPO_4 (disodium hydrogénophosphate, Merck), 80 g/l NaCl et 2 g/l KCl. Dissoudre dans de l'eau distillée. Autoclaver si nécessaire.
- solution de dilution des anticorps: solution de saturation diluée 5 fois dans du PBS 1x

1. Sensibiliser une plaque MAXISORP (Nunc) avec 100 μl de phages dilués dans du TBS 1x.
2. Incuber une nuit à 4°C.
3. Vider les puits, ajouter 300 μl de solution de saturation et laisser incuber 2h à 37°C.
4. Laver 5 fois avec 300 μl de PBS 1x Tween₂₀ 0,1%.
5. Par puit, ajouter 100 μl du surnageant de culture d'hybridome dilué 3 fois dans la solution de dilution.
6. Laisser incuber 2h à 37°C.
7. Laver la plaque 5 fois avec 300 μl de PBS 1x Tween₂₀ 0,1%.
8. Ajouter 100 μl par puit de GAM-HRP dilué 1500 fois dans la solution de dilution. Incuber 1h à température ambiante et à l'obscurité.

9. Laver 5 fois avec 300 μ l de PBS 1x Tween₂₀ 0,1%.
10. Ajouter 100 μ l par puit de "K-Blue substrate" (Neogen) et laisser incuber 20 minutes à l'obscurité.
11. Stopper le réaction avec 25 μ l d'H₂SO₄ 2N.
12. Lire l'absorbance des puits à 450 et 630 nm.

Annexes

1/1
GAG CTC GTG ATG ACA CAG TCT CCA GCA CTC ATG GCT GCA TAT CC* *** *gA AGG TCA CCA
E L V M T Q S P A L M A A Y X X X R S P
S S * * H S L Q H S W L H I X X E G H H
A R D D T V S S T H G C I S X X K V T I
61/21 91/31
TCA CCT GCA GTG TCG ACT CAA GTA TAA GTT CAG CTA CTT GCA CTG GTA CCA GCA GAA GTC
S P A V S T Q V * V Q L L A L V P A E V
H L Q C R L K Y K F S Y L H W Y Q Q K S
T C S V D S S I S S A T C T G T S R S Q
121/41 151/51
AGG AAT ATC CCC CAA ACC CTG GAT TTA TGG CAC ATC CAA CCT GGC TTC TGG AGT CCC TGC
R N I P Q T L D L W H I Q P G F W S P C
G I S P K P W I Y G T S N L A S G V P A
E Y P P N P G F M A H P T W L L E S L L
181/61 211/71
TCG CTT CAG TGG CAG TGG ATC TGG GAC CTC TTA CTC TCT CAC AAT CAG CAG CAT GGA GGC
S L Q W Q W I W D L L L S H N Q Q H G G
R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A
A S V A V D L G P L T L S Q S A A W R L
241/81 271/91
TGA AGA Atg ctg cac tta tta ctg tca cag tgg AGT AGT TcC CCA CCC TGC ACG TTC GGT
* R M L H L L L S Q W S S S P P C T F G
E E C C T Y Y C H S G V V P H P A R S V
K N A A L I T V T V E * F P T L H V R C
301/101 331/111
Gct ggg aCC AAG CTG GAG CTG AAA *** GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA GCA TCT CcA CcA
A G T K L E L K X A D A A P T V A S P P
L G P S W S * X X L M L H Q L * H L H H
W D Q A G A E X X * C C T N C S I S T I
361/121 391/131
TcC AGT GAG CAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC tCA GTC GTG TGC TTC TTG AAC AAC TTC TAC
S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y
P V S S * H L E V P Q S C A S * T T S T
Q * A V N I W R C L S R V L L E Q L L P
421/141 451/151
CC* *AA GAC ATC AAT GTC AAG TGg AAG ATT GAT GGC AGT GAA CGA CAA AAT GGC GTC CTG
X X D I N V K W K I D G S E R Q N G V L
X K T S M S S G R L M A V N D K M A S *
X R H Q C Q V E D * W Q * T T K W R P E
481/161 511/171
AAC AGT TGG ACT GAT CAC cAC AGC AAA GAC AGC ACC TAC AGC ATG AGC AGC aCC CTC ACG
N S W T D H H S K D S T Y S M S S T L T
T V G L I T T A K T A P T A * A A P S R
Q L D * S P Q Q R Q H L Q H E Q H P H V
541/181 571/191
TTG ACC AAG GAC GAG TAT GAA CGA CAT AAC AGC TAT ACC TGT GAG GCC ACT CAC AAG ACA
L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K T
* P R T S M N D I T A I P V R P L T R H
D Q G R V * T T * Q L Y L * G H S Q D I
601/201 631/211
TCA ACT TCA CCC ATT GTC AAG AGC tca cag aaT GAG TGT TAA TTC TAG A
S T S P I V K S S Q N E C * F *
Q L H P L S R A H R M S V N S R
N F T H C Q E L T E * V L I L

