



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation des mimotopes peptidiques de l'épitope C du lipopolysaccharide de *Brucella*

Van Cleve, Jacques

Award date:
2000

[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.



SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Caractérisation des mimotopes peptidiques de l'épitope C du
lipopolysaccharide de *Brucella*

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

Jacques Van Cleve

Juin 2000

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Caractérisation de mimotopes peptidiques de l'épitope C du lipopolysaccharide de *Brucella*

VAN CLEVE Jacques

Résumé

Ce travail s'inscrit dans la recherche de peptides mimétiques d'épitopes de la chaîne O du LPS de *Brucella* aussi appelés mimotopes. De tels peptides mimotopes aurait un intérêt dans le contrôle de la brucellose en permettant de nouvelles approches tant diagnostiques que vaccinales. L'Ac monoclonal 12B12 dirigé contre la chaîne O de *Brucella* reconnaît toutes les souches de *Brucella* et pas les bactéries dont le LPS est structuralement proche, telle que *Yersinia enterocolitica* O:9. Cet Ac monoclonal a servi à sélectionner et isoler des peptides dans des banques de peptides aléatoire exprimés en surface de phages filamenteux. Lors de ce travail nous avons isolé et séquencé 21 peptides. L'analyse de ces 21 peptides nous a permis de déterminer des séquences consensus importante pour la reconnaissance par l'Ac.
Les phages porteurs de ces 21 peptides ont été produits afin de réaliser des tests ELISA indirect et de compétition.
Onze peptides sur les 21 sélectionnés sont capable d'inhiber la fixation de l'Ac au LPS.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2000

Promoteur: J.-J. Letesson

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Jean-Jacques Letesson pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire dans son laboratoire.

Un grand merci à toi Poos pour tout ce que tu m'auras appris et la patience que tu y auras mis.

Je remercie en mon nom et en celui de Jocko: Xavier pour sa disponibilité et ses conseils avisés tout au long de mon parcours de mémorant.

Je remercie Art M., Dewelle J., Liners F., Raes M. pour avoir accepté de lire ce travail.

Un merci tout particulier à Thierry pour son aide tout au long de ce mémoire et pour ces soirées festives ou ludiques passées ensemble.

Merci à Bernard et Kat pour leur sympathie et leur soutien tout au long de ce mémoire et à tous les autres membres du labo pour leur accueil et à Valery pour ces longues discussions au bench.

Un merci à tous les memorants pour avoir partagé ces moments de plaisir et de douleurs qui parsèment le parcours d'étudiant.

Merci à ma famille pour leur soutien et encouragements.

Et enfin un merci particulier à Carole pour tout et tout le reste sans qui ces années d'études auraient été un bien long parcours.

Je me dois aussi de dédier à ces dernières semaines de rédaction à trois mots qui m'auront posés plus de problèmes que je ne l'aurais imaginé. Il s'agit de: "développer", "expliquer" et surtout "PLOUF !!!".

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Historique.....	1
1.2. <i>Brucella</i>	1
1.3. Le LPS de <i>Brucella</i>	2
1.3.1. Structure	2
1.3.2. Les épitopes du LPS.....	2
1.4. Brucellose animale et humaine	3
1.4.1 Brucellose animale	3
1.4.2. Brucellose humaine.....	4
1.5. Situation sanitaire et dépistage.....	5
1.5.1. Situation sanitaire.....	5
1.5.2. Dépistage	6
1.6. Réactions sérologiques faussement positives	8
1.6.1. Les réactions sérologiques croisées.....	8
1.6.2. Parenté antigénique	8
1.7. Les mimotopes	10
1.7.1 Mimotope peptidique	10
1.7.2. La synthèse peptidique chimique ou biologique.....	11
1.7.3. Recherche d'un mimotope à partir de banques peptidiques.....	12
1.7.3.1. Présentation de peptides à la surface de phages.....	12
1.7.3.1.1. Les phages filamenteux	12
1.7.3.1.2. Types de présentations.....	12
1.7.3.2. Outil de sélection.....	13
1.7.4. Intérêt de la sélection de mimotopes du LPS de <i>Brucella</i>	14
1.8. Objectif du mémoire.	16
2. Résultats et discussion.....	17
2.1 Criblage des colonies par immuno-empreinte.....	17
2.2. PCR et séquençage des clones sélectionnés	18
2.2.1. Séquence obtenue.....	18
2.3. Analyse des séquences obtenues	19
2.3.1 Analyse des fréquences relatives des acides aminés de peptides sélectionnés.....	20
2.3.1.1. Fréquences attendues en acide aminé.....	20
2.3.2.2. Analyse des séquences.....	20
2.3.2. Recherche des séquences consensus	21
2.4. Production des phages pour les tests fonctionnels en ELISA	24
2.5. Test ELISA indirect	24
2.6 Test ELISA de compétition	26
2.6.1. Mise au point de l'ELISA.....	26
2.6.2. ELISA de compétition	26

Table des matières

2.7. immuno-empreinte sur colonies infectées avec des éluats de pannings réalisés avec 12B12 et 12G12	28
3. Conclusion et perspectives	31
3.1. Conclusion	31
3.2. Perspectives.....	33
4. Matériel et méthodes	36
4.1. Sélection des peptides en phage	36
4.1.1. Immuno-empreinte sur colonies (CIB).....	36
4.1.2. Intérêt de coupler les techniques de panning et de CIB.....	37
4.2. P.C.R. et séquençage	38
4.2.1. P.C.R.....	38
4.2.2. Séquençage	39
4.2.2.1. Purification de l'échantillon amplifié par PCR.....	39
4.2.2.2 Séquençage.....	40
4.3. Électrophorèse en gel d'agarose	41
4.4. Production de phages et évaluation de la quantité de phages produits.....	42
4.4.1. Production de phages	42
4.4.2. Évaluation du nombre de particules phagiennes.....	44
4.5. Purification d'ADN plasmidique.....	45
4.6. Transformation de cellules.....	46
4.7. Test ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay).....	46
4.7.1. ELISA indirect	47
4.7.2. ELISA de compétition	48
4.8. Souches utilisées.....	49
5. Annexes	50
6. Bibliographie	51

1. Introduction

1.1. Historique

La découverte de la brucellose a pour origine l'île de Malte au 18^{ème} siècle. C'est, en effet, lors des guerres napoléoniennes que furent décrits les premiers symptômes de la maladie appelée "corps disease" ou maladie du corps expéditionnaire britannique.

L'agent causal de cette maladie est isolé pour la première fois en 1887 à partir de la rate d'un soldat. Il est décrit comme un bacille Gram négatif et sera nommé *Micrococcus melitensis*. En 1905, la chèvre sera identifiée comme le réservoir animal du germe et la source de contamination humaine.

À la même époque, un chercheur danois isole un bacille à partir d'un fœtus d'une vache ayant avorté (*Bacterium abortus*) et aux États-Unis un autre bacille est isolé, responsable de l'avortement chez la truie.

En 1920, ces deux bacilles seront regroupés dans un nouveau genre qui contiendra les deux espèces : *Brucella melitensis* et *Brucella abortus*. C'est en 1929 que l'agent causal de l'avortement chez la truie sera considéré comme étant une espèce distincte de *Brucella abortus*. Elle sera dénommée *Brucella suis*. (Tibor, 1999) ; (Weynants, 1998) ; (Mandell G.L., 1990)

Depuis 1966, 3 autres espèces ont été découvertes : *B. ovis*, *B. neotomae* et *B. canis*, ainsi que de nouvelles souches récemment isolées de mammifères marins. (Ewalt *et al.*, 1998); (Clavareau *et al.*, 1997)

1.2. Brucella

Les *Brucellas* sont de petits coccobacilles, non sporulés, Gram négatifs et mesurant de 0,6 à 1,5 µm sur 0,5 à 0,8 µm. Ces bactéries sont des pathogènes intracellulaires facultatifs. Ils ont une croissance lente et aérobique. Bien qu'asporulées, les bactéries peuvent survivre plusieurs mois dans le milieu extérieur. Le phénotype lisse est attribué au *Brucella* présentant la chaîne O du lipopolysaccharide (LPS) à savoir *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. neotomae*. Par contre *B. canis* et *B. ovis* ont un phénotype rugueux dû à l'absence de chaîne O sur le LPS. La chaîne O est un facteur important dans la virulence. Des mutants "rugueux" qui n'expriment pas la chaîne O sont généralement moins virulents. (Alton *et al.*, 1988)

1. Introduction

1.1. Historique

La découverte de la brucellose a pour origine l'île de Malte au 18^{ème} siècle. C'est, en effet, lors des guerres napoléoniennes que furent décrits les premiers symptômes de la maladie appelée "corps disease" ou maladie du corps expéditionnaire britannique.

L'agent causal de cette maladie est isolé pour la première fois en 1887 à partir de la rate d'un soldat. Il est décrit comme un bacille Gram négatif et sera nommé *Micrococcus melitensis*. En 1905, la chèvre sera identifiée comme le réservoir animal du germe et la source de contamination humaine.

À la même époque, un chercheur danois isole un bacille à partir d'un fœtus d'une vache ayant avorté (*Bacterium abortus*) et aux États-Unis un autre bacille est isolé, responsable de l'avortement chez la truie.

En 1920, ces deux bacilles seront regroupés dans un nouveau genre qui contiendra les deux espèces : *Brucella melitensis* et *Brucella abortus*. C'est en 1929 que l'agent causal de l'avortement chez la truie sera considéré comme étant une espèce distincte de *Brucella abortus*. Elle sera dénommée *Brucella suis*. (Tibor, 1999) ; (Weynants, 1998) ; (Mandell G.L., 1990)

Depuis 1966, 3 autres espèces ont été découvertes : *B. ovis*, *B. neotomae* et *B. canis*, ainsi que de nouvelles souches récemment isolées de mammifères marins. (Ewalt *et al.*, 1998); (Clavareau *et al.*, 1997)

1.2. Brucella

Les *Brucellas* sont de petits coccobacilles, non sporulés, Gram négatifs et mesurant de 0,6 à 1,5 µm sur 0,5 à 0,8 µm. Ces bactéries sont des pathogènes intracellulaires facultatifs. Ils ont une croissance lente et aérobique. Bien qu'asporulées, les bactéries peuvent survivre plusieurs mois dans le milieu extérieur. Le phénotype lisse est attribué au *Brucella* présentant la chaîne O du lipopolysaccharide (LPS) à savoir *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. neotomae*. Par contre *B. canis* et *B. ovis* ont un phénotype rugueux dû à l'absence de chaîne O sur le LPS. La chaîne O est un facteur important dans la virulence. Des mutants "rugueux" qui n'expriment pas la chaîne O sont généralement moins virulents. (Alton *et al.*, 1988)

1.3. Le LPS de *Brucella*

1.3.1. Structure

Le LPS est le composant majeur du feuillet externe de la membrane externe des bactéries Gram négatives. Chez ces bactéries, il constitue la partie la plus externe en contact avec l'environnement. Il est considéré comme un antigène majoritaire et un facteur de virulence. Son caractère fortement immunogène le rend important du point de vue diagnostique et vaccinal. (Figure 1)

Le LPS est constitué de trois régions : le lipide A, le core et la chaîne O.

Le lipide A constitue l'ancre glucolipidique, le core est constitué de D-glucose, D-mannose et de 2-amino-2,6-didéoxy-D-glucose. Le 2-céto-3-didésoxyoctanate lie le core au lipide A.

Le LPS sera dit S-LPS ou R-LPS selon qu'il possède ou non une chaîne O. Cette dernière est constituée de plusieurs dizaines de résidus 4,6-dideoxy-4-formamido- α -D mannopyranoses non branchés. Les liaisons entre les résidus peuvent être de deux types : α -1,2 ou α -1,3 (Cherwonogrodzky, 1990)(Figure 2)

La chaîne O du LPS de *Brucella*, de part sa structure, permet de classer les souches en deux groupes : les souches A-dominantes contiennent 2 % de liaison α -1,3 ; tandis que les souches M-dominantes contiennent 20 % de liaison α -1,3.

Il existe également une souche possédant un pourcentage de lien α -1,3 avoisinant les 10 % (Bundle *et al.*, 1989)

1.3.2. Les épitopes du LPS

Les AcM dirigés contre le LPS de *Brucella* reconnaissent différemment ces souches. Classiquement, on peut définir 4 épitopes :

- l'épitope A, les AcM ne reconnaissant que les souches A-dominantes;
- l'épitope M, les AcM ne reconnaissant que les souches M-dominantes;
- l'épitope C, les AcM reconnaissent les deux types de souches A et M-dominantes;
- l'épitope C/Y, les AcM reconnaissent les deux types de souches A et M-dominantes et la souche *Yersinia enterocolitica* O:9 dont la chaîne O est constituée d'une suite de résidus pérosamines unis par des liaisons α -1,2 et ne possédant aucune liaison α -1,3. Ceci la rend très proche de la chaîne O de *Brucella* (souche A dominante). (Figure 3)

Il faudrait plutôt classer les Acm en fonction d'une "réactivité type" car il y a autant d'épitopes que d'Acm. En effet, deux Acm classés "C" ne reconnaissent pas nécessairement deux souches A et M-dominantes avec la même affinité relative. Classiquement, les Ac sont classés dans des groupes antigéniques définis sur base de tests de compétition. Les Acm capables d'entrer mutuellement en compétition pour la fixation sur l'Ag seront définis comme faisant partie d'un même groupe antigénique. Dans le cas des Acm dirigés contre la chaîne O de *Brucella*, un tel classement est difficile car un Acm "A" peut entrer en compétition avec un Acm "C". Ceci peut s'expliquer par la possibilité d'épitopes chevauchants. Cette notion d'épitopes se chevauchant sera également évoquée pour expliquer les réactions sérologiques faussement positives (RSFP) (Weynants *et al.*, 1996) ; (Bundle *et al.*, 1989) ; (Palmer and Douglas, 1989)

1.4. Brucellose animale et humaine

1.4.1 Brucellose animale

La brucellose est une maladie à répartition mondiale avec des zones de plus grande incidence comme le bassin méditerranéen, le golfe Persique et l'Amérique latine.

La brucellose bovine, causée par *Brucella abortus*, est la plus répandue et engendre des problèmes de reproduction comme l'avortement de la femelle et l'orchite et l'épididymite avec stérilité fréquente chez le mâle. L'avortement est accompagné par l'excrétion de milliards de germes constituant la source majeure de contamination pour les autres animaux.

La brucellose des petits ruminants est principalement due à *B. melitensis* et *B. ovis*. Elle cause une infection chronique chez les béliers et des avortements occasionnels chez la brebis. De nombreuses autres espèces animales domestiques ou sauvages sont sensibles à la brucellose. Ces derniers constituent un réservoir à prendre en considération lors de campagnes d'éradication.

Quelle que soit l'espèce animale infectée, l'infection par *Brucella* est souvent inapparente. La lutte contre la brucellose repose donc sur deux stratégies : la vaccination des jeunes animaux et/ou le dépistage diagnostique des adultes (dépistage et abattage). La prophylaxie médicale a pour objectif de réduire le nombre de foyers. (Garin-Bastuji, 1993) ; (Garin-Bastuji, 1993) ; (Corbel, 1997b)

1.4.2. Brucellose humaine

La transmission à l'homme dépend de nombreuses conditions dont les habitudes alimentaires locales et les conditions d'hygiène. La consommation d'aliments contaminés ou le contact avec des animaux infectés sont les sources majeures d'infection. *B. melitensis* et *B. suis* sont plus virulentes pour l'homme que *B. abortus*. Dans certains pays en voie de développement, on note une forte incidence de la brucellose humaine. Celle-ci a fortement régressé dans les pays industrialisés sauf dans certaines régions du bassin méditerranéen.

Espèce	Biovar(s)	Morphologie des colonies	Hôte(s) naturel(s)	Pathogénicité pour l'homme
<i>B. melitensis</i>	1-3	lisse	chèvre, mouton	grande
<i>B. abortus</i>	1-6,9	lisse	Bovins	moyenne
<i>B. suis</i>	1 et 3	lisse	Porc	grande
	2	lisse	porc	très faible
	4	lisse	renne, caribou	moyenne
	5	lisse	rongeur	grande
<i>B. neotomae</i>	-	lisse	rat du désert	nulle
<i>B. ovis</i>	-	rugueuse	bélier	nulle
<i>B. canis</i>	-	rugueuse	chien	faible

Classification du genre *Brucella*. D'après (Young, 1995; Alton *et al.*, 1988).

La brucellose humaine est une infection systémique dont les symptômes non spécifiques apparaissent deux à trois semaines après infection. La maladie se caractérise par de multiples plaintes d'ordre général et peu de caractères physiques anormaux. Les symptômes peuvent également se localiser dans un seul organe; la maladie est alors dite localisée. La brucellose est asymptomatique dans un cas sur deux. Ces infections asymptomatiques seront mises en évidence par une analyse sérologique.

Le traitement recommandé par l'OMS consiste en une antibiothérapie de longue durée à base de doxycycline et de rifampicine. (Tibor, 1999) ; (Weynants, 1998) ; (Young, 1995)

1.5. Situation sanitaire et dépistage

1.5.1. Situation sanitaire

La situation sanitaire en Belgique et en France a fortement progressé. En Belgique, en 1988, plus de 550 foyers de brucellose ont été recensés (une prévalence de 0,79 %). Depuis, la prévalence (nombre de foyers infectés à un moment donné) a diminué pour atteindre 6 troupeaux positifs à la fin de l'année 1997 (Figure 4). Les mesures de prophylaxie actuelles visent à la protection et à la surveillance des différents troupeaux.

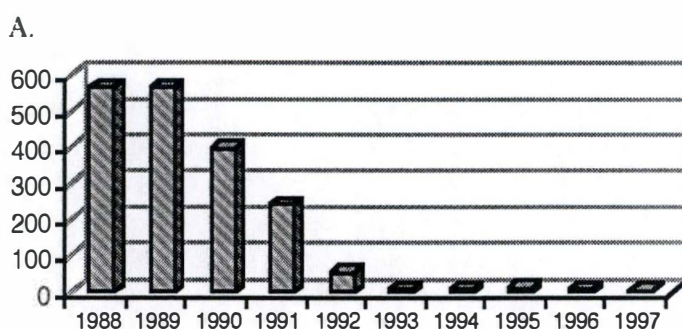


Figure 4. Brucellose bovine en Belgique. Nombre de troupeaux infectés au 31 décembre de chaque année.

Une autre donnée importante est le nombre de nouveaux foyers déclarés au cours d'une année (incidence annuelle). Celle-ci est passée de 15 nouveaux foyers en 1997 à 5 en 1998 (Figure 5).

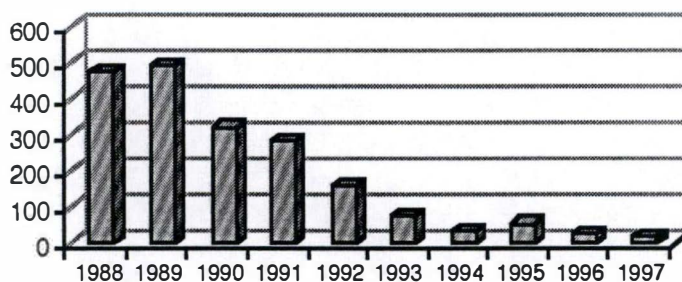


Figure 5. Nombre de nouveaux troupeaux déclarés par an.

Les vaccins utilisés lors des campagnes de vaccination sont des vaccins vivants lisses atténués : B19 et Rev1, utilisés respectivement chez le bovin et les petits ruminants. Notons que ces vaccins sont pathogènes pour l'homme. Leur efficacité n'est pas absolue mais en réduisant le nombre d'avortements induits par *Brucella*, ils diminuent la circulation de l'infection au sein des troupeaux.

Lorsque la prévalence de la maladie est assez basse (moins de 1 %), la stratégie consiste en un dépistage pour identifier les animaux infectés et à leur abattage systématique. Ces campagnes de dépistage ne sont pas sans problème, certains des animaux vaccinés pouvant présenter des tests sérologiques positifs dus à la production d'Ac dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) des souches vaccinales lisses. Ce LPS est également utilisé comme antigène (Ag) dans les tests de dépistage de la maladie. (Weynants, 1998) ; (Garin-Bastuji, 1993) ; (Garin-Bastuji, 1993)

1.5.2. Dépistage

Le diagnostic clinique est difficile à établir dû au manque de symptômes spécifiques à la brucellose et lorsque ceux-ci sont présents (avortements), l'isolement des bêtes présumées saines n'est plus réalisable dû à la présence des germes contenus dans les produits d'avortement qui vont contaminer le reste du cheptel. Il faut rajouter à cela que la brucellose n'est pas la seule maladie responsable de l'avortement chez le bovin. De ce fait, le recours à des tests de laboratoire s'avère indispensable.

Les tests de dépistage sont caractérisés par deux valeurs : la spécificité et la sensibilité.

La spécificité d'un test représente le pourcentage d'animaux sains dont le test est négatif.

La sensibilité d'un test représente le pourcentage d'animaux malades dont le test est positif.

	Animal infecté	Animal indemne	
Test positif	Vrai Positif	Faux Positif	VP+FP
Test négatif	Faux Négatif	Vrai Négatif	FN+VN
	VP+FN	FP+VN	VN+FP+FN+VP

Ce tableau nous indique qu'un test positif ne signifie pas que l'hôte soit nécessairement infecté et qu'un animal présentant un test négatif peut être porteur de germes. Ces valeurs dépendent du test utilisé et de la prévalence de la maladie (lorsque la prévalence de la maladie régresse, le nombre de résultats positifs diminue, mais la proportion de résultats faux positifs augmente). On peut aussi déduire la valeur prédictive d'un test positif (pourcentage d'animaux positifs qui sont réellement malades) qui devient très faible à faible prévalence.

Un test diagnostique direct ou mise en évidence de l'Ag (mise en culture d'échantillons d'animaux pour détecter la présence de la bactérie) doit être réalisé pour confirmer un test sérologique positif. L'isolement et l'identification de *Brucella* suite à une mise en culture, à partir d'annexes fœtales par exemple, est la seule méthode qui permette un diagnostic avec certitude. Mais ce test est très lent et arrive généralement trop tard. (Alton *et al.*, 1988)

Le diagnostic indirect met en évidence la réponse immunitaire induite suite à une infection par *Brucella*. Il existe deux catégories de tests : les tests sérologiques (mise en

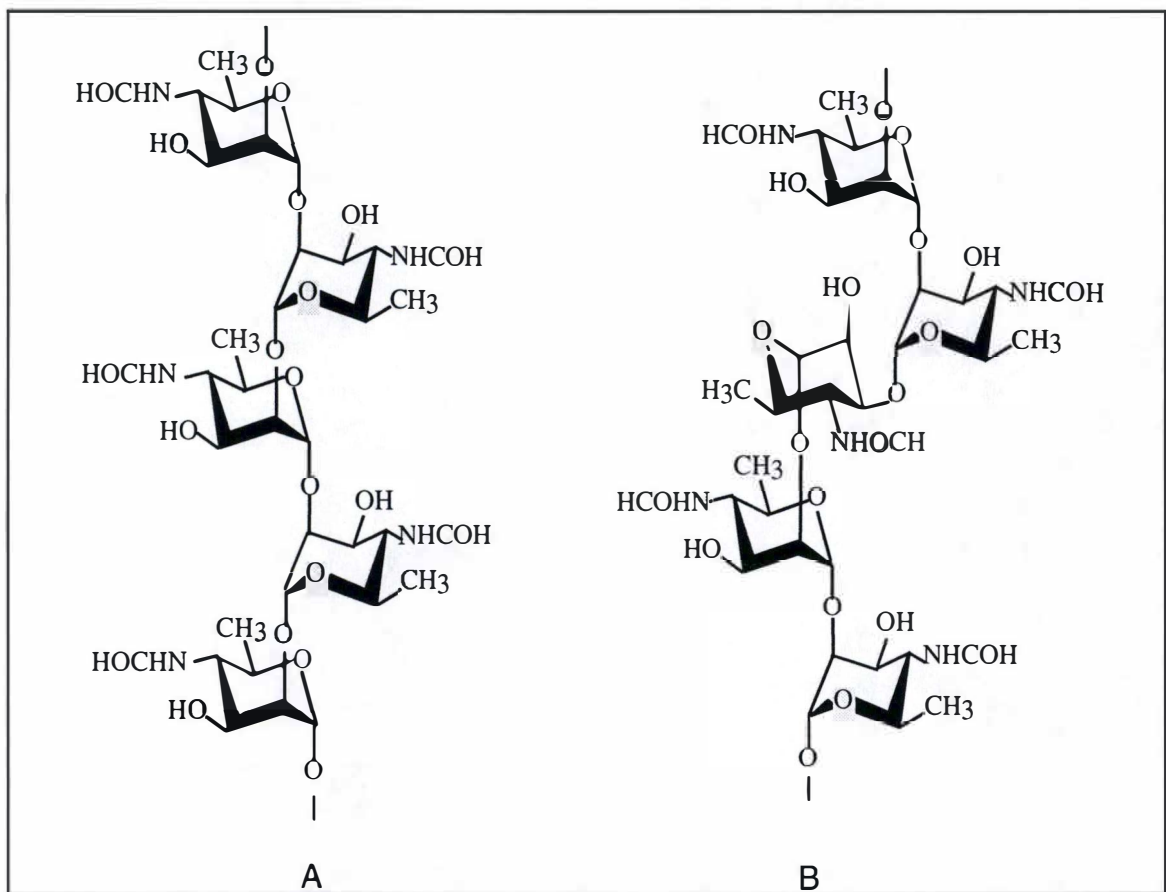


Figure 2 : Structure chimique de fragments de la chaîne O du LPS, sans (A) ou avec (B) une liaison α -1,3. (Bundle *et al.*, 1989).

Introduction

évidence d'Ac dirigés contre le LPS lisse) et les tests intradermiques (mise en évidence d'une hypersensibilité retardée suite à l'injection d'antigène de *Brucella* dans le derme de l'animal à tester).(Godfroid, 1992) ; (Garin-Bastuji, 1993)

Test	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Anticorps détectés			
			IgM	IgA	IgG1	IgG2
Sérum						
SAW	69	75	+	(+)	-	+
SAW-EDTA	60	99,8	+	(+)	-	+
SAW-DTT	60	99,8	-	-	+	+
FB	75	99,9	(+)	-	+	(+)
FC	79	99,9	+	-	+	-
ELISA	92,5	99,2	-	-	+	+
Lait						
RT	60	99,9	+	+	(+)	(+)
ELISA	98,6	99	-	-	+	-

Sensibilité et spécificité des différents tests sérologique de diagnostic de la brucellose bovine. Les abréviations sont décrites dans le paragraphe suivant.

Les tests sérologiques.

Tests classiques, les plus utilisés car les plus simples à réaliser (détection basée sur certaines capacités des Ac anti-brucella à « faire quelque chose ») :

- SAW (Slow Agglutination of Wright) : méthode détectant les IgM et IgG2 sériques par interaction avec une suspension de *B. abortus*. La spécificité de ce test est améliorée par addition d'EDTA (SAW-EDTA) ou de DTT (SAW-DTT).
- RB (Rose Bengale) : ce test est basé sur l'agglutination rapide des IgG bovines par rapport aux IgM. L'antigène consiste en des *Brucella* colorées au Rose Bengale en suspension dans un tampon à pH 3,65.
- FC (Fixation du Complément) : il est basé sur la propriété du complément à se fixer sur les complexes immuns formés d'antigènes bactériens (*B. abortus*) et d'Ac (éventuellement présent dans le sérum à tester). Si le complément ne se fixe pas à son Ac spécifique, il se fixe sur des érythrocytes sensibilisés et provoque leur lyse. Plus la lyse est importante moins il y a d'Ac spécifiques.
- RT (Ring-Test) : ce test permet de détecter la présence d'Ac dirigés contre *Brucella* dans le lait par formation au niveau de la crème d'un anneau colorée de *Brucella* provenant de l'agglutination par des IgA, des IgM et dans une moindre mesure par des IgG spécifiques.

Les tests ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) sont basés sur l'existence d'Ac indépendamment de leur fonctionnalité. Ces tests peuvent varier en fonction de l'antigène utilisé (bactérie entière, lipopolysaccharide lisse, ...) ainsi que du conjugué (immunoglobulines anti-IgG1 ou IgG2 ou IgA bovines couplées à la peroxydase...).

Ces tests présentent une série de défauts : faible sensibilité et/ou spécificité, non automatisable, inutilisable chez les petits ruminants, ou ne permettant pas de discriminer les animaux infectés des animaux vaccinés.

Avant de développer le problème lié au test de dépistage, une description succincte de *Brucella* s'avère nécessaire.

1.6. Réactions sérologiques faussement positives

1.6.1. Les réactions sérologiques croisées

En 1990-1991 un accroissement important du nombre de cheptels dans lesquels les bovins présentaient des résultats sérologiques positifs a été observé, alors qu'aucun signe clinique (avortement) et épidémiologique (pas d'introduction de nouveau cheptel dans la région, zone seine vis-à-vis de *Brucella*, ...) n'était observé et aucun test bactériologique n'était positif. De plus une chute importante de la réponse sérologique avec le temps et une absence de vaccination pouvant engendrer une réaction faussement positive ont amené les inspecteurs vétérinaires à considérer ces réactions sérologiques comme des sérologies atypiques ou encore des réactions sérologiques faussement positives (RSFPs). Ce phénomène s'est non seulement étendu mais intensifié au cours des années. (Figure 6)

1.6.2. Parenté antigénique

Diverses hypothèses ont été émises pour expliquer la présence des RSFPs, dont la possibilité de l'apparition d'une brucellose ayant des caractéristiques pathogéniques et épidémiologiques particulières. Il pourrait, en effet, s'agir d'une contamination du cheptel par *Brucella* infectant la faune sauvage. Une deuxième hypothèse est la possibilité d'une réaction croisée résultant d'infections par d'autres micro-organismes non apparentés à *Brucella* mais exprimant des antigènes (Ag) communs ou proches de ceux de *Brucella*.

En Belgique 50 % des réactions faussement positives sont dus à *Yersinia enterocolitica* O:9. Ces réactions antigéniques croisées sont dues à la similarité plus ou moins grande des chaînes O du LPS. Quatre autres bactéries sont capables d'induire des RSFPs soit de manière expérimentale soit lors des tests de dépistages. Il s'agit de *Vibrio cholerae*, *E. coli* O :157, *Salmonella urbana* et *Pseudomonas maltophilia*.(Corbel, 1997a)

Une des solutions à ce problème réside dans l'élaboration d'un test diagnostique sérologique plus spécifique, évitant les réactions croisées avec d'autres bactéries.

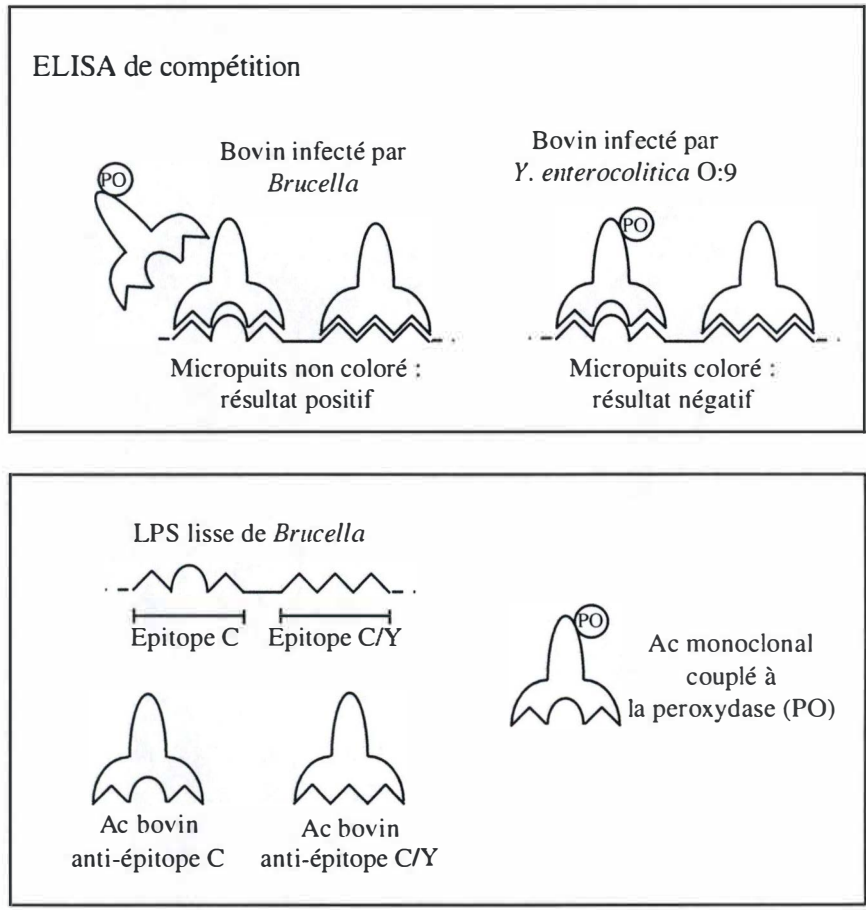


Figure 7 : ELISA de compétition basé sur un anticorps monoclonal spécifique de l'épitope C (Weynants , 1996).

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées :

- utilisation de tests sérologiques utilisant comme Ag les protéines membranaires. Ceux-ci donnent malheureusement une réponse sérologique trop tardive que pour être utilisés dans le cadre du diagnostic de la brucellose;
- des ELISA de compétition sont également mis au point, ils consistent à mettre du sérum de bovin en présence d'un Ac monoclonal marqué et dirigé contre un épitope présent chez toutes les souches lisses de *Brucella* dans des puits occupés par du LPS lisse de *Brucella*. Si l'animal est infecté par *Brucella*, les Ac du sérum de l'animal vont se lier au LPS adsorbé sur les puits et aucun signal n'est perçu au moment de la révélation (signal positif). Si l'animal n'est pas infecté par *Brucella*, aucun Ac ne peut déplacer l'Ac monoclonal de son site spécifique sur le LPS et donc un signal négatif est perçu au moment de la révélation (Figure 7). Malheureusement les tests basés sur ce principe n'éliminent pas, actuellement, les risques de RSFPs. Le LPS de *Yersinia enterocolitica* 0:9 étant très proche du LPS de *Brucella*, un animal infecté par *Yersinia enterocolitica* 0:9 produira des Ac dirigés contre les épitopes présents sur les deux LPS et ceux-ci pourront empêcher la fixation de l'Ac monoclonal. En effet, Il est fort probable que les épitopes reconnus par les Ac anti-LPS de *Y. enterocolitica* O:9 sont partiellement chevauchants de ceux qui sont reconnus par un Ac anti-LPS de *Brucella*.(Figure 8) (Weynants *et al.*, 1996);
- une autre possibilité serait l'isolement et la purification de l'épitope C spécifique du S-LPS de *Brucella*. Actuellement, on ne connaît pas la structure exacte des épitopes du LPS de *Brucella* et l'on ne possède pas les outils qui nous permettraient de couper le sucre à l'endroit voulu ce qui rend le processus d'isolement de l'épitope irréalisable. De plus, la synthèse chimique des structures d'Ag formées d'hydrates de carbone est généralement très compliquée et, dans certains cas, les techniques actuelles ne le permettent pas. La purification du LPS de *Brucella* à partir de gros volume de culture demande quant à elle une infrastructure adaptée et très coûteuse. De plus, il n'y a que la chaîne O qui nous intéresse et plus particulièrement l'épitope recherché;
- une nouvelle approche consiste à la mise en évidence d'une molécule peptidique mimant les épitopes du LPS. Les outils qui seront utilisés pour la recherche de ces peptides sont des Ac monoclonaux anti-LPS de

Brucella. Ils sont dirigés contre les épitopes A, M ou contre l'épitope C, commun au LPS-S des souches A et M de *Brucella*.