Annexe 1:

Séquence de l'insert nucléotidique porté par un clone L (séquençage manuel). La traduction de la séquence en acides aminés selon trois phases de lecture est également présentée. Les nucléotides sont notés en minuscules lorsque la lecture de la séquence est incertaine. Les * dans la séquence nucléotidique représentent une des quatre bases.

Les * dans la séquence peptidique représentent des "stop" de traduction.

34/1
GAC TCG TGC TCA CCC GGT CTC CAG CAC TCA TGG CTG CAT CTC CAG GGG AGA AGG TCA CCA
D S C S P G L Q H S W L H L Q G R R S P
T R A S H P V S S T H G C I S R G E G H H
L V L T R S P A L M A A S P G E K V T I

94/21
TCA CCT GCA GTG TCG ACT CA* GTA TAA GTT CCA GCT ACT TGC ACT GGT ACC AGC AGA AGT
S P A V S T X V * V P A T C T G T S R S
H L Q C R L X Y K F Q L L A L V P A E V
T C S V D S X I S S S Y L H W Y Q Q K S

124/31
154/41
184/51
CAG GAA TCT CCC CCA AAC CCT GGA TTT ATG GCA CAT CCA ACC TGG CTT CTG GAG TCC CTG
Q E S P P N P G F M A H P T W L L E S L
R N L P Q T L D L W H I Q P G F W S P C
G I S P K P W I Y G T S N L A S G V P A

214/61
244/71
CTC GCT TCA GTG GCA GTG GAT CTG GGA CCT CTT ACT CTC TCA CAA TCA GCA GCA TGG AGG
L A S V A V D L G P L T L S Q S A A W R
S L Q W Q W I W D L L L S H N Q Q H G G
R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A

274/81
304/91
CTG AAG ATG CTG CCA CTT ATT ACT GTC AAC AGT GGG AGT AGT CCC CAC CCA TGC ACG TTC
L K M L P L I T V N S G S S P H P C T F
* R C C H L L L S T V G V V P T H A R S
E D A A T Y Y C Q Q W E * S P P M H V R

334/101
364/111
GGT GCT GGG ACC AAA CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA aCA ACT GTA TCC ATC TCC
G A G T K L E L K R A D A A T T V S I S
V L G P N W S * N G L M L Q Q L Y P S P
C W D Q T G A E T G * C C N N C I H L P

394/121
424/131
CAC CAT CCA GTG AGC AGT TAA CAT CTG GAG GTG CaT CAG TCG TGT GCT TCT TGA ACA ACT
H H P V S S * H L E V H Q S C A S * T T
T I Q * A V N I W R C I S R V L L E Q L
P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F

454/141
484/151
TCT ACC CCA AAG ACA TCA ATG TCA AGT GGA AGA TTG ATG GCA GTG AAC GAC AAA ATG GCG
S T P K T S M S S G R L M A V N D K M A
L P Q R H Q C Q V E D * W Q * T T K W R
Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V

514/161
544/171
TCC TGA ACA GTT GGA CTG ATC AGG ACA GCA AAG ACA GCA CCT ACA GCA TGA GCA GCA CCC
S * T V G L I R T A K T A P T A * A A P
P E Q L D * S G Q Q R Q H L Q H E Q H P
L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L

574/181
604/191
TCA CGT TGA CCA AGG ACG AGT ATG AAC GAC ATA ACA GCT ATA CCT GTG AGG CCA CTC ACA
S R * P R T S M N D I T A I P V R P L T
H V D Q G R V * T T * Q L Y L * G H S Q
T L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K

634/201
664/211
AGA CAT CAA CTT CAC CCA TTG TCA AGA GCT TTC AAC AGG AAT GAG TGT TAA TTC TAG A
R H Q L H P L S R A F N R N E C * F *
D I N F T H C Q E L S T G M S V N S R
T S T S P I V K S F Q Q E * V L I L

Annexe 2:

Séquence de l'insert nucléotidique porté par un clone L3.1 (séquençage automatique). La traduction de la séquence en acides aminés selon trois phases de lecture est également présentée. Les nucléotides sont notés en minuscules lorsque la lecture de la séquence est incertaine. Les * dans la séquence nucléotidique représentent une des quatre bases. Les * dans la séquence peptidique représentent des "stop" de traduction.

31/1

GAG CTC GTG CTC ACC AGT CTC CAG CAC TCA TGG CTG CAT CTC CAG GGG GAA GAA GGT CAC
E L V L T S L Q H S W L H L Q G E E G H
S S C S P V S S T H G C I S R G K K V T
A R A H Q S P A L M A A S P G G R R S P

91/21

121/31

CAT CAC CTG CAG TGT CGA CTC AAG TAT AAG TTC CAG CTA CTT GCA CTG GTA CCA GCA GAA
H H L Q C R L K Y K F Q L L A L V P A E
I T C S V D S S I S S S Y L H W Y Q Q K
S P A V S T Q V * V P A T C T G T S R S

151/41

181/51

GTC AGG AAT CTC CCC CAA ACC CTG GAT TTA TGG CAC ATC CAA CCT GGC TTC TGG AGT CCC
V R N L P Q T L D L W H I Q P G F W S P
S G I S P K P W I Y G T S N L A S G V P
Q E S P P N P G F M A H P T W L L E S L

211/61

241/71

TGC TCG CTT CAG TGG CAG TGG ATC TGG GAC CTC TTA CTC TCT CAC AAT CAG CAG CAT GGA
C S L Q W Q W I W D L L L S H N Q Q H G
A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M D
L A S V A V D L G P L T L S Q S A A W T

271/81

301/91

CGC TGA AGA TGC TGC CAC TTA TTA CTG TCA ACA GTG GAG TAG TTC CCC ACC CAT GCA CGT
R * R C C H L L L S T V E * F P T H A R
A E D A A T Y Y C Q Q W S S S P P M H V
L K M L P L I T V N S G V V P H P C T F

331/101

361/111

TCG GTG CTG GGA CCA AGC TGG AGC TGA AAC GGG CTG ATG CTG CAC CAA CTG TAT CCA TCT
S V L G P S W S * N G L M L H Q L Y P S
R C W D Q A G A E T G * C C T N C I H L
G A G T K L E L K R A D A A P T V S I F

391/121

421/131

TCC CAC CAT CCA GTG AGC AGT TAA CAT CTG GAG GTG CTT CAG TCG TGT GTT CTT GAA CAA
S H H P V S S * H L E V L Q S C V L E Q
P T I Q * A V N I W R C F S R V F L N N
P P S S E Q L T S G G A S V V C S * T T

451/141

481/151

CTT cTA CCC CAA AGA CAT CAA TGT CAA GTG GAA GAT TGA TGG CAG TGA ACG ACA AAA TGG
L L P Q R H Q C Q V E D * W Q * T T K W
F Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G
S T P K T S M S S G R L M A V N D K M A

511/161

541/171

CGT CCT GAA CAG TTG GAC TGA TCA GGA CAG CAA AGA CAG CAC cTA CAG CAT GAG CAG CAC
R P E Q L D * S G Q Q R Q H L Q H E Q H
V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T
S * T V G L I R T A K T A P T A * A A P

571/181

601/191

CCT CAC GTT GAC CAA GGA CGA GTA TGA ACG ACA TAA CAG CTA TAC CTG TGA GGC CAC TCA
P H V D Q G R V * T T * Q L Y L * G H S
L T L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H
S R * P R T S M N D I T A I P V R P L T

631/201

661/211

CAA GAC ATC AAC TTC ACC CAT TGT CAA GAG CTT CAA CAG GAA TGA GTG TTA ATT CTA GA
Q D I N F T H C Q E L Q Q E * V L I L
K T S T S P I V K S F N R N E C * F *
R H Q L H P L S R A S T G M S V N S R

Annexe 3:

Séquence de l'insert nucléotidique porté par un clone L9.2 (séquençage automatique). La traduction de la séquence en acides aminés selon trois phases de lecture est également présentée. Les nucléotides sont notés en minuscules lorsque la lecture de la séquence est incertaine. Les * dans la séquence nucléotidique représentent une des quatre bases.