L'utilisation de ces mimotopes dans des tests diagnostiques basés sur la détection d'Ac dirigés contre la chaîne O permettrait de résoudre ce problème de réactions croisées. Ils pourraient également être à la base de nouvelles approches vaccinales susceptibles de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés. (Weynants, 1998) ; (Weynants V., 1995)

1.7. Les mimotopes

1.7.1 Mimotope peptidique

Il est possible qu'un Ac dirigé contre un Ag spécifique puisse reconnaître une molécule différente de par sa conformation et ses propriétés de surface. C'est le point de départ du concept des mimotopes. Un mimotope antigénique est donc une molécule pouvant se substituer à l'épitope naturel de l'Ag pour son interaction avec l'Ac. L'utilisation de peptide n'est pas la seule possibilité. En effet, en partant d'Ac purifiés, on pourrait immuniser une souris contre ces Ac et l'on obtiendrait des anti-idiotypes qui, de par leur complémentarité avec le paratope du premier Ac, seraient des mimes de l'épitope. Ceux-ci pourraient servir à une nouvelle immunisation en vue d'obtenir des Ac dirigés contre l'épitope initial.

Même si nous connaissions les structures des deux partenaires de l'interaction (Ac-Ag), il est actuellement impossible de fabriquer un peptide possédant les propriétés et les structures de l'Ag nécessaire à l'interaction. Même si on arrive à établir un modèle in-silico de la structure de l'Ag, les conformations que le peptide pourrait prendre in-vivo sont tellement nombreuses qu'il n'est pas envisageable d'utiliser cette méthode.

Une autre approche serait qu'en partant de l'idée qu'un Ac reconnaît un Ag spécifique (Ag du LPS de *Brucella* par exemple), on pourrait utiliser cet Ac pour sélectionner dans une banque de peptides aléatoires un ou plusieurs peptides. Ces peptides seraient alors des mimes potentiels de l'Ag originel. Ils pourraient alors servir à l'élaboration de tests de dépistages ou à la vaccination.

1.7.2. La synthèse peptidique chimique ou biologique

Il existe plusieurs types de synthèses peptidiques en voici quelques exemples :

- la synthèse chimique :
 - la librairie de peptides sur billes de résine : son avantage est de pouvoir insérer dans ces peptides des acides aminés non naturels. Le problème majeur de cette banque est son épuisement au fur et à mesure que l'on enlève des billes pour le séquençage; (Gordon *et al.*, 1994)
 - la librairie de peptide-ADN sur billes : sur chaque bille se trouve un peptide et un oligonucléotide qui lui est spécifique. Il est ainsi aisé de séquencer l'oligonucléotide de la bille criblée via amplification PCR (chaque nucléotide possédant les mêmes séquences flanquantes en vue du séquençage) (Needels *et al.*, 1993).
- la synthèse biologique : plusieurs approches de présentation de peptides à la surface de microorganismes ou en fusion avec des protéines bactériennes cytoplasmiques ont été développées. Chacune de ces méthodes passe par la fusion des peptides à une protéine (Charbit *et al.*, 1986) ; (Lenstra *et al.*, 1992). Les banques de phages consistent en la présentation par une protéine de surface d'un bactériophage filamenteux, d'un peptide de séquence aléatoire.(Smith, 1985). On peut encore citer les librairies de peptides sur plasmides (Cull *et al.*, 1992) ou sur polysomes (Mattheakis *et al.*, 1994).

Ce sont des méthodes moins coûteuses que les synthèses chimiques ou classiques. De plus les 20 résidus peuvent être exprimés et l'amplification du matériel sélectionné est facile à réaliser. Le plus grand intérêt de cette méthode est l'association génotype/phénotype puisque sont à la fois présents le déterminant antigénique et l'insert d'ADN codant pour celui-ci. Ce qui permet une amplification rapide et à volonté de la séquence, à moindre frais par rapport à la synthèse chimique. Elle permet aussi l'insertion de peptides beaucoup plus longs que par synthèse chimique.

Une restriction à l'utilisation de cette méthode est à apporter : seule des structures synthétisables biologiquement sont représentées dans ce type de banque.

1.7.3. Recherche d'un mimotope à partir de banques peptidiques

1.7.3.1. Présentation de peptides à la surface de phages

1.7.3.1.1. Les phages filamenteux

Il existe trois phages filamenteux caractéristiques d'*Escherichia coli* : M13, f1 et fd qui possèdent tous pour génome un ADN simple brin circulaire homologue à 98 %. L'infection d'*E. coli* par le bactériophage dépend de la présence d'un plasmide conjugatif (F) chez l'hôte. Ces bactériophages apparaissent comme de longues et fines particules (6,5 nm de diamètre et 930 nm de long) à l'intérieur desquelles se trouve leur ADN.

Cinq protéines interviennent dans la structure de la capsid du phage : ce sont les protéines pIII, pVI, pVII, pVIII et pIX. Les deux extrémités du phage sont composées de cinq exemplaires des protéines pVII et pIX d'un côté et pIII et pVI de l'autre. Le cylindre qui constitue le phage est quant à lui constitué de 2700 unités monomériques de la protéine pVIII ; c'est donc la protéine du phage la plus abondante.

La protéine pIII mature est longue de 406 acides aminés. Son domaine N-terminal est responsable de l'attachement du phage au pilus F de la bactérie et donc de la première étape de l'infection. Son domaine C-terminal est responsable de l'ancrage à l'enveloppe. La pVI est plus petite et son extrémité carboxy-terminale est très proche de la surface du phage. Ces deux protéines interagissent avec la pVIII pour former une extrémité de la capsid.

La protéine pVIII mature est longue de 50 acides aminés. Elle possède une structure en hélice α . Sa portion N-terminale est en contact avec la membrane externe et la portion C-terminale, amphipatique, interagit avec l'ADN. Sa portion centrale est hydrophobe.

Les protéines pVII et pIX se retrouvent, en cinq exemplaires chacune, à l'autre extrémité du phage. Leur arrangement dans la capsid et leur interaction avec la pVIII est inconnue. Des études menées sur ces deux protéines semblent indiquer que la pVII serait enfuie dans la membrane et la pIX serait exposée à la surface.

Les protéines pIII et la pVIII capsidiques suite à leur tolérance aux insertions peptidiques et à leur nombre de copies différent, rassemblent toutes les caractéristiques souhaitées d'un système de présentation. (Cesareni *et al.*, 1995)

1.7.3.1.2. Types de présentations

On distingue différents types de présentations de peptides selon la protéine utilisée ou le vecteur d'expression. (Figure 9)

La présentation de type 3 (pour la protéine III) ou 8 (pour la protéine VIII) est réalisée par le clonage d'un fragment d'ADN étranger dans le gène codant pour la protéine sans altérer la phase du cadre de lecture. Les protéines ainsi exprimées sont dites recombinantes. Si la

pVIII est utilisée pour la présentation de peptides de plus de 7 ou 8 acides aminés, des encombrements stériques peuvent apparaître et déstabiliser la capsid. Pour les peptides de plus de 6 a.a. on utilisera la présentation 33, 88, 3+3, 8+8. (Greenwood *et al.*, 1991)

Pour les présentations de types 33 et 88, le phage possède deux copies du gène de la pIII ou de la pVIII. L'une des deux copies est sauvage et l'autre porte l'insert codant un peptide aléatoire. Les deux types de protéines sont exprimées à la surface du phage et l'on peut ainsi éviter les problèmes d'encombrement stérique.

Dans les présentations 3+3 et 8+8, le gène recombinant est porté par un phagemide. Les phagemides sont des plasmides qui possèdent une origine de réplication plasmidique, un marqueur de résistance à un antibiotique ainsi que la région intergénique du phage. Celui-ci ne peut se répliquer que si la cellule est infectée par un phage "helper" qui est un phage dont la réplication de l'ADN est ralentie. Les particules phagiennes ainsi générées contiennent soit le génome du phagemide soit le génome du phage "helper". Les deux portent un mélange de protéines recombinantes et sauvages. Après l'infection par le phagemide et le phage helper les bactéries qui possèdent les phagemides peuvent être sélectionnés via leurs marqueurs de résistance aux antibiotiques.

L'utilisation de la protéine pIII limite le nombre de protéines recombinantes présentées à la surface du phage. Elle n'est que de cinq s'il n'y a que des protéines recombinantes. Si l'on désire présenter un grand nombre de peptides, on préférera la protéine pVIII car celle-ci, présente à 2700 exemplaires, peut présenter autant de peptides que de protéines pVIII à la surface du phage (présentation de type 8). (Smith, 1991) ; (Smith, 1985) ; (Souriau *et al.*, 1998) ; (Felici *et al.*, 1991) ; (Smith and Scott, 1993)

1.7.3.2. Outil de sélection

L'utilisation d'un AcM est certainement l'application la plus fréquente de la sélection de peptides sur phage. La localisation du consensus sélectionné dans la séquence du peptide reconnu par l'AcM, permet l'identification de l'épitope du peptide reconnu par l'anticorps.

Si l'épitope originel est peptidique et continu, le peptide sélectionné aura une séquence identique ou fort proche de la séquence de cet épitope, ce peptide possédant pour l'AcM une affinité variables par rapport à l'épitope originel. Il est également possible que les peptides sélectionnés ne partagent aucune similarité de séquence avec l'épitope originel. Si ceux-ci sont capables d'entrer en compétition avec l'épitope originel pour l'Ac, pour la liaison au paratope, ils seront appelés mimotopes.

Si l'épitope originel est peptidique et discontinu, tous les peptides sélectionnés par l'Ac seront des mimotopes puisqu'ils miment un épitope composé de résidus éloignés dans la séquence.

Les peptides mimant des structures non-peptidiques sont tous des mimotopes.

1.7.4. Intérêt de la sélection de mimotopes du LPS de *Brucella*

Comme nous l'avons expliqué ci-dessus, les tests diagnostiques sérologiques de la brucellose sont perturbés par l'existence de RSFP provoquées notamment par *Yersinia enterocolitica* O:9 possédant un LPS de structure très proche de celui de *Brucella*. De plus, des vaccins mis au point à partir de souches de *Brucella* atténuées, induisent la production d'Ac principalement dirigés contre le LPS. Dès lors, au cours des tests de dépistage, il devient impossible de discriminer un animal vacciné d'un animal infecté. Ces souches vaccinales restent par ailleurs pathogènes pour l'homme.

La sélection de mimotopes permettrait le développement de tests de diagnostiques et de vaccins qui ne présentent plus ces problèmes. L'utilisation de mimotopes spécifiques du LPS de *Brucella* dans des tests diagnostiques permettrait d'éviter les risques de RSFPs (Figure 10) ; un vaccin basé sur un peptide sélectionné avec un Acm différent du peptide utilisé pour les tests de dépistages permettrait d'éviter les problèmes liés au dépistage d'animaux vaccinés. Les deux peptides (celui servant à la vaccination et celui servant au test de dépistage) ayant des épitopes différents, lors de tests de dépistages, les Ac produits par la vaccination ne reconnaîtront pas le peptide utilisé pour le test de dépistage. Et enfin l'élaboration d'un vaccin ne présentant plus de risque pour l'homme et les animaux vaccinés.

L'idée de mimer un épitope saccharidique par un mimotope a déjà été exploitée avec succès. Nous pouvons citer par exemple l'obtention de peptides mimants des motifs sucrés à la surface de cellules tumorales (Kieber-Emmons, 1998), ou encore l'obtention de peptides mimant le polysaccharide de *Cryptococcus neoformans* (Valadon *et al.*, 1998)

Cependant, après immunisation via le peptide mimotope, il faut non seulement obtenir une réponse immunitaire contre le peptide, mais il faut aussi qu'elle soit dirigée contre l'épitope originel. Dans le cas d'Ag osidiques, il est actuellement assez rare d'obtenir une réponse immunitaire contre l'épitope obtenu à l'aide de peptides mimotopes. Jusqu'à présent aucun peptide n'est arrivé à donner une réponse protectrice dans le cas de *Brucella*.

Une recherche effectuée au sein du laboratoire de Microbiologie et Immunologie des Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix à l'aide de deux Acm dirigés contre des épitopes distincts du LPS de *Brucella*, Ac nommés A15-6B3 et B66-2C8, a permis d'isoler une série de peptides provenant de banques peptidiques différentes. Ces peptides ont été ensuite utilisés dans des ELISA directs et ELISA de compétition afin de tester leur affinité vis-à-vis d'Ac dirigés contre le LPS de *Brucella*. De là, 12 peptides ont été sélectionnés afin d'immuniser 14 lots de souris : 12 lots avec un peptide chacun et 2 lots avec un mix des peptides sélectionnés. Les premières immunisations effectuées sur des souris ont montré une immunisation vis-à-vis du peptide mais une faible réaction immunogénique contre le LPS. Une explication au manque d'immunogénicité est que le peptide peut prendre de nombreuses conformations dont quelques-une (ou peut-être une) seulement seraient capable de générer une réponse immunitaire contre le LPS (De Bolle *et al.* 1999).

Introduction

Une amélioration pourrait être apporté par l'obtention de banque de seconde génération construite à partir des consensus de peptides déjà obtenus mais avec une contrainte plus importante au niveau de leur structure. Cette étude est en cours au laboratoire.

Une autre approche de celle des peptides consiste en l'utilisation d'Ac dirigé contre la structure de laquelle on veut être protégé.

On peut citer en exemple l'obtention d'une séquence peptidique mimant le polysaccharide capsulaire majeur C (MCP) de *Neisseria* et induisant une réponse humorale avec production d'Ac contre le MCP en modèle murin par l'équipe de Westerink. Leur stratégie est basée sur l'utilisation d'un Ac anti-idiotype pour l'obtention d'une réponse protectrice contre la bactérie. L'idée est qu'en injectant à un animal un Ac dirigé contre un épitope particulier, la réponse immunitaire qui suivrait produirait des Ac (anti-idiotype) dont le paratope mimerait l'image interne du premier Ac. Ce qui correspondrait à l'épitope originel.

Ils ont ainsi développé un Ac monoclonal anti-idiotype, 6F9, contenant dans son site de liaison, une structure mimant le polysaccharide capsulaire majeur des méningocoques groupe C. Des études antérieures avaient suggéré que seulement une petite partie de l'Ac représentait le site immunogénique. La séquence de ce site, constitué de 13 a.a., a été synthétisé. L'immunisation de souris avec le peptide a déclenché une réponse immunitaire anti-MCP. Ces souris immunisées avec le complexe étaient de plus protégées contre une infection avec une dose léthal du méningocoque groupe c (Westerink *et al.*, 1995).

1.8. Objectif du mémoire.

La sélection de peptides mimotopes passe par de nombreuses étapes :

- panning des banques de peptides à l'aide d'un Acm;
- criblage des peptides sélectionné par le panning;
- séquençage des colonies positives lors du criblage et analyse des séquences :
 - fréquences des acides aminés dans les différentes séquences obtenues;
 - établissement de séquences consensus potentielles entre les différents peptides;
- test des peptides en ELISA indirect et de compétition afin de sélectionner les meilleurs mimotopes.

Les deux premières étapes ont déjà été effectuées au laboratoire à l'aide de l'Ac monoclonal 12B12. Cet Ac est d'isotype IgG3, il est dirigé contre l'épitope C du LPS de *Brucella* mais avec une affinité plus importante pour les souches M que pour les souches A. Il n'a aucune affinité vis-à-vis du LPS de *Yersinia enterocolitica*.(Cloeckart *et al.*, 1993)

Mon travail a consisté tout d'abord en un nouveau criblage des clones sélectionnés lors du panning afin de m'assurer que les colonies sélectionnées lors du criblage des éluats de panning du 2^{ème} et 3^{ème} cycles sont bien des peptides reconnus par l'Ac utilisé.

Les peptides sélectionnés lors du criblage seront séquencés et les séquences obtenues seront analysées pour déterminer la fréquence en a.a.. A partir de là, on tentera d'établir une séquence consensus pour l'ensemble de nos peptides.

La dernière étape sera de tester les peptides possédants des séquences différentes en ELISA indirect pour sélectionner les peptides ayant la meilleure affinité vis-à-vis de notre Ac. Ensuite, les peptides sélectionnés seront testés en ELISA de compétition pour obtenir le meilleur mimotope de l'épitope de notre Ac.

2. Résultats et discussion

2.1 Criblage des colonies par immuno-empreinte

Les éluats de phages obtenus (mix des deux banques C9aaC et 9aa) suite au 2^{ème} et 3^{ème} cycles de pannings réalisés préalablement au laboratoire à l'aide de l'Ac 12B12 ont servi à l'infection de bactéries (*E. coli* souche TG1). Les bactéries infectées ont été étalées sur du milieu LB-Agar contenant de l'ampicilline (le phagemide possédant le gène de résistance à l'ampicilline (bla)) et criblées par immuno-empreinte sur colonies à l'aide de l'Ac 12B12. Au total 60 colonies ont été détectées lors de l'immuno-empreinte réalisée après le panning. Chaque colonie positive en immuno-empreinte a été striée sur boîte LB-Agar Amp. De chacune de ces boîtes, trois colonies ont été repiquées sur du milieu LB-Agar Amp (pour chaque clones, 3 colonies sont repiquées, cela donne pour le clone 1 : 1a, 1b, 1c).

L'ensemble des colonies repiquées a été répartis sur boîte de Petri comme représenté a la figure 1.

Le travail réalisé au cours de ce mémoire a consisté en un nouveau criblage des 60 clones repiqués en triplicat, afin de s'assurer que les colonies isolées au premier criblage étaient bien des colonies positives. Il faut savoir que la densité en colonies étalées sur milieu solide à partir des bactéries infectées par l'éluat, ne permettait pas l'identification certaine des colonies positives à partir des tâches positives sur la membrane.

L'immuno-empreinte sur colonie est peu sensible sur les colonies repiquées. Parfois 0 ou 1 colonie provenant d'un triplicat d'un même clone étaient positives et celles qui étaient positives avait souvent un signal très faible. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Nombre de colonies considérées positive pour les 60 clones			
0 colonie positive	1 colonie positive	2 colonies positives	3 colonies positives
1-3-6-8-9-10-11-12-17-19-20- 25-31-32-34-35-36-37-38-43- 45-46-47-48-52-53-54-55-59-60	2-4-18-26-28-30-33-40- 42-44-49-50-51-56	5-7-13-14-15-23-27-29- 39-57-58	16-21-22-24-41

Ce manque de sensibilité nous laisse penser que des colonies considérées négatives sur le triplicat contenaient peut-être des phages porteur d'un peptide potentiellement reconnu. Après notre criblage, nous avons donc décidé de garder pour la suite la colonie (b) de chaque triplicat négatif et chaque colonie positive dans les triplicats.

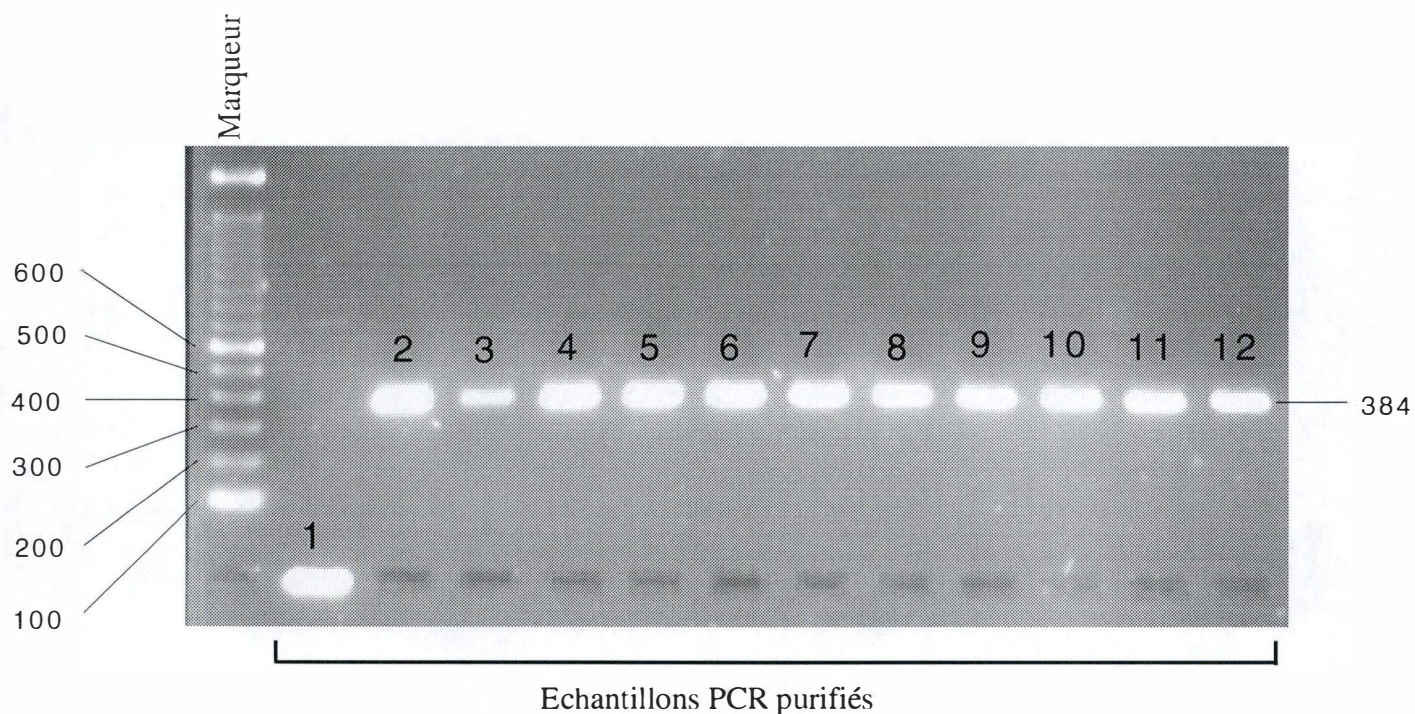


Figure 3 : Exemple d'électrophorèse en gel d'agarose (1,5%) des fragments PCR purifiés. Une bande a 384 pb est observée pour les échantillons 2-12. Elle correspond à la taille de l'insert codant pour le peptide (27pb) plus les fragments de génome phagien le bordant (354pb). La bande dans le premier puit correspond aux primers utilisé dans la PCR sans template (contrôle négatif de PCR). La marqueur utilisé est le "100pb DNA Ladder Plus" (MBI Fermentas).

Résultats et discussion

Cinquante et une colonies positives ont été sélectionnées par le criblage en immuno-empainte sur colonies et trente colonies négatives ont été conservées. Chaque colonie considérée positive d'un triplicat a été conservée.

Clones sélectionnés.

Boîte 1		Boîte 2		Boîte 3		Boîte 4	
Positive	Négative	Positive	Négative	Positive	Négative	Positive	Négative
2b	1b	18c	17b	33c	34b	49b	52b
4c	3b	21a, b, c	19b	39b, c	35b	50b	53b
5a, b	6b	22a, b, c	20b	40a	36b	51c	54b
7a, b	8b	23b, c	25b	41a, b, c	37b	56c	55b
13a, c	9b	24a, b, c	31b	42b	38b	57b, c	59b
14a, b	10b	26c	32b	44c	43b	58b, c	60b
15a, c	11b	27b, c			45b		
16a, b, c	12b	28b			46b		
		29a, c			47b		
		30b			48b		

Nombre = clone

Lettre = colonie

2.2. PCR et séquençage des clones sélectionnés

La partie de l'ADN codant pour le peptide des 81 candidats a été amplifiée par PCR en vue d'un séquençage. Cette amplification PCR a été réalisée à l'aide des amorces "Feli amont" et "Feli aval" s'hybridant de part et d'autre de la séquence codant pour le peptide. (figure 2)

Les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose afin de vérifier que la taille de l'amplicon correspondait bien à la taille attendue suite à cette PCR sur 1 clone d'une des deux banques utilisées. La taille attendue est de 375 pb pour les peptides de la banque 9aa et de 384pb pour la banque C9aaC (figure 3).

Le séquençage est réalisé sur les produits PCR purifiés. La séquence en acides aminés sera déduite de la séquence nucléotidique de l'ADN codant pour ce peptide.

2.2.1. Séquence obtenue

Sur les 81 clones sélectionnés et isolés, on a obtenu 21 séquences différentes dont 12 provenant de la banque 9aa et 9 de la banque C9aaC. Il est intéressant de noter que certains clones ont la même séquence. Remarquons aussi que 6 séquences différentes (sur les 21) ont été retrouvées aussi bien chez des clones détectés positifs que chez des clones détectés négatifs en immuno-empainte sur colonie. Ceci montre bien le manque de sensibilité de

Résultats et discussion

l'immuno-empreinte sur colonie repiquée. Neuf séquences différentes se retrouvent uniquement chez les clones classés comme négatifs dans l'expérience d'immuno-empreinte.

Pour cinq clones, nous n'avons pas obtenu de séquence claire.

Séquences obtenues sur					
<i>Colonies positives</i>		<i>Colonies négatives</i>		<i>Colonies positives et négatives</i>	
	<i>Occurrence</i>		<i>Occurrence</i>		<i>Occurrence</i>
DSFGNLMPP	3	DRTGNYHRS	1	DQFGN LGVV	19
NWFGNQETT	1	DPATGNLTR	1	DKFGN LARW	3
CWSASGNLGPC	2	CSYTPEGNLAC	1	DRFGNYRTQ	18
SEFGDLRGT	2	CYALTGNLEPC	2	DSYGNLRGG	10
CFSNRGDLQRC	1	SNFGDYKP	1	NYFGNFQLT	5
CKWTRLGQHIC	1	TYYG DYVRT	1	CqTPSGVLVPC	2
		CWTHLGDYLP	1		
		CqNYHG NLLPC	1		
		CqTPHGLLILC	1		

Tableau des différentes séquences obtenues suivant la réponse des colonies en immuno-empreinte.

2.3. Analyse des séquences obtenues

L'analyse des séquences devra tenir compte du type de banque utilisée pour la sélection. Ces banques sont construites à partir d'oligonucléotides de séquences dégénérées insérés en fusion avec le gène encodant la pVIII dans un vecteur phagemidique. Ces séquences dégénérées sont réalisées de manière à encoder une grande diversité de peptides. Les banques utilisées sont de type NNN ou N représente un mélange équimolaire des 4 nucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP).

Deux banques ont été utilisées :

- **une banque 9aa** constituée d'une séquence aléatoire de 9 a.a. dont les huit premiers proviennent d'un codon de type NNN et le dernier d'un codon de type NNG ;
- **une banque C9aaC** constituée d'une séquence de 9 a.a. aléatoires flanquée de part et d'autre d'un résidu cystéine (CXXXXXXXXXC). Ici, tous les codons sont de type NNN.

Résidu	9aa	C9aaC	Moyenne	Code 1 lettre
Ala	0,0643	0,0645	0,0644	A
Arg	0,1000	0,0968	0,0986	R
Asn	0,0286	0,0322	0,0302	N
Asp	0,0286	0,0322	0,0302	D
Cys	0,0286	0,0322	0,0302	C
Gln	0,0571	0,0484	0,0534	Q
Glu	0,0357	0,0323	0,0342	E
Gly	0,0643	0,0645	0,0644	G
His	0,0286	0,0323	0,0302	H
Ile	0,0429	0,0484	0,0452	I
Leu	0,1000	0,0968	0,0986	L
Lys	0,0357	0,0323	0,0342	K
Met	0,0214	0,0161	0,0192	M
Phe	0,0286	0,0323	0,0302	F
Pro	0,0643	0,0645	0,0644	P
Ser	0,0929	0,0968	0,0945	S
Thr	0,0643	0,0645	0,0644	T
Trp	0,0214	0,0161	0,0192	W
Tyr	0,0286	0,0323	0,0302	Y
Val	0,0643	0,0645	0,0644	V

Tableau des fréquences attendue de chaque résidu dans chacune des banques.

Tableau 1 : Colonnes 2 et 3, fréquences attendues de chaque a.a. dans les deux banques.
 Colonne 4, Moyennes pondérées des fréquences attendues en a.a. pour les deux banques (12 de 9aa et 9 de C9aaC).

2.3.1 Analyse des fréquences relatives des acides aminés de peptides sélectionnés

2.3.1.1. Fréquences attendues en acide aminé

Il est possible de calculer la fréquence attendue de chaque acide aminé dans un peptide de séquence aléatoire de longueur fixe. Par exemple dans la banque C9aaC (9 codons NNN), la fréquence attendue de l'alanine à une des 9 positions aléatoires est de 4/64, quatre étant le nombre de codons possibles pour l'alanine et 64 le nombre de codon du code génétique.

Une correction doit être apportée du fait de la présence possible de codons stop dans la séquence. Un des codon stop (Ambre) est remplacé par une glutamine dans la souche servant d'hôte pour le phage (*E. coli*, souche sup E); Dans le cas d'un phage possédant 1 codon Ocre ou Opale, la protéine pVIII recombinante n'est pas produite et donc un tel phage ne possède pas de peptides en surface. La fréquence attendue de l'alanine à une position est donc de 4/62. Pour un peptide d'une longueur de 9 a.a., la fréquence attendue de l'alanine à n'importe quelle position est de $(4/62)*9$.

Dans le cas de la banque de 9aa ($\{NNN\}_8.NNG$), la fréquence attendue d'une alanine dans un peptide sera pour chacune des 8 premières positions de $(4/62)$ et de $1/16$ pour la position finale (codon possible NNG). La fréquence attendue pour l'alanine à n'importe quelle position dans la banque 9aa sera donc $(4/62)*8+(1/16)=0,0643$.

Étant donné que les peptides obtenus sont originaires des deux banques, la fréquence attendue pour 1 acide aminé dans l'ensemble des peptides est égale à la moyenne des fréquences attendues pour l'apparition d'un acide aminé dans les deux types de banques pondérées par le nombre de peptides issus de chaque banque (Tableau 1 fréquence a.a.).

Sur cette base il est possible de comparer ces données à celles obtenues pour les peptides sélectionnés.

2.3.2.2. Analyse des séquences

Les caractéristiques les plus intéressantes sont (Figure 4) :

- l'acide aminé le plus sur-représenté est l'asparagine qui est un a.a. hydrophile. Par contre, la glutamine possédant le même groupement de chaîne latérale mais avec chaîne latérale plus longue est sous-représentée ;
- l'aspartate est sur-représenté tandis que le glutamate est sous représenté. La longueur de la chaîne latérale pourrait jouer un rôle dans cette différence de représentation ;
- la glycine qui est le plus petit des acides aminés est sur-représenté;

- la tyrosine et la phénylalanine, deux a.a. aromatiques, sont sur-représentés. Le tryptophane est sous-représenté alors que très souvent on le retrouve sur-représenté lors de la sélection par d'autres Ac et particulièrement par des Ac dirigés contre des structures saccharidiques ;
- les trois a.a. basiques (lysine, arginine, histidine) sont sous-représentés ;
- la cystéine et la méthionine, les deux acides aminés contenant un atome de soufre sont sous-représentés (aucun peptide ne possède une cystéine en dehors des cystéines fixes dans la banque C9aaC). Il est décrit dans la littérature qu'un nombre impair de cystéines apparaît rarement dans un peptide. Ceci semble dû à une limitation biologique liée à l'expression de tels peptides .

Au vu de cette analyse, les a.a. chargés positivement semblent être défavorables à une liaison à l'Ac.

Dans la littérature, il est observé que des peptides contenant une proportion élevée de résidus aromatiques sont régulièrement sélectionnés lors de panning avec des Ac comme liguant et particulièrement avec certains Ac dirigés contre des saccharides. (Phalipon *et al*, 1997). Cette observation est souvent mise en relation avec la présence de résidus aromatiques dans le parotope des Ac. En effet, les interactions entre résidus aromatiques sont énergétiquement favorables et les peptides porteurs de tels résidus pourraient être favorisés lors de la sélection par des Ac.

Une analyse des séquences consensus devrait permettre de connaître les rôles joués par les motifs conservés dans l'interaction Ac-peptide.

Alors que la fréquence de certains a.a. peut nous renseigner sur le type d'acides aminés impliqués dans l'interaction Ac-peptide, la comparaison des séquences permettra la mise en évidence de motifs de séquences potentiellement "optimal" pour la liaison Ac-peptide.

2.3.2. Recherche des séquences consensus

Le tableau 2 rend compte de l'ensemble des séquences obtenues. La comparaison des séquences permet la mise en évidence de différents motifs conservés. Les motifs mis en évidence sont de différentes longueurs. Plus la longueur considérée est grande, plus le nombre de peptides partageant le motif est petit. A partir de la séquence GN une série de séquences peuvent être établies avec des fréquences d'apparition qui diminuent suivant la longueur de la séquence. On peut remarquer par exemple la présence à 13 reprises du consensus GN et seulement à 3 reprises du consensus FGNL. Dans ce paragraphe, nous allons faire une description de quelques séquences consensus.

On remarque la présence d'une glycine en 4^{ème} position dans 11 peptides sur les 12 venant de la banque 9 a.a. et en 5^{ème} (7 fois) ou 6^{ème} (2 fois) position pour la banque C9C.

La séquence consensus GN apparaît 13 fois dont 8 fois à une position fixe (ces 8 positions fixes venant de la banque 9 a.a.).

Les séquences FG et FGN apparaissent respectivement 8 et 6 fois sur l'ensemble des deux banques 9aa et C9aaC.