Les * dans la séquence peptidique représentent des "stop" de traduction.

60/1

CTC GAG TCA GGG TGG TTT GGA TTT TAC AGA AGT GGC CAA GCT AAG GAA ACC ATT CCC CTC
L E S S G W F G F Y R S G Q A K E T I P L
S S Q G G L D F T E V A K L R K P F P S
R V R V V W I L Q K W P S * G N H S P P

120/21

CAG GAA GAG CAC TCT ATA CAC AGA GGA CCG CCT GGG GCT AAA GAA AAT GGA CAA AGC AGG
Q E E H S I H R G P P G A K E N G Q S R
R K S T L Y T E D R L G L K K M D K A G
G R A L Y T Q R T A W G * R K W T K Q E

180/41

AAA GCT AGT GTT TCT GGC TAA GGA AGG GGA CCA TCT TCA AAT ATC TAA AGA ATG GTT TAC
K A S V S G * G R G P S S N I * R M V Y
K L V F L A K E G D H L Q I S K E W F T
S * C F W L R K G T I F K Y L K N G L L

240/61

TGC CCA CAT CAT ACC TTT TCT TAA GTG ATG CCC TGG CAC TTT ATA GCA GAG TTC ATG AAA
C P H H T F S * V M P W H F I A E F M K
A H I I P F L K * C P G T L * Q S S * N
P T S Y L F L S D A L A L Y S R V H E T

300/81

CCA CAG CTC TTC CAA GCC ATG TAC ATA GTT CAT GCT CAG CCT GAA CTC TAA TCT AAC CTG
P Q L F Q A M Y I V H A Q P E L * S N L
H S S S K P C T * F M L S L N S N L T C
T A L P S H V H S S C S A * T L I * P A

360/101

CAA CCA GCC CTT CTC TCC TCT TAT CAT CTA ACA TAC CCT ACT TGG AAA GAT CTA AGA TCT
Q P A L L S S Y H L T Y P T W K D L R S
N Q P F S P L I I * H T L L G K I * D L
T S P S L L L S S N I P Y L E R S K I S

420/121

CAA TCT TAT CCT TTG CCG CCT GCT ATC ACC ATA TGG TGT TGG ATT CAA GTT TAA TTA GCT
Q S Y P L P P A I T I W C W I Q V * L A
N L I L C R L L S P Y G V G F K F N * L
I L S F A A C Y H H M V L D S S L I S *

480/141

AAT AAC CAT GGA GAT TGT TTT ACA ACT TTG TGA TAT GGT CAA GCT CCC GTT TAA GAA ATG
N N H G D C F T T L * Y G Q A P V * E M
I T M E I V L Q L C D M V K L P F K K W
* P W R L F Y N F V I W S S S R L R N G

540/161

GGA GTC TGT TGT TGC AGA TCA GTA ATT GTG CCC AGG GAT TGT ACT AGT
G V C C C R S V I V P R D C T S
E S V V A D Q * L C P G I V L
S L L L Q I S N C A Q G L Y *

Annexe 4:

Séquence de l'insert nucléotidique porté par un clone H4.1 (séquençage automatique). La traduction de la séquence en acides aminés selon trois phases de lecture est également présentée. Les nucléotides sont notés en minuscules lorsque la lecture de la séquence est incertaine. Les * dans la séquence nucléotidique représentent une des quatre bases.

Les * dans la séquence peptidique représentent des "stop" de traduction.

25/1
TGA CTA GTT ACA CTC ATA TAG GCG AAT TGG GTA CGG GCC CCC CTC GAT CTG GGG GAG CTT
* L V T L I * A N W V R A P L D L G E L
D * L H S Y R R I G Y G P P S I W G S L
T S Y T H I G E L G T G P P R S G G A *

85/21 115/31
AAT GCA CCT GGA AGG TCC CGG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT CCC
N A P G R S R K L S C A A S G F T F S P
M H L E G P G N S P V Q P L D S L S V P
C T W K V P E T L L C S L W I H F Q S L

145/41 175/51
TTT GGA ATG CAC TGG GTT CGT CAG GCT CCA AAG AAG GGC TGG AGT GGG TCG CAT ACA TTA
F G M H W V R Q A P K K G W S G S H T L
L E C T G F V R L Q R R A G V G R I H *
W N A L G S S G S K E G L E W V A Y I S

205/61 235/71
GTG GTG ACA GTA ATA CCA TCT ACT ATG CAG ACA CAT TGA AGG GCC GAA TCA CCA TCT CCA
V V T V I P S T M Q T H * R A E S P S P
W * Q * Y H L L C R H I E G P N H H L Q
G D S N T I Y Y A D T L K G R I T I S R

265/81 295/91
GAG ACA ATC CCA AGA ACA CCC TGT TCC TGC AAA TGA CCA GTC TAA GGT CTG AGG ACA CGG
E T I P R T P C S C K * P V * G L R T R
R Q S Q E H P V P A N D Q S K V * G H G
D N P K N T L F L Q M T S L R S E D T A

325/101 355/111
CCA TGT ATT ACT GTT CAC GAA GGG GTA ACT GGG CTA TGG ACT ACT GGG GTC AAG GAA CCT
P C I T V H E G V T G L W T T G V K E P
H V L L F T K G * L G Y G L L G S R N L
M Y Y C S R R G N W A M D Y W G Q G T S

385/121 415/131
CAT TCa CCG TCT CCT CAG CCA AAA CGA CAC CCC CAT CTG TCT ATC CAC TGG CCC CTG GAT
H S P S P Q P K R H P H L S I H W P L D
I H R L L S Q N D T P I C L S T G P W I
F T V S S A K T T P P S V Y P L A P G S

445/141 475/151
CTG CTG CCC AAA CTA ACT CCA TGG TGA CCC TGG GAT GCC TGG TCA AGG GCT ATT TCC CTG
L L P K L T P W * P W D A W S R A I S L
C C P N * L H G D P G M P G Q G L F P *
A A Q T N S M V T L G C L V K G Y F P E

505/161 535/171
AGC CAG TGA CAG TGA CCT GGA ACT CTG GAT CCC TGT CCA GCG GTG TGC ACA CCT TCC CAG
S Q * Q * P G T L D P C P A V C T P S Q
A S D S D L E L W I P V Q R C A H L P S
P V T V T W N S G S L S S G V H T F P A

565/181 595/191
CTG TCC TGC AGT CTG ACC TCT ACA CTC TGA GCA GCT CAG TGA CTG TCC CCT CGA G
L S C S L T S T L * A A Q * L S P R
C P A V * P L H S E Q L S D C P L E
V L Q S D L Y T L S S S V T V P S

Annexe 5:

Séquence de l'insert nucléotidique porté par un clone H7.1 (séquençage automatique). La traduction de la séquence en acides aminés selon trois phases de lecture est également présentée. Les nucléotides sont notés en minuscules lorsque la lecture de la séquence est incertaine. Les * dans la séquence nucléotidique représentent une des quatre bases.

Les * dans la séquence peptidique représentent des "stop" de traduction.

INSERT	Longueur	Sau3A	HpaI	RsaI
PC CDR 1	369	369	369	186 183
PC CDR 2	374	374	216 158	374
PC CDR 3	362	186 176	362	362
PC CDR 1+2	419	419	216 203	237 182
PC CDR 1+3	407	221 186	407	225 182
PC CDR 2+3	413	227 186	255 158	413
PC CDR 1+2+3	458	272 186	255 203	276 182
f88-4-CYS6	390	390	390	390
f88-4-CYS4	384	384	384	384

Annexe 6:

Tableau récapitulatif montrant les tailles des fragments obtenus après restriction par les enzymes *Hpa* I, *Rsa* I et *Sau* 3A sur les produits PCR des phages portant une ou plusieurs séquences encodant un peptide complémentaire à un CDR de la chaîne lourde de l'AcMo 12G12 (PC CDR). Longueur: longueur du produit PCR, en paires de bases. f88-4-Cys: matrices phagiennes utilisées pour l'insertion de l'adaptateur 12G12H (décrites au paragraphe 1.7 du matériel et méthodes).