Afin de donner une valeur que l'on peut définir comme la "valeur statistique" à la mise en évidence d'un consensus nous avons calculé les probabilités conditionnelles d'obtenir un motif consensus. En effet, si un motif est partagé par exemple par 3 des 21 séquences, la valeur statistique de ce motif correspond à la possibilité de l'obtenir par hasard au total 3 fois si elle apparaît au moins une fois. Cette probabilité conditionnelle correspond à la probabilité d'obtenir ce motif consensus 3 fois sur 21 peptides divisée par la probabilité de l'obtenir 1 fois sur 21 peptides. Pour calculer cette probabilité, nous avons tout d'abord calculé :

- la probabilité (P) d'obtenir le consensus dans un peptide.
Si le consensus est retrouvé à plusieurs positions dans différents peptides, il faudra alors multiplier cette probabilité par le nombre de positions possibles que peut prendre le consensus (par exemple pour le consensus GN, il peut prendre 8 positions différentes pour notre peptide de 9 a.a.). Dans le tableau 3, différents consensus possibles et leur probabilité d'apparition au hasard selon qu'il ait une position fixe ou non sont décrits. Dans le cas d'un consensus en position fixe, la probabilité d'apparition de ce consensus est égal au produit des probabilités d'apparition de chaque résidu du consensus à une position fixe (c'est-à-dire sa fréquence attendue – cfr 2.3.1.1) (ex. : $GNL = G \times N \times L$). Dans le cas d'un consensus en position non fixe, la probabilité d'apparition est multiplié par le nombre de positions possibles du consensus dans le peptide (Ex. : $GNL = (G \times N \times L) \times 7$, 7 étant le nombre de positions que peut prendre GNL dans un peptide de 9 acides aminés). Cette dernière probabilité sera toujours plus grande car on augmente ses chances d'apparition en augmentant le nombre de positions ou l'on peut la retrouver;
- la probabilité (P1) d'avoir une fois par hasard le consensus au cours de n tirages (n représentant le nombre de peptides différents obtenus). Cette probabilité présente une distribution binomiale, elle se calcule à l'aide de la formule suivante : $p(x) = C \pi (1-\pi)$. Dans P1 le nombre de succès est égale à un donc $x=1$;
- la probabilité (Px) d'obtenir le même consensus x fois au cours de n tirages (X désignant le nombre de fois que le consensus est obtenu sur l'ensemble des peptides. Cette probabilité présente une distribution binomiale, elle se calcule à l'aide de la formule suivante : $p(x) = C \pi (1-\pi)$. x est le nombre de fois que le peptide est obtenu dans l'ensemble de nos séquences.

De là, la probabilité d'obtenir la séquence x fois si on l'a déjà obtenue une fois pourra être calculé ($Px/P1$). Plus cette dernière probabilité est faible, plus la chance que l'obtention de ce motif consensus soit due au hasard est faible. Si $Px/P1$ est faible, cela signifie que ce motif n'est pas dû au hasard mais qu'il résulte de la sélection par l'Ac et donc que ce motif est important pour l'interaction peptide-Ac. On peut faire un seuil arbitraire à 10^{-3} , ce qui correspond à un seuil statistique de α de 0,001.

Résultats et discussion

Le tableau 3 nous permet de constater la faible probabilité d'apparition au hasard de certaine séquence consensus comme GN qui est de 1.10^{-15} à $2,3.10^{-18}$ selon que l'on considère le motif à la position 4-5 (fixe) ou n'importe où dans le peptide (non-fixe). On peut en conclure que le fait de retrouver ce consensus résulte effectivement de la sélectivité effective par l'Ac 12B12.

La probabilité conditionnelle la plus faible (et donc la "valeur statistique" la meilleure) est celle des consensus DxxGN et FGN qui sont retrouvés 6 fois en position fixe pour une probabilité conditionnelle d'apparition au hasard de $1,77.10^{-18}$. Un autre consensus est FGN dont la probabilité d'apparition au hasard à 6 reprises est de $1,77.10^{-18}$.

Le consensus continu le plus long est FGNL, dont la probabilité d'apparition au hasard est de $2,1.10^{-9}$.

On peut imaginer le consensus "idéal" sur base de la mise en évidence des motifs dont l'apparition serait hautement improbable, on obtient la séquence suivante.

D _{6x}	P _{3x}	F _{8x}	G _{21x}	N _{13x}	L _{12x}	R _{3x}	P _{7x}
T _{6x}	Y _{3x}			D _{5x}	Y _{5x}		R _{5x}
S _{4x}							G _{3x}

Ce consensus reprend les a.a. apparu au moins 3 fois à la même position par rapport à la glycine centrale.

La présence d'une glycine en position centrale donne une grande flexibilité au peptide. On peut imaginer que le peptide soit "coudé" dans une conformation que seule la glycine peut apporter.

On peut émettre l'hypothèse que le consensus GNL joue un rôle important dans l'interaction Ac-peptide et que celle-ci peut être favorisée par la présence des résidus F et L dans cet arrangement FGNL.

On peut aussi remarquer en position 5 du consensus un N ou un D qui pourrait indiquer une importance de la taille du résidu et pas seulement de la présence d'une chaîne latérale dont l'extrémité est hydrophile, comme le suggère l'absence de E et Q à cette position deux a.a. très proche de N et D mais de longueur de chaîne latérale plus importante.

Il est à signaler que 3 sur 4 a.a. du motif FGNL sont hydrophobes. Ce qui pourrait suggérer une importance des interactions hydrophobes pour les peptides présentant ce consensus.

En ce qui concerne la banque C9aaC, on peut remarquer la présence d'une proline en dernière position à 5 reprises dans la banque C9aaC et à 2 reprises dans la banque 9aa. Elle pourrait conférer au peptide une conformation particulière pour sa reconnaissance avec l'Ac.

2.4. Production des phages pour les tests fonctionnels en ELISA

Parmi tous les clones séquencés, un seul clone par séquence différente obtenue va être produit pour les tests en ELISA selon le protocole décrit au §4.4.1 de Matériel et méthodes.

Les 21 clones sélectionnés sont :

2b	DQFGNLGVV	34b	CqTPHGLLILCG
3b	DSYGNLRGG	35b	CqTPSGVLVPCG
5a	DKFGNLRW	36b	CYALTGNLEPCG
7a	DRFGNYRTQ	38b	DRTGNYHRS
7b	CWSASGNLGPCC	42b	CKWTRLGQHICG
13a	NYFGNFQLT	44c	CFSNRGDLQRC
24a	DSFGNLMPP	46b	CqNYHGNNLLPCG
24b	SEFGDLRGT	49b	NWFGNQETT
31b	DPATGNLTR	54b	SNFGDYKP
32b	CSYTPEGNLACG	55b	CWTHLGDYLPCC
33c	TYYG DYVRT		

Les ELISA seront effectués avec la même quantité de phages pour chaque séquence afin de pouvoir comparer les affinités des différents peptides avec les Acm anti-LPS. Il est important de noter que le nombre de peptides en surface de phages est inconnu. On peut estimer à plus ou moins 10% la proportion de pVIII recombinantes, cependant cette proportion peut varier d'un phage à un autre et pour un phage particulier, cela varie de culture à culture. Les résultats que nous obtiendrons seront plus un ordre de grandeur de reconnaissance qu'une véritable mesure d'affinité.

Après production des phages (le volume de la culture bactérienne de départ est de 50 ml et les particules phagiennes récupérées du surnageant sont concentrées dans un volume final de 200µl), la concentration en particules phagiennes des 21 échantillons est déterminée par dosage au spectrophotomètre. Pour chaque préparation, l'absorbance à 269 nm et 320 nm est mesurée. (Les calculs sont décrits au §4.4.2 de Matériel et méthodes)

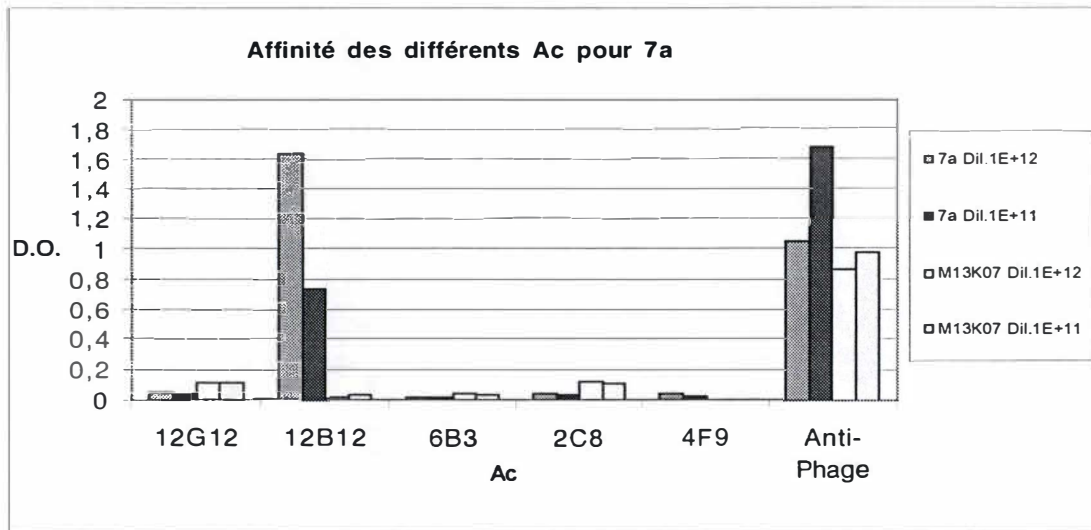
2.5. Test ELISA indirect

Dans un premier temps, un test ELISA indirect permettra d'avoir une estimation quantitative du degré de reconnaissance des peptides sélectionnés par l'Acm 12B12.

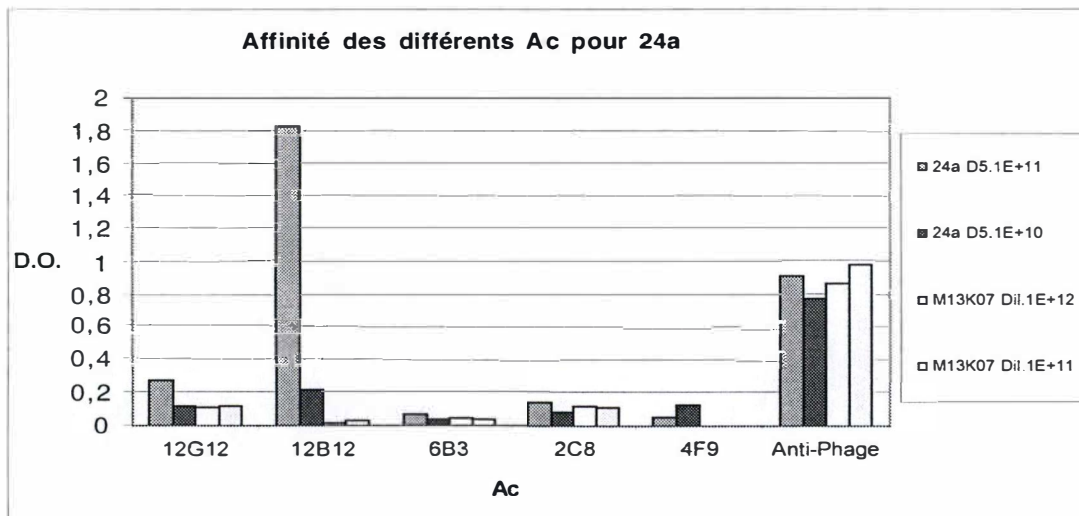
Conjointement, les peptides seront testés avec 4 autres Acm :

- 12G12 dirigé contre un épitope C du LPS de *Brucella* ;
- 4F9 dirigé contre un épitope C/Y du LPS de *Brucella* ;
- 6B3 dirigé contre un épitope M du LPS de *Brucella* ;

A.



B.



C.

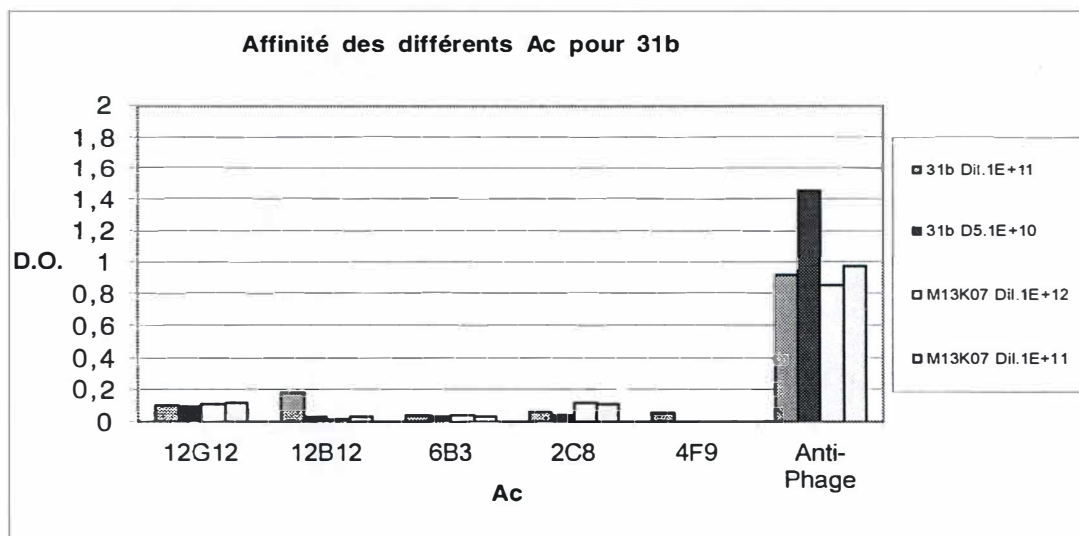


Figure 5 : Le graphe A représente un peptide ayant une grande affinité avec 12B12.
 Le graphe B représente un peptide ayant une affinité pour 12B12 et 12G12.
 Le graphe C représente un peptide ayant une faible affinité pour 12B12.

- 2C8 dirigé contre un épitope A du LPS de *Brucella*.

Ceci nous permettra de tester la spécificité du peptide pour notre Ac. L'idée de ce test est la mise en évidence d'une affinité partagée de deux Acm pour un même peptide. Un peptide reconnu par les deux Acm dirigés contre le même épitope (C) sur la chaîne O du LPS de *Brucella* (12B12 et 12G12) serait un meilleur mime osidique et potentiellement un meilleur immunogène.

Un Ac anti-phage sera aussi utilisé pour contrôler que la quantité des différents phages coaté au fond des puits de nos plaques ELISA est bien équivalente.

Le contrôle positif sera effectué avec du LPS Rev1 et W99 (M et A-dominant respectivement) et un phage ne portant pas de peptide (phage M13K07) servira de contrôle négatif.

Les phages sont coatés à 2 concentrations : 10^{12} et 10^{11} phages/ml.

La figure 5 reprend les résultats obtenus pour 3 clones testés. Ces résultats représentent les trois types d'interactions obtenus lors du test ELISA indirect. La suite des résultats est présentée en annexe 1 à la page 50. Le tableau ci-dessous représente les réponses obtenues selon le peptide.

Affinité pour 12B12.	Affinité pour 12B12 et/ou un autre Ac.	Affinité faible pour 12B12.
3b-5a-7a-7b-13a-32b-33c-	24a-24b-34b-35b-36b-38b-42b-44c-46b-49b-54b	2b-31b-55b

La figure 6 représente l'affinité apparente des différents peptides présentés à la surface de phage selon les séquences des peptides.

Il n'est pas possible de corréliser les résultats obtenus avec la séquence consensus "idéale" établie précédemment. Si l'on reprend par exemple le motif DxFGNL, 2 peptides sur les 3 possédant ce motif ont une bonne affinité apparente vis-à-vis de l'Ac 12B12 (peptide 5a et 24a), le troisième (peptide 2b) ayant une affinité bien moindre. De même, des peptides similaires comme 35b (CqTPSGVLVPC) et 46b (CqNYHGNNLLPC) montrent des affinités apparentes très différentes pour l'Ac 12B12 (une plus forte affinité pour 46b et une plus faible affinité pour 35b) alors qu'ils partagent tous deux cinq résidus avec le consensus "idéale".

7 peptides sur les 21 sélectionnés ont montré une bonne reconnaissance par l'Ac 12B12 et pas pour un autre Ac. Le fait que ces 7 peptides présentent une bonne affinité avec l'Ac 12B12 et pas avec d'autres Ac anti-LPS, suggère que ces peptides miment spécifiquement l'épitope du LPS reconnu par l'Ac 12B12.

Dans un second temps, les peptides montrant une affinité importante pour un autre Ac, en plus de 12B12, ont été retestés en ELISA indirect avec les mêmes Ac. Une seule concentration de phages a été utilisée et le test a été réalisé en triplicat. Ces tests visaient à infirmer ou confirmer les premiers résultats obtenus.

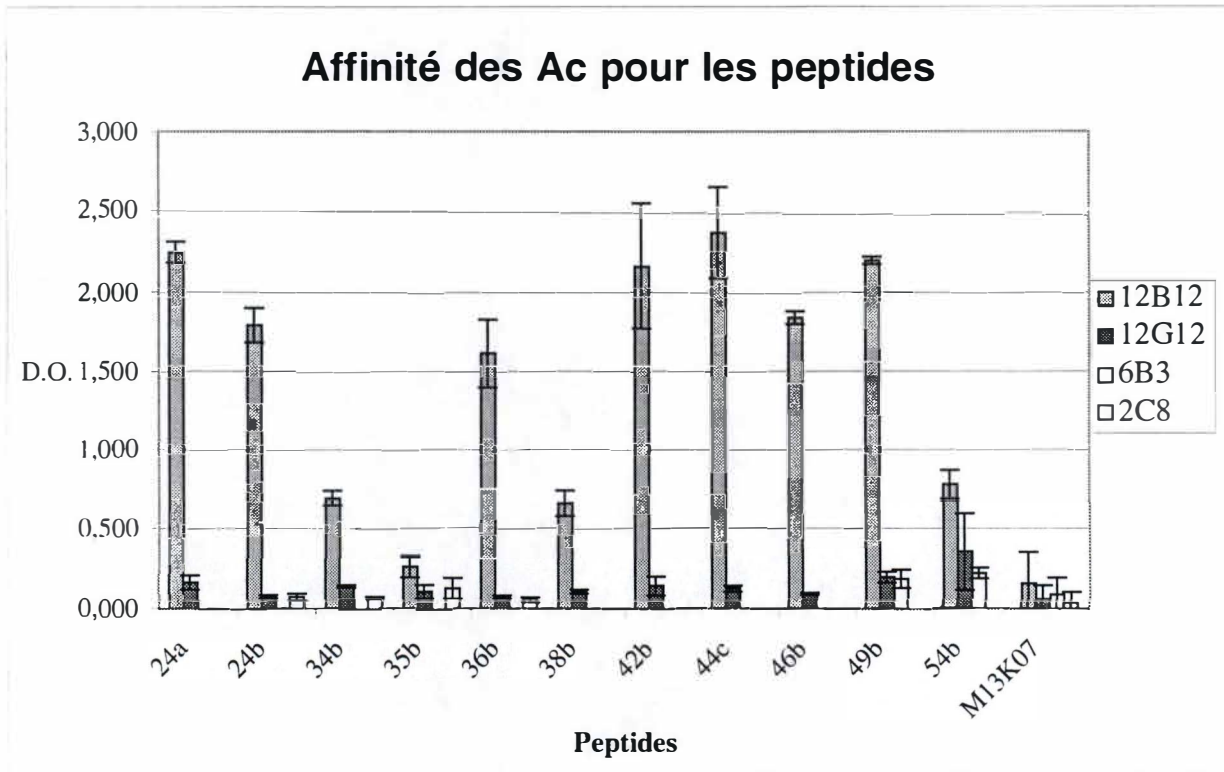


Figure 7 : Contrôle de l'affinité de certains peptides pour les Ac 12G12, 6B3 et 2C8. Le phage M13K07 sert de contrôle négatif.

Les résultats obtenus infirment les premiers résultats obtenus. L'ensemble des peptides gardent une bonne affinité pour 12B12 et non pas de réponse significative pour les autre Ac. En effet, le signal obtenu avec l'Ac 12G12 sur le peptide 54b n'est pas significativement plus grand que le signal obtenu pour le phage M13K07 (Figure 7).

Les treize peptides ayant montré une grande affinité pour l'Acm 12B12 ont été testés en ELISA de compétition.

2.6 Test ELISA de compétition

Le test ELISA de compétition a pour but de mettre en évidence la compétition qui peut exister entre le peptide et le LPS pour l'interaction avec l'Ac et ce dans le but d'identifier les mimotopes antigéniques du LPS. En effet, si la compétition a lieu, c'est que le peptide se lie au paratope de l'Acm et qu'il peut fonctionnellement mimer l'antigène natif.

La mise au point d'un ELISA de compétition nécessite l'établissement des concentrations en LPS et en Acm optimale. Pour cela, un ELISA indirect a été effectué mettant en jeu la reconnaissance du LPS W99 par l'Acm 12B12.

2.6.1. Mise au point de l'ELISA

Huit concentrations ont été testées en LPS allant de 5µg/ml jusqu'à une concentration de 0,03µg/ml et huit dilutions en Acm 12B12 allant de 500 jusque 64000 en diluant de deux en deux. Le but est que, s'il y a compétition entre le LPS et le peptide pour la liaison à l'Ac, la diminution résultante en Ac fixé au LPS induise la plus forte diminution d'absorbance. (Figure 8)

La concentration 0,5µg/ml pour le LPS et la dilution 4000 pour l'Ac sont utilisés car elles offrent la plus grande chute d'absorbance pour la concentration la plus basse en LPS.

2.6.2. ELISA de compétition

Les peptides utilisés pour les ELISA de compétition sont : 3b-5a-7a-7b-13a-24a-24b-32b-33c-36b-42b-44c et 49b.

Les contrôles négatifs sont réalisés à l'aide d'un phage non reconnu par 12B12 et d'un ELISA indirect sans compétiteur. Le contrôle positif est établi par auto-compétition avec du LPS dilué de manière à montrer une compétition avec le LPS déjà coaté.

Le phage porteur du peptide à tester est incubé à 6 concentrations différentes en présence de l'Ac dilué 4000 fois. Les concentrations en phage vont de 1.10^{12} phage/ml jusqu'à 1.10^7 phage/ml.

La figure 9 nous montre les résultats obtenus pour un des peptides compétant le mieux avec le LPS. La totalité des résultats obtenus sont présentés en annexe 2 à la page 50.

La diminution du pourcentage d'absorbance corrèle avec l'augmentation de la concentration en phage pour 11 des 13 peptides sur phage testés. Ceci montre un effet de compétition vis-à-vis du LPS coaté. Plus il y a de phages porteur du peptide plus la compétition est importante.

Les peptides 24b-36b ne sont pas capables d'inhiber l'interaction entre l'Ac et le peptide. Le reste des peptides testés a montré une compétition effective vis-à-vis du LPS de *Brucella*.

Séquences des 11 peptides ayant eu un résultat positif en ELISA de compétition :

3b	DSYGNLRGG	32b	CSYTPEGNLACG
5a	DKFGNLRW	33c	TYYGDYVRT
7a	DRFGNYRTQ	42b	CKWTRLGQHICG
7b	CWSASGNLGPCC	44c	CFSNRGDLQRC
13a	NYFGNFQLT	49b	NWFGNQETT
24a	DSFGNLMPP		

On peut classer les peptide ayant montrés une compétition effective par rapport à leur indice de compétition 50 (IC 50). Cet IC 50 représente la concentration nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition.

Les peptides ayant le plus bas IC50 sont les peptides 7a et 7b dont la concentration nécessaire pour avoir 50 % d'inhibition se situe entre 5.10^8 et 7.10^8 phages/ml.

Il faut noter que la quantité de peptides exprimés en surface de phages n'est pas connue et varie d'un phage à l'autre et d'un peptide à l'autre. Ce test permet donc de donner une valeur relative de la compétition entre phage et LPS, mais ne permet pas de déterminer la constante d'affinité respective des différents peptides. Pour cela, il faudrait synthétiser le peptide de manière chimique afin de pouvoir déterminer la quantité exacte de chaque peptide lors des tests.

Il faut aussi remarquer que le fait que le peptide entre en compétition avec le LPS ne signifie pas que le site de liaison du peptide au paratope de l'Ac soit le même que celui du LPS. Si cela était le cas, un tel peptide ne serait pas un mime peptidique d'un épitope de la chaîne O du LPS et l'immunisation d'une souris avec un tel peptide ne conduirait pas à la production d'Ac dirigé contre le LPS. Une possibilité d'éviter ce type de peptide serait l'obtention d'une structure cristallographique de l'interaction Ac/peptide et Ac/LPS.

Nom	Proteine recombinante	Nature et contexte du peptide
X9	pVIII	(X) ₉
CX9C	pVIII	C(X) ₉ C
Cys0	pVIII	(X) ₅ CC(X) ₅
Cys1	pVIII	(X) ₅ CXC(X) ₅
Cys2	pVIII	(X) ₅ C(X) ₂ C(X) ₅
Cys3	pVIII	(X) ₅ C(X) ₃ C(X) ₄
Cys4	pVIII	(X) ₄ C(X) ₄ C(X) ₄
Cys5	pVIII	(X) ₄ C(X) ₅ C(X) ₄
Cys6	pVIII	(X) ₄ C(X) ₆ C(X) ₄

"X" indique que la nature de l'acide aminé à cette position est aléatoire.

"C" représente la cystéine.

Tableau 5 : Banques de peptides présentés à la surface de phage utilisées dans cette étude

2.7. immuno-empreinte sur colonies infectées avec des éluats de pannings réalisés avec 12B12 et 12G12

Dans le but de sélectionner des peptides reconnus par deux Acm dirigés contre le même type d'épitope (dans notre cas, ce sera l'épitope C), nous allons effectuer des immuno-empreintes croisées à partir d'éluats de panning effectués à l'aide des Ac 12B12 et 12G12 que nous allons cribler respectivement avec l'Ac 12B12 et l'Ac 12G12.

Jusqu'ici, les immuno-empreintes réalisées avec l'Acm 12B12 sur des colonies provenant d'infections réalisées avec des éluats de pannings effectuées avec l'Acm 12B12 ont toujours révélés des colonies considérées positives avec les deux types de banques utilisées au laboratoire (« Felici » et « Smith »).

Par contre, les immuno-empreintes réalisées avec l'Acm 12G12 sur des colonies provenant d'infections réalisées avec des éluats de panning effectuées avec l'Acm 12G12 n'ont jamais révélé de colonies considérées positives quelque soit la banque utilisée.

Le but de ces immuno-empreintes sur colonies est d'isoler par criblage avec 1 des 2 Acm un peptide provenant d'un éluat obtenu lors d'un panning avec l'autre Acm. L'idée est qu'un peptide reconnu par deux Ac dirigés contre la même structure antigénique serait un meilleur mime antigénique. Un peptide sélectionné par les deux Ac 12B12 et 12G12, deux Ac dirigés contre des épitopes C de la chaîne O du LPS de *Brucella*, serait un bon mime de cette épitope et donc potentiellement un bon mime immunogénique de cet épitope de la chaîne O du LPS (Figure 10).

Les immuno-empreintes ont été réalisées sur des colonies infectées par les éluats provenant de deux mélanges de banques différentes. Le mélange de banques de peptides que l'on nommera « banques de Felici » est une banque 9aa et C9aaC de type 8+8. C'est de ce mélange de banque que sont issues les peptides séquencés au cours de ce travail. Le mélange de banques que l'on nommera « banques de Smith » est un mélange de banques d'une longueur de 10 à 16 résidus aléatoire avec 2 cystéine à distance variable. (tableau 5)

Les signaux positifs sur la membrane étant très peu visibles, les résultats ne pourront être montrés. Le tableau 6 résume les résultats obtenus.

1. « Banques de Felici »

La première banque testée est la banque de Felici. Les éluats utilisés proviennent d'un 2^{ème} cycle de panning :

- Eluat des panning réalisés avec **12B12** :
 - l'immuno-empreinte effectuée comme contrôle avec l'Ac 12B12 ne présente que deux spots faiblement visibles sur un ensemble d'une centaine de colonies. Il s'agit d'immuno-empreinte similaire à celle réalisée préalablement à ce travail pour la mise en évidence des clones sélectionnés

par l'Ac 12B12. Lors de ces immuno-empreintes, 60 colonies avaient été sélectionnées dès lors, on s'attendait à un meilleur résultat ;

- l'immuno-empreinte effectuée avec l'Ac 12G12 ne présente aucun spot visible.
- Eluat du panning obtenu avec **12G12** :
 - l'immuno-empreinte effectuée avec l'Ac 12G12 ne présente aucun spot visible. Ces résultats confirment les résultats déjà obtenus au laboratoire ;
 - l'immuno-empreinte effectuée avec l'Ac 12B12 présente quelques spots visibles sur plusieurs centaines de colonies.

Les criblages effectués sur les colonies provenant des éluats 12B12 avec l'Ac 12B12 ont toujours donné de bon résultats au laboratoire. Le fait que deux spots seulement soient visibles dans ce criblage est peut-être dû à l'ascite utilisé ou à un manque de sensibilité de l'immuno-empreinte.

Les quelques spots obtenus par le criblage des colonies provenant de l'éluat 12G12 avec l'Ac 12B12 doivent être confirmés et de plus fortes dilutions de colonies infectées devront être utilisées car il n'a pas été possible de repiquer les colonies positives sur la membrane du blot.

La confirmation de ces résultats permettrait d'isoler un peptide reconnu par deux Ac dirigés contre l'épitope C de la chaîne O du LPS.

2. "Banques de Smith".

La deuxième banque, celle de Smith, est criblée à partir de panning provenant d'un troisième cycle de panning :

- Eluat des pannings réalisés avec **12B12** :
 - l'immuno-empreinte réalisée comme contrôle avec l'Ac 12B12 présente des spots visibles, ce qui confirme les résultats des pannings ;
 - l'immuno-empreinte réalisé avec l'Ac 12G12 ne présente aucun spot visible.
- Eluat des pannings réalisés avec **12G12** :
 - l'immuno-empreinte réalisée avec l'Ac 12G12 ne présente aucun spot visible.
 - l'immuno-empreinte réalisée avec l'Ac 12B12 ne présente aucun spot visible ;

Seul le criblage de l'éluat obtenu avec 12B12 et criblé avec 12B12 présente des spots visibles. Ce qui confirme les résultats des panning réalisés avec 12B12.

Résultats et discussion

Le fait que 12G12 ne révèle aucun spot corréle les différents tests effectués au laboratoire avec cet Ac. Il n'a jamais été possible d'obtenir une réponse positive en blot avec cet Ac.

Ces tests pourraient être effectués avec une technique plus sensible telle la chémo-luminescence. Cela permettrait peut-être d'obtenir des résultats visibles avec l'Ac 12G12.

3. Conclusion et perspectives

3.1. Conclusion

Notre travail est basé sur la recherche d'un mimotope de l'épitope C du lipopolysaccharide de *Brucella*.

Pour ce faire, nous entreprenons la sélection de peptides reconnus par un Ac monoclonal à partir d'une banque de peptides aléatoires. Les banques de peptides aléatoires utilisées dans le projet développé au laboratoire sont des banques de peptides exprimés en surface de phages.

Antérieurement à ce travail, les Ac monoclonaux 12G12 et 12B12, reconnaissant tous deux un épitope C du LPS de *Brucella* ont été utilisés pour réaliser des cycles de sélection (pannings) sur diverse banque de peptides sur phage.

Les criblages effectués par immuno-empreinte sur colonies suite à ces pannings ont permis d'isoler soixante clones sélectionnés par l'Ac 12B12 dans un mélange des banques 9aa et C9aaC.

Notre travail a débuté par la réalisation d'immuno-empreintes sur des triplicats de ces 60 clones. Suite à cette immuno-empreinte, nous avons isolé 81 colonies infectées par des phages recombinants.

La région de l'ADN des phagemides codant pour le peptide présenté en surface du phage a été séquencée. Vingt et une séquences différentes ont été obtenues sur l'ensemble des quatre-vingt et une colonies.

L'analyse statistique des séquences obtenues a permis de mettre en évidence des acides aminés préférentiellement représentés ainsi que de déterminer des motifs consensus.

L'établissement de ce que nous avons défini comme la "valeur statistique" de ces consensus, basée sur la probabilité d'apparition par hasard de ces séquences dans les peptides sélectionnés, nous a permis de proposer des hypothèses quant à l'importance de ces divers consensus dans l'interaction avec l'Acm 12B12.

Le consensus glycine-asparagine/aspartate-leucine (GN/D-L) semble être le motif central jouant probablement un rôle majeur dans l'interaction avec l'Acm 12B12.

Un consensus global a pu être établi sur base des différents motifs consensus mis en évidence. Ce consensus est D/T P/Y F G N/D L R P. L'établissement de cette séquence ne permet pas de dire qu'elle serait un parfait mimotope de l'épitope originel reconnu par 12B12. Nous n'avons pu isoler de peptide correspondant à cette séquence consensus. Il se peut que deux résidus présents dans ce consensus soient incompatibles lorsqu'ils sont présents ensemble dans cette configuration pour l'interaction avec l'Ac. Ainsi, on peut remarquer que

Conclusion et perspectives

la proline présente en 2^{ème} position de notre consensus idéal n'apparaît dans l'ensemble de nos peptides que suivie de la thréonine qui ne fait pas partie de notre consensus idéal puisqu'elle apparaît moins fréquemment que la Phe. en 3^{ème} position. Cela voudrait dire que certains a.a. ne seraient compatibles avec l'interaction Ac-peptide, à une position déterminée, que grâce à la présence d'un autre a.a. à leur côté.

Les vingt et un peptides obtenus ont ensuite été testés en ELISA indirect afin de déterminer la spécificité de ces vingt et un peptides pour notre Ac 12B12. Chaque peptide s'est révélé être spécifiquement reconnu par l'Ac 12B12.

La dernière étape de la caractérisation de ces peptides en phage a consisté en la réalisation d'ELISA de compétition avec les 13 peptides ayant montré une grande affinité avec notre Ac 12B12 lors des ELISA indirects. Onze des 13 peptides sélectionnés ont permis de mettre en évidence une compétition avec le LPS pour la fixation à l'Ac 12B12. Ces onze peptides peuvent dès lors être considérés comme étant des mimotopes antigéniques.

Il est possible qu'en modifiant certains paramètres du test de compétition, comme la concentration en LPS ou en Ac 12B12, on puisse montrer une compétition pour les trois peptides n'ayant pas montrés de bons résultats lors des ELISA de compétition.