Bibliographie

Alton, G.G, Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris (1988).

Altschul, S.P., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990).

Beattie, J. and Flint, D.J. Critical evaluation of a theory of molecular recognition using human insulin-like-growth-factor-I fragment 21-40 and its complementary peptide. *Biochem. J.*, 283: 473-478 (1992).

Berche, P., Gaillard, J.L. and Simonet, M. Brucelles. In "Bactériologie. Bactéries des infections humaines", p. 189-199. Flammarion Médecine-Sciences, Paris (1988).

Blalock, J.E. and Smith, E.M. Hydrophobic anti-complementarity of amino acids based on the genetic code. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121: 203-207 (1984).

Blalock, J.E. and Bost, K.L. Binding of peptides that are specified by complementary RNAs. *Biochem. J.*, 234: 679-683 (1986).

Blalock, J.E. Complementarity of peptides specified by "sense" and "antisense" strands of DNA. *Trends Bio. Tech.*, 8: 140-144 (1990).

Bost, K.L., Smith, E.M. and Blalock, J.E. Similarity between the corticotropin (ACTH) receptor and a peptide encoded by an RNA that is complementary to ACTH mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1372-1375 (1985a).

Bost, K.L., Smith, E.M. and Blalock, J.E. Regions of complementarity between the messenger RNAs for Epidermal Growth Factor, transferrin, interleukin-2 and their respective receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 128: 1373-1380 (1985b).

Brentani, R.R., Ribeiro, S.F., Potocnjak, P., Pasqualini, R., Lopes, J.D. and Nakaie, C.R. Characterization of the cellular receptor for fibronectin through a hydrophobic complementarity approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 364-367 (1988).

Bundle, D.R., Cherwonogrodzky, J.W. and Perry, M.B. The structure of the lipopolysaccharide O-chain (M antigen) and polysaccharide B produced by *Brucella melitensis* 16M. *FEBS Lett.*, 216: 261-264 (1987).

Bundle, D.R., Cherwonogrodzky J.W., Gidney, M.A.J., Meikle, P.J., Perry, M.B. and Peters, T. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect. Immun.*, 57: 2829-2836 (1989).

Caroff, M., Bundle, D.R., Perry, B.M., Cherwonogrodzky, J.W. and Duncan, J.R. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect. Immun.*, 46: 384-388 (1984a).

Caroff, M., Bundle, D.R. and Perry, M.B. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Eur. J. Biochem.*, 139: 195-200 (1984b).

Carr, D.J.J., Bost, K.L. and Blalock, J.E. An antibody to a peptide specified by an RNA that is complementary to γ -endorphin m-RNA recognizes an opiate receptor. *J. Neuroimmunol.*, 12: 329-337 (1986).

Corbel, M.J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Veterinary Bulletin*, 55: 927-942 (1985).

Crissman, J.W. and Smith, G.P. Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology*, 132: 445-455 (1984).

Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W. and Dower, W.J. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6378-6382 (1990).

Delvin, J.J., Panganiban, L.C., and Delvin, P.E. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science*, 249: 404-406 (1990).

Douglas, J.T. and Palmer, D.A. Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 1353-1356 (1988).

Elton, T.S., Dion, L.D., Bost, K.L., Oparil, S. and Blalock, J.E. Purification of an angiotensin II binding protein by using antibodies to a peptide encoded by angiotensin II complementary RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2518-2522 (1988).

Fassina, G., Roller, P.P., Olson, A.D., Thorgeirsson, S.S. and Omichinski, J.G. Recognition properties of peptides hydrophatically complementary to residues 356-375 of the *c-raf* protein. *J. Biol. Chem.*, 264: 11252-11257 (1989).

Fassina, G. and Meli, M. Identification of interactive sites of proteins and protein receptors by computer-assisted searches for complementary peptide sequences. *Immunomethods*, 5: 114-120 (1994).

Felici, F., Luzzago, A., Folgori, A. and Cortese, R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. *Gene*, 128: 21-27 (1993).

Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfré, G., Cortese, R., Monaci, P. and Nicosia, A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.*, 13: 2236-2243 (1994).

Gallop, M.A., Barrett, R.W., Dower, W.J., Fodor, S.P.A. and Gordon, E.M. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J. Med. Chem.*, 37: 1233-1251 (1994).

Ghiso, J., Saball, E., Leoni, J., Rostagno, A. and Frangione, B. Binding of cystatin C to C4: the importance of sense-antisense peptides in their interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1288-1291 (1990).

Harris, S.L., Craig, L., Mehroke, J.S., Rashed, M., Zwick, M.B., Kenar, K., Toone, E.J., Greenspan, N., Auzanneau, F.I., Marino-Albernas, J.R., Pinto, B.M. and Scott, J.K. Exploring the basis of peptide-carbohydrate crossreactivity: evidence for discrimination by peptide between closely related anti-carbohydrate antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 2454-2459 (1997).

Hoess, R., Brinkmann, U., Handel, T. and Pastan, I. Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene*, 128: 43-49 (1993).

Kyte J. and Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132 (1982).

Letesson, J.J., Tibor, A., Van Eynde, G., Wansard, V., Weynants, V., Denoel, P. and Saman, E. Analysis of the humoral immune response of *Brucella* infected cattle, sheep and goats using eight purified recombinant *Brucella* proteins in iELISA. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, soumis pour publication (1997).

Maier, C.C., Moseley, H.N.B., Zhou, S.R., Whitaker, J.N. and Blalock, J.E. Identification of interactive determinants on idiotypic-anti-idiotypic antibodies through comparison of their hydropathic profiles. *Immunomethods*, 5: 107-113 (1994).

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

Markus, G., Tritsch, G.L. and Parthasarathy, R. A model for hydrophathy-based peptide interactions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 272: 433-439 (1989).

Mounts, P., Wu, T.C. and Peden, K. Method for cloning single-stranded oligonucleotides in a plasmid vector. *BioTechniques*, 7: 356-359 (1989).

Mulchahey, J.J., Neill, J.D., Dion, L.D., Bost, K.L. and Blalock, J.E. Antibodies to the binding site of the receptor for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH): generation with a synthetic decapeptide encoded by an RNA complementary to LHRH mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 9714-9728 (1986).

Novotny, J., Handschumacher, M. and Bruccoleri, R.E. Protein antigenicity: a static surface property. *Immunology Today*, 8: 26-31 (1987).

Oldenburg, K.R., Loganathan, D., Goldstein, I.J., Schultz, P.G. and Gallop, M.A. Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5393-5397 (1992).

Palmer, D.A. and Douglas, J.T. Analysis of *Brucella* lipopolysaccharide with specific and cross-reacting monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 2331-2337 (1989).

Parmley, S.F. and Smith, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, 73: 305-318 (1988).

Rashed, I. and Oberer, E. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol. Rev.*, 50: 401-427 (1986).

Roitt, I.M., Brostoff, J. and Male, D.K. Immunologie. De Boeck Université, Bruxelles (1994).

Scott, J.K. Discovering peptide ligands using epitope libraries. *TIBS*, 17: 241-245 (1992).

Scott, J.K. and Smith, G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 249: 386-390 (1990).

Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228: 1315-1316 (1985).

Smith, G.P. Surface display and peptide libraries. *Gene*, 128: (1993).

Tritsch, G.L. Proposed loci of interaction between bombesin and its receptor. *J. Mol. Rec.*, 4: 53-56 (1991).

Webster, R.E. Biology of the filamentous bacteriophage. In "Phage display of peptides and proteins" (Kay, B.K., Winter, J., McCafferty, J., eds.), p. 1-20. Academic Press, San Diego (1996).

Weynants, V., Gilson, D., Cloeckert, A., Denoel, P.A., Tibor, A., Thiange, P., Limet, J.N. and Letesson, J.J. Characterization of a monoclonal antibody specific for *Brucella* smooth lipopolysaccharide and development of a competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 3: 309-314 (1996).

Weynants, V., Gilson, D., Cloeckert, A., Tibor, A., Denoel, P.A., Godfroid, F., Limet, J.N. and Letesson, J.J. Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect. Immunol.*, 65: 1939-1943 (1997).

Zhang, H., Zhong, Z. and Pirofski, L.A. Peptide epitopes recognized by a human anti-cryptococcal glucuronoxylomannan antibody. *Infect. Immunol.*, 65: 1158-1164 (1997).