En outre, il a été montré au laboratoire que la capacité des peptides à entrer en compétition avec le LPS pour la liaison à l'Ac est liée à son affinité. Donc, dans le cas de peptides de faible affinité, un test de compétition où le phage porteur du peptide est coaté et où le LPS est utilisé comme compétiteur, a permis de mettre en évidence une compétition qui n'avait pu être montrée en utilisant le phage comme compétiteur, comme dans le test que nous avons mis en œuvre. Nous pourrions donc tester ce second type d'ELISA de compétition pour construire les peptides sélectionnés dans ce travail.

La possibilité d'obtenir un peptide reconnu par deux Ac spécifiques du LPS de *Brucella* serait un avantage dans la recherche d'un peptide mimotope. Le fait qu'un tel peptide mimotope soit reconnu par deux Ac dirigés contre une même structure saccharidique suggérerait que ce peptide est un bon mime de cette structure et potentiellement un meilleur mimotope immunogène. Pour tenter d'isoler un tel peptide nous avons criblé des colonies infectées par des phages issus de panning provenant de deux banques de peptides différents et sélectionné avec l'Ac 12B12 d'une part et l'Ac 12G12 d'autre part. Les résultats obtenus par l'Ac 12G12 sur les différents éluats confirment les résultats déjà obtenus au labo à savoir sa non-reconnaissance de colonies en immuno-empreinte. Par contre nous avons réussi à sélectionner des colonies à l'aide de l'Ac 12B12 sur des éluats obtenus avec 12G12. Ce résultats devra être confirmé par de nouvelles immuno-empreintes mais sont déjà une étape déterminante dans l'obtention d'un mimotope reconnu par deux Ac monoclonaux dirigés contre le même épitope du LPS de *Brucella*.

3.2. Perspectives

La caractérisation des peptides sur phages isolés au cours de ce mémoire devrait être poursuivie. Hormis la réalisation de tests ELISA de compétition en utilisant le LPS comme compétiteur tel qu'explicité dans les conclusions, il serait intéressant d'évaluer l'importance de la contrainte apportée par les ponts disulfures sur les peptides bordés de cystéines. Pour ce faire des ELISA dans lesquels les peptides seraient placés en conditions réductrices devraient être réalisés. La détermination avec une meilleure précision de l'affinité des différents peptides pour l'Acm 12B12 ne pourra être réalisée qu'en utilisant des peptides de synthèse de même séquence que les peptides sur phages isolés. En effet, le nombre de peptides par phage n'étant pas connu, la comparaison des résultats obtenus dans les tests ELISA n'est qu'indicative.

En ce qui concerne les colonies positives mises en évidence lors des immunoeempreintes réalisées avec l'Acm12B12 sur des colonies infectées par des phages sélectionnés avec l'Acm 12g12, la suite du travail consistera à isoler ces colonies et caractériser les clones isolés comme nous l'avons réalisé pour les clones isolés au cours de ce travail. Cette caractérisation sera tant structurelle (séquençage des peptides portés par ces phages) que fonctionnelle (évaluation des intensités d'interaction avec les Acm 12G12 et 12B12).

La découverte de mimotopes de l'épitope C du LPS de *Brucella* n'est qu'une étape préliminaire dans un projet plus large englobant l'amélioration des tests diagnostiques et des vaccins anti-*Brucella*.

L'utilisation de ces peptides sélectionnés par l'Acm 12B12 dans une perspective diagnostique passera par le test de la reconnaissance de ces peptides par des sera d'animaux infectés par *Brucella*. Leur utilisation dans une approche vaccinale comme mimotopes immunogéniques, c'est-à-dire comme peptides pouvant induire une réponse immune dirigé contre le LPS de *Brucella* devra également être testée. Ces divers tests seraient facilités par l'utilisation de peptides synthétiques.

- Approche vaccinale

Afin d'éprouver l'utilisation potentielle de ces peptides dans une approche vaccinale, des tests d'immunogénicité seront mis en œuvre. Différentes expériences pourraient être réalisées dans ce but.

Une première étape consisterait à injecter les mimotopes sur phages ou couplés à des protéines carrier à des souris. La réponse immunitaire humorale de ces souris sera analysée afin d'évaluer la production d'anticorps dirigés à la fois à l'encontre des peptides mais surtout envers le LPS.

Lors d'immunisations de souris réalisées au laboratoire avec des peptides mimotopes d'autres épitopes du LPS de *Brucella*, une réponse immunitaire humorale anti-peptide a toujours été obtenue. Cependant très peu de sera étaient capables de reconnaître le LPS en ELISA.

Si l'un des peptides nouvellement sélectionné avec l'Acm 12B12 se révèle capable d'induire une réponse immunitaire dirigée contre le LPS de *Brucella*, il serait intéressant de tester sa capacité protectrice.

Son caractère protecteur pourra être vérifié par l'immunisation de souris avec ce mimotope suivie d'une infection par *Brucella*. Si l'immunisation par le peptide est capable de diminuer le niveau d'infection, il pourra être considéré comme protecteur.

Il faut néanmoins rester conscient que cette approche est purement théorique et que d'autres structures antigéniques devraient être jointes aux mimotopes, particulièrement celles qui sont susceptibles d'induire une réponse des lymphocytes T (cytotoxiques et helper de type 1).

4. Approche diagnostique

L'obtention d'un test diagnostique sérologique évitant les RSFPs et améliorant la discrimination entre animaux infectés et animaux vaccinés nécessite quant à elle l'emploi de mimotopes hautement spécifiques. Un tel peptide mimotope devrait être reconnu par les Ac produits par un animal infecté par *Brucella* et ne pas être reconnu par les Ac produits suite à une infection par une autre bactérie telle que *Yersinia enterocolitica* O:9. Pour cela les peptides obtenus devront être testés avec des sérums d'animaux infectés par *Brucella* et avec des sérums d'animaux infectés par *Yersinia enterocolitica* O:9. L'obtention de mimotopes d'un épitope C répond à ce critère.

Ce peptide ne devrait pas être reconnu par les Ac produits lors de la vaccination contre la brucellose. Pour cela, le vaccin potentiel et le test de dépistage devront être basés sur des peptides mimant différents épitopes du LPS de *Brucella*. Le vaccin ne devrait pas contenir de peptides mimant l'épitope C dont un mimotope serait utilisé dans le test de diagnostic.

5. Amélioration possible

Un moyen d'améliorer l'antigénicité et/ou l'immunogénicité d'un peptide serait d'augmenter leur affinité par rapport à l'Ac et/ou leur stabilité intrinsèque.

La construction d'une banque de seconde génération permet de jouer sur ces deux paramètres :

1. on pourrait construire une nouvelle banque de peptides en mutant les positions moins conservées et en gardant les séquences consensus observées dans les peptides sélectionnés. Cette banque de seconde génération pourrait alors être

- engagée dans des procédures de panning. De cette manière, on peut espérer isoler des peptides de meilleure affinité ;
2. en augmentant la taille d'un peptide par insertion de séquences aléatoires, de part et d'autre de sa séquence, on peut espérer obtenir un peptide ayant une ou seulement quelques conformations stables. Cette augmentation de stabilité permettrait de fixer le peptide dans sa conformation "mimotope".

Un autre avantage de la construction de banques de seconde génération est la possibilité d'un criblage plus large des structures potentiellement mimotopes. Rappelons-nous que la diversité totale d'une banque (banque où tous les clones différents possibles sont représentés), dépend du nombre d'acides aminés formant le peptide. Plus ce nombre est grand plus la diversité totale est importante, dans notre cas (banque C9aaC et 9aa) la diversité totale est de 64^9 . Il existe une limite pratique à la construction d'une banque peptidique totale qui est l'efficacité maximale de transformation des bactéries par de l'ADN recombinant (environ 10^8 clones).

De ce fait, toutes les combinaisons possible pour une banque de peptides de 9aa ne se trouvent pas dans notre banque dont la diversité est de 10^8 ; il est donc possible que le peptide mimotope "optimal" ne soit pas sélectionné car il est absent de la banque. Par ailleurs le ou les peptides de meilleure affinité sont peut-être des "parents" de ceux qui sont sélectionnés initialement.

La réalisation des PCR mutagénéisantes sur des séquences obtenues dans la banque initiale permettrait de faire apparaître de nouveaux peptides parents des peptides sélectionnés dont certains auront peut-être une meilleure affinité.

Une autre méthode pour augmenter l'affinité du peptide pour l'AC serait d'utiliser une approche structurale par modélisation in-silico, ou une approche cristallographique permettant de mieux comprendre les interactions Ac/épitope et Ac/mimotope. Ceci serait aussi intéressant pour comprendre comment un peptide peut mimer structurellement un épitope saccharidique.

4. Matériel et méthodes

4.1. Sélection des peptides en phage

La première étape a été réalisée préalablement au laboratoire par panning ou technique de sélection-amplification.

L'étape suivante est la sélection par immuno-empreinte des peptides d'intérêt.

4.1.1. Immuno-empreinte sur colonies (CIB)

Les immuno-empreintes sont réalisées avec des membranes de nylon amphotère (NY-Amp, Macherey-Nagel) sur les colonies infectées par les phages. Pour déterminer si l'Ac primaire utilisé a interagit avec un peptide, on utilise un Ac secondaire couplé à la peroxydase. L'Ac secondaire reconnaît l'Ac primaire fixé au peptide. La présence de la peroxydase est détectée avec un mélange chromogène et l'empreinte des colonies positives (présentant un peptide reconnu par l'Ac) est colorée.

SOLUTIONS :

- solution de saturation : PBS-lait écrémé en poudre 5 % (PBS-LEP) ;
- PBS 10X : 2g KH_2PO_4 ; 14,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30 % ; 80g NaCl ; 2g KCl ;
- solution de révélation : 100ml de PBS 1X + 60 μl d' H_2O ; 60 mg de "HRP (Horseradish peroxydase) color substrate" (4-chloro-1-naphtol) (Bio-Rad) dissout dans 20 ml de méthanol. Réaliser ces solutions et mélanger le tout juste avant la révélation ;
- PBS-Tween : PBS 1X ; Tween 0,05 % ;
- Ac secondaire : Ac de chèvre (anti-Ac de souris) couplés à la peroxydase (GAM-HRP).

METHODE :

1. établir une série de marques sur la membrane pour pouvoir déterminer sa position sur la boîte de Pétri après l'avoir retiré ;
2. déposer un contrôle positif sur la membrane (dans notre cas, il s'agira de deux LPS purifié, Rev1 et W99 à raison de 1 μl de chacun) ;

3. déposer les membranes de nylon amphotère sur les boîtes de Pétri contenant les colonies ;
4. mettre 2h à 37°C ;
5. laver 1X membrane avec PBS-Tween ;
6. mettre les membranes dans la solution de saturation ;
7. incuber 2h à 37°C ;
8. laver 1X membrane avec PBS-Tween ;
9. incuber les membranes en présence de l'Ac primaire (12B12) ;
10. laisser 1h à 37°C ;
11. laver 5X membrane avec PBS-Tween ;
12. mettre les membranes en présence de l'Ac secondaire (7 ml par filtre de solution extemporanément). Incuber 1h à 37°C sous agitation à l'abri de la lumière ;
13. laver 3X avec PBS-Tween et 2X avec PBS ;
14. transférer les membranes dans la solution de révélation. Laisser 1h à température ambiante à l'obscurité et sous agitation ;
15. arrêter la réaction en lavant à l'eau pure.

4.1.2. Intérêt de coupler les techniques de panning et de CIB

L'isolement de mimotopes commence généralement par plusieurs cycles de sélection par panning. Ceux-ci ont l'avantage de pouvoir être réalisés sur la banque entière (ex : 10^9 clones) alors que le criblage direct (par CIB) d'une banque de 10^9 clones n'est pas facilement réalisable. Il faudrait une surface énorme pour pouvoir cribler une quantité équivalente de clones.

L'isolement des peptides d'intérêt est réalisé via une sélection de ligands par purification d'affinité. Pour cela un récepteur (dans notre cas un Acm) sera pré immobilisé sur une surface solide. Les peptides sont capturés, ainsi que leur vecteur d'expression, par formation de complexes avec les récepteurs. L'élimination de ce qui ne s'est pas fixé spécifiquement est réalisée par lavages et les peptides d'intérêt sont récupérés par une technique d'élution particulière (Figure 1)

La stratégie fondée sur la sélection est plus puissante qu'une stratégie de criblage classique. Ce qui limite très fortement le nombre de peptides traitables par criblage est la surface nécessaire pour étaler les colonies, la sélection pour sa part s'opère sur l'ensemble des peptides. Le nombre de cycles à effectuer pour obtenir un mélange fortement enrichi en peptides positifs dépendra de l'efficacité de la méthode de sélection.

Le mélange obtenu sera ensuite soumis à une étape de criblage afin d'individualiser et de connaître la quantité exacte de phages véritablement reconnus dans le mélange.

4.2. P.C.R. et séquençage

Les phages d'intérêt mis en évidence par immuno-empreinte sur colonies sont isolés par repiquage sur milieu solide (LB + Agar). La région de l'ADN du phage ou du phagemide codant pour le peptide sélectionné est alors amplifiée par PCR sur colonies de manière à pouvoir par la suite séquencer cette région.

4.2.1. P.C.R

REACTIFS ET SOLUTIONS :

- primer amont : 5' -ATTCTAGAGATTACGCC-3' : 0,2 µl (Feli amont) ;
- primer aval : 5' -TGCTGCAAGGCGATTAAGTT-3' : 0,2 µl (Feli aval) ;
- Enzyme : polymérase Biotools : 1 µl ;
- dNTPs : 1 µl (10 mM de chaque dNTP) ;
- tampon de réaction (1X) : 10 µl ;
- H₂O pour amener à un volume total de 50 µl : 37,6 µl ;
- tampon (1X) : 75mM Tris HCl (pH 9,0) ;

2mM MgCl₂

50mM KCl

20mM (NH₄)₂SO₄

CYCE :

- 4 minutes à 95°C (dénaturation) ;
- 35 cycles d'amplification présentés comme suit :
 - * 30 sec. à 94°C (dénaturation) ;
 - * 30 sec. à 52°C (hybridation des amorces) ;
 - * 1 min. à 72°C (élongation) ;
- 4 minutes à 72°C (élongation finale) .

METHODE :

1. préparer le mix dans un microtube pour PCR (0,2 ml) pour chaque colonie à amplifier ;
2. au moyen d'un tips stérile, effleurer le centre d'une colonie infectée. Plonger le tips dans le microtube contenant le mélange de réaction, remuer quelques instants ;
3. effectuer la PCR ;
4. analyser 5 µl de produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 %). Conserver le reste des produits à -20°C.

4.2.2. Séquençage

La réaction de séquençage se fait par Cycle sequencing au moyen du "ABI PRISM™ Big Dye pour séquenceur automatique ABI Prism (Perkin Elmer). Le séquençage se réalise sur échantillon d'ADN amplifié par PCR purifié à l'aide du « High Pure PCR Product Purification Kit » (Boehringer Mannheim).

4.2.2.1. Purification de l'échantillon amplifié par PCR

1. porter à 100 µl avec de l'eau H₂O ;
2. transférer le tout dans un Eppendorf et ajouter 500 µl de « binding buffer » (guanidine-thiocyanate 3M ; Tris HCl 10 mM ; éthanol 5 % ; pH 6,6). Mélanger et centrifuger afin de placer l'entièreté de l'échantillon dans le fond de l'Eppendorf ;
3. pipeter l'échantillon et le déposer dans le tube filtrant placé dans le tube collecteur. Tous deux fournis par le kit;
4. les acides nucléiques se lient spécifiquement aux fibres de verre prétraitées qui constituent le filtre, ce qui permet leur purification ;
5. centrifuger 30 secondes à 14000 rpm ;
6. jeter ce qui se trouve dans le tube collecteur et ajouter dans le tube filtrant 500 µl de « washing buffer » (NaCl 20 mM ; Tris-HCl 2mM ; pH 7,5 ; éthanol).
7. centrifuger 30 secondes à 14000 rpm ;
8. jeter ce qui se trouve dans le tube collecteur et ajouter dans le tube filtrant 200 µl de « washing buffer » ;
9. centrifuger 30 secondes à 14000 rpm ;

10. jeter le tube collecteur et placer le tube filtrant sur un Eppendorf. Déposer dans le tube filtrant 50 μ l d'« élution buffer » (Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1mM ; pH 8,5) ;
11. centrifuger 30 secondes à 14000 rpm ;
12. conserver l'échantillon purifié à -20°C. Six μ l de cet échantillon sont mis sur gel afin d'évaluer la quantité de matériel pour le séquençage.

4.2.2.2 Séquençage

La méthode de séquençage est basée sur celle décrite par Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Elle diffère cependant de cette dernière au niveau du mélange de séquençage qui est constitué des quatre déoxyribonucléotides non-marqués ainsi que des quatre didéoxyribonucléotides correspondants, chacun étant couplé à un marqueur fluorescent spécifique, permettant ainsi de les distinguer. le système de lecture est capable de les différencier sur base des différences de fluorescence.

REACTIFS ET SOLUTION :

- l'amorce utilisée est M13-40 : 5'GTTTTCCCAGTCACGAC-3' ;
- mix de réaction contenant les didéoxyribonucléotides marqué (Terminator Ready Reaction Mix) ;
- les déoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dCTP, dITP, dTTP) ;
- l'amplitaq DNA polymérase ;
- le tampon Tris-HCl pH 9,0 ;
- $MgCl_2$;

METHODE :

1. préparer dans un microtube pour PCR (0,2 ml) un mélange de 20 μ l contenant : 1 μ l d'échantillon à séquencer du produit PCR purifié, 2 μ l de « Terminator Ready Reaction Mix », 6 μ l de tampon Tris-HCl, 2 μ l de primer seq. 1,6 μ M ; porter à 20 μ l avec de l'eau ;
2. programmer l'appareil PCR comme suit (répéter 25 fois le cycle) :
3. 10 sec. à 96°C (dénaturation) ,
4. 10 sec. à 50°C (hybridation),

5. 4 min. à 60°C (élongation).
6. transférer les 20 µl de produit dans un Eppendorf. Précipiter l'ADN en ajoutant 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 et 2,5 volumes d'éthanol. Mélanger et incubé 10 minutes sur glace ;
7. centrifuger à 4°C 30 minutes à 14000 rpm ;
8. éliminer le surnageant. Laver le culot avec 100 µl d'éthanol 70 % ;
9. centrifuger à 4°C 2 à 5 minutes à 14000 rpm ;
10. éliminer l'éthanol. Sécher l'ADN en laissant évaporer le reste d'éthanol à température ambiante ;
11. stocker le culot d'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).

4.3. Électrophorèse en gel d'agarose

Cette technique permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. L'ADN, chargé négativement, est attiré par la borne positive mais il est freiné par le réseau tridimensionnel formé par l'agarose, les plus petits fragments migrant plus rapidement. 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 un marqueur contenant des fragments d'ADN de taille connue. L'utilisation du bromure d'éthidium, une molécule fluorescente qui lie l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice permet la visualisation des fragments sous illumination UV ($\lambda = 302$ nm). La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à la quantité de bromure d'éthidium qu'il contient, donc à sa taille et à la quantité d'ADN présent. Ainsi, en connaissant la quantité d'ADN du marqueur de taille, on peut estimer approximativement la quantité d'ADN du fragment par comparaison des intensités de fluorescence.

SOLUTIONS :

- tampon TAE (Tris acétate EDTA) 50X : 242 g Tris-HCl, 57,1 g d'acide acétique glacial, 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'alourdissement 10X : 50 % sucrose, 25 mM Na₂EDTA, 1 % SDS, 0,25 % bleu de bromophénol ;
- marqueur de taille : « 100 bp DNA Ladder Plus » (MBI Fermentas). 3 plasmides différents ont été restreints produisant 14 fragments dont celui de 500 bp présentant l'intensité la plus forte. 10 µl sont déposés dans le puit, ce qui est équivalent à 1,5µg .

METHODE :

1. ajouter 5 µl de solution de coloration et d'alourdissement 2X (déjà dilué 5X dans de l'eau bidistillée stérile) à 5 µl d'ADN ;
2. dissoudre l'agarose (Boehringer Mannheim), en chauffant jusqu'à l'ébullition dans du tampon 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 température de la solution a chuté à environ 50°C. Laisser le gel polymériser. Retirer les peignes. Placer le gel dans la cuve et le recouvrir de TAE 1X contenant du bromure d'éthidium ;
4. déposer dans les puits les échantillons ainsi que le marqueur ;
5. migrer avec une différence de potentiel de 2,5 à 5 Volts/cm pendant une à deux heures ;
6. visualiser sur table UV.

4.4. Production de phages et évaluation de la quantité de phages produits

4.4.1. Production de phages

La production de phages est réalisée afin d'en avoir une quantité importante pour procéder aux tests ELISA de caractérisation des peptides.

SOLUTIONS :

- Ampicilline (100 µg/ml) ;
- Milieu LB : 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl. ;
- TBS 10X (stérilisé par autoclavage) : 0,5 M Tris base ; 1,5 M NaCl ; porter à pH 7,5 avec de l'HCl 6N ;
- PEG-NaCl (stérile) : 100 g PEG 8000 ; 116,9 g NaCl; 475 ml H₂O. Dissoudre en chauffant légèrement, puis autoclaver et homogénéiser en refroidissant ;
- TBS-azide 0,01 % ;
- Phage helper : phage apportant toutes les séquences codantes pour les produits permettant la réplication virale et l'encapsidation. Celui-ci a une modification dans la séquence de la région intergénique qui diminue l'efficacité de sa réplication, de telle sorte que la majorité des particules virales sortantes de la bactérie contiennent l'ADN du phagemide ;
- IPTG : (Isopropyl-thio beta D thiogalactoside) analogue du lactose, il permet une dérégulation du gène de la pVIII recombinante. Il n'est pas métabolisable, et reste donc tout le temps actif.

METHODE :

1. la veille, lancer une préculture dans un universel contenant 5 ml LB + 5 µl ampicilline. Laisser toute la nuit à 37°C sous agitation ;
2. mesurer la D.O. et calculer le volume nécessaire pour avoir une D.O. de 0,05 dans un volume de 50 ml de LB (dans Erlen à contre-pales) ;
3. mettre les Erlen à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une D.O. comprise entre 0,200 et 0,250 (+/-1H30) ;
4. laisser reposer 15' à 37°C (pour permettre la formation des pilus pour l'infection) ;
5. ajouter 2 µl de phage helper dans chaque Erlen ;
6. mettre à 37°C 15' sans agitation ;
7. ajouter 50 µl d'IPTG 1M, agiter 5H à 37°C ;
8. transvaser dans Falcon de 50 ml et centrifuger 15' à 4000rpm à 4°C ;
9. récupérer le surnageant et ajouter 0,15 volume de PEG-NaCl afin de précipiter les phages ;

10. laisser la nuit à 4°C ;
11. centrifuger le Falcon 30' à 4000rpm 4°C ;
12. éliminer le surnageant, et resuspendre le culot dans 1 ml de TBS 1X azide 0,01 % stérile ;
13. transférer la suspension dans un Eppendorf. Placer quelques minutes à 65°C puis sur glace ;
14. centrifuger 5 minutes à 14000 rpm et à 4°C. Récupérer le surnageant dans 150µl PEG-NaCl. Mettre sur glace ;
15. centrifuger 15 minutes à 5000 rpm et à 4°C ;
16. enlevez le surnageant et resuspendre dans 0,2-0,5ml de TBS 1Xazide 0,01 % stérile ;
17. mettre à 4°C.

4.4.2. Évaluation du nombre de particules phagiennes.

L'évaluation du nombre de particules phagiennes 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 un pic maximal à 269 nm. Ce maximum d'absorbance à 269 nm résulte de l'addition des profils d'absorbance des deux composants des particules phagiennes, c'est-à-dire l'ADN et les protéines, qui présentent des maxima à respectivement 260 et 280 nm.

Une autre méthode est basée sur la résistance des bactéries à l'ampicilline. Le gène de résistance se trouvant dans le génome du phage. Il permet de titrer les phages en comptant les colonies infectées sur milieu sélectif contenant l'antibiotique. Les résultats de titration sont exprimés en TU (Transducing Unit, particules infectantes) par ml, ce qui représente le nombre de cellule infectées. Le nombre de TU représente environ 5% du nombre de particules phagiennes.

METHODE :

1. calibrer le spectrophotomètre avec du TBS 1X azide 0,02 % en prenant la référence suivante : absorbance à 320 nm (A_{320}) = 0. Ensuite, prendre l'absorbance à 269 nm (A_{269}). Cette valeur servira de référence et devra être déduite des absorbances obtenues pour les préparations de phages ;

2. mesurer l' A_{320} , l' A_{269} pour les préparations de phages diluées 10X dans du TBS 1X azide 0,02% ;
3. le nombre de particules phagiennes par unité de volume est calculé grâce à la formule :

$$(A_{269} - A_{320}) \times 10/1,5 \times 10^{13} \text{ phages/ml} = \text{nombre de phages/ml ; en sachant que } 1,5 (A_{269} - A_{320})/\text{ml} = 10^{13} \text{ phages/ml.}$$

4.5. Purification d'ADN plasmidique.

Cette technique consiste à isoler et purifier l'ADN plasmidique. Elle consiste en une lyse bactérienne et une précipitation des protéines et débris cellulaires.

SOLUTIONS :

- tampon P1 : RNase A (100 µg/ml) dans 50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8,0 (précipite l'ADN) ;
- tampon P2 : 200 mM NaOH, 1 % SDS ;
- tampon P3 : 2,55 M KAc, pH 4,8.0 ;
- tampon TE : Tris-HCl (10mM) EDTA (1mM) pH8.

METHODE :

1. la veille, lancer une culture des bactéries contenant le plasmide à purifier ;
2. mettre 1,5 ml dans un Eppendorf et centrifuger 5 minutes 14000rpm 4°C ;
3. resuspendre le culot bactérien dans 0,3 ml du tampon P1 ;
4. ajouter 0,3 ml du tampon P2, remuer doucement, laisser incuber à température ambiante 5 minutes ;
5. ajouter 0,3 ml du tampon P3, remuer doucement 5 minutes sur glace, centrifuger à 4°C pendant 15 minutes à 14000rpm et récupérer le surnageant délicatement ;
6. précipiter l'ADN du surnageant avec 0,8 volume d'isopropanol (à température ambiante) et centrifuger 15 minutes à 14000rpm ;
7. laver l'ADN avec 70 % d'éthanol, sécher brièvement et redissoudre dans 50µl de tampon TE.

4.6. Transformation de cellules.

Cette technique est utilisée pour permettre l'entrée d'ADN étranger dans une cellule bactérienne.

SOLUTIONS :

- TSB : 100ml de LB, 10g de PEG (4000), 5 ml DMSO, 1 ml de $MgCl_2$ 1M, 1 ml de $MgSO_4$;
- boîte de Pétris avec LB Agar + ampicilline : 10 g/l tryptone, 5 g/l d'extrait de levure, NaCl 10 g/l, Agar 2% .

METHODE :

1. lancer préculture dans LB streptomycine (30 μ g/ml) avec souche DH11S ;
2. prélever 500 μ l de la préculture et mettre dans 50 ml LB streptomycine ;
3. laisser pousser jusqu'à une DO_{600nm} de 0,3-0,4 ;
4. centrifuger dans Falcon à 2200rpm pendant 10 minutes ;
5. resuspendre dans 1/10 de volume de TSB ;
6. utiliser 0,1 ml de cellule par transformation et ajouter 1 μ l de plasmide DNA ;
7. mettre sur glace 30 minutes ;
8. ajouter 0,9 ml de TSB et 20 μ l de glucose 20 % puis mettre 1 heure à 37°C ;
9. étaler les cellules sur boîte à raison de 100 μ l par boîte. Incuber une nuit à 37°C.

4.7. Test ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay).

Les tests ELISA permettent une estimation quantitative de l'interaction de l'anticorps pour le peptide présenté en surface du phage et d'estimer la spécificité de cette interaction. L'importance du pont disulfure qui contraint la structure du peptide présenté peut aussi être testée. Pour que ces valeurs puissent être comparables entre les différents clones de phages, le test est réalisé avec des quantités équivalentes de particules phagiennes dans chacun puit.

En vue de la mise au point des tests ELISA de compétition, un ELISA indirect basé sur la reconnaissance du LPS par l'Acm 12B12 à différentes dilutions (tant pour l'Acm que pour

le LPS) a été réalisé; Ceci afin de déterminer la dilution adéquate à utiliser lors des tests ELISA. Le temps de révélation est aussi déterminé.

4.7.1. ELISA indirect

Dans chaque test, les puits des plaques MAXISORP (Nunc) ont été sensibilisés avec 100 µl de chacun des phages à une concentration de 10^{12} particules/ml, une nuit à 4°C

La mise en évidence de la liaison de l'Acm sur le peptide exprimé en surface du phage a été réalisée à l'aide d'un Ac secondaire, Ac de chèvre anti-Ac de souris, couplé à la peroxydase. L'enzyme réagissant avec le substrat « K-Blue substrate » (Neogen) donne une coloration bleue. Le bleu vire au jaune lorsque l' H_2SO_4 2N est ajouté pour arrêter la réaction. L'absorbance à 450 nm et 630 nm est mesurée. La différence d'absorbance entre 450 nm et 630 nm est prise en considération, la valeur d'absorbance à 630 nm étant considérée comme ligne de base.

Dans chacun de ces tests, des contrôles positifs, visant à contrôler les Acm, ont été effectués dans des puits sensibilisés avec du LPS A-dominant (W99) et avec du LPS M-dominant (Rev 1). Le LPS est coaté à 1µg/ml. Des contrôles négatifs, visant à mettre en évidence le bruit de fond, ont été réalisés dans des puits non sensibilisés (Figure 2)

SOLUTIONS :

- solution de saturation : PBS 1X-lait écrémé en poudre 5 % ;
- PBS 10X : 2g KH_2PO_4 , 14,4g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, 80g NaCl, 2g KCl ;
- solution de dilution des anticorps : solution de saturation diluée 5 fois dans du PBS-tween 1X ;
- solution de lavage : PBS-Tween 0,05 %.

METHODE :

1. sensibiliser une plaque Maxisorp (Nunc) une nuit à 4°C avec 100 µl de phages à 10^{12} particules/ml, dilués dans du PBS 1X ;
2. laver les puits avec 100 µl de solution de saturation puis ajouter 300 µl de solution de saturation et incubé 2h à 37°C ;

3. laver 5 fois (lavages manuels) avec 300 µl de PBS 1X Tween 0,05 % ;
4. ajouter 100 µl du surnageant de culture d'hybridome dilué de manière adéquate dans la solution de dilution ;
5. laisser incuber 1h à 37°C ;
6. laver la plaque 5 fois avec 300 µl de PBS 1X Tween 0,05 % ;
7. ajouter 100 µl par puits de GAM-HRP dilué 1500 fois dans la solution de dilution. Incuber 1h à 37°C ;
8. laver 5 fois avec 300 µl de PBS 1X Tween 0,05 % ;
9. ajouter 100 µl par puits de "K-Blue substrate" (Neogen) et laisser incuber 15 minutes à l'obscurité (coloration bleue) ;
10. arrêter la réaction avec 25 µl d'H₂SO₄ 2N (coloration jaune) ;
11. lire l'absorbance des puits à 450 et 630 nm.

4.7.2. ELISA de compétition

Lors de ce test, les plaques ont été sensibilisées par le LPS, à une concentration déterminée préalablement, une nuit à 37°C. Après la saturation, une mixture contenant l'Acm spécifique du LPS ainsi que le phage (incubés ensemble over-night à 4°C) est déposée dans les puits. L'anticorps secondaire est, comme dans l'ELISA indirect, un Ac de chèvre anti-anticorps de souris couplé à une peroxydase (GAM-HRP) (figure 3).

Des contrôles positifs sans phage compétiteur ont également été réalisés.

SOLUTIONS : cf. ELISA indirect

METHODE :

1. sensibiliser les puits avec LPS à dilution voulue. 50µl par puit ;
2. laver les puits avec 100µl de solution de saturation puis ajouter 300µl de solution de saturation et incuber 2h à 37°C ;
3. laver 5 fois (lavages manuels) avec 300 µl de TBS 1X Tween 0,05% ;
4. ajouter 50 µl du mélange Acm dilué de manière adéquate + phage dans la solution de dilution ;
5. laisser incuber 1h à 37°C ;
6. laver la plaque 5 fois avec 300 µl de PBS 1X Tween 0,05% ;

7. ajouter 50 µl par puit de GAM-HRP dilué 1500 fois dans la solution de dilution. Incuber 1h à 37°C ;
8. laver 5 fois avec 300 µl de TBS 1X Tween 0,05 % ;
9. ajouter 50 µl par puits de "K-Blue substrate" (Neogen) et laisser incuber 5 minutes à l'obscurité ;
10. arrêter la réaction avec 12,5 µl d'H₂SO₄ 2N ;
11. lire l'absorbance des puits à 450 et 630 nm.

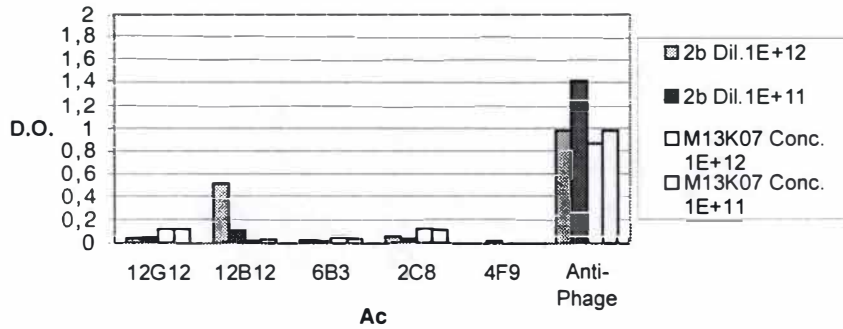
4.8. Souches utilisées

- Souche TG1 : génotype supE (remplace le codon stop ambre (UAG) par une glutamine) ; hsdΔ5 ; thi : Δ(lac-pro AB) ; F'(tra D36 ; pro AB⁺ ; lac Iq ; lac ZΔM15 (permet la sélection blanc/bleu par complémentation avec l'activité β-galactosidase en présence de X-gal dans le milieu) ;
- Souche DH11S : possède un gène de résistance à la streptomycine par mutation de la sous-unité S12 du ribosome 30S ; Le génotype de cette souche est F⁻ mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC) Δ(lac-proAB) Δ(recA1398) deoR ; supE rpsL srl thi/F' proAB⁺ lacI ZΔM15 ;
- Souche K91kan : possède un gène de résistance à la kanamycine qui est inséré dans le gène lac Z. Le génotype de cette souche est le même que celui de K91 qui dérive de la souche K38. HfrC T2R RelA1 pit-10 SpoT1 tonA22 ompF627 lambda.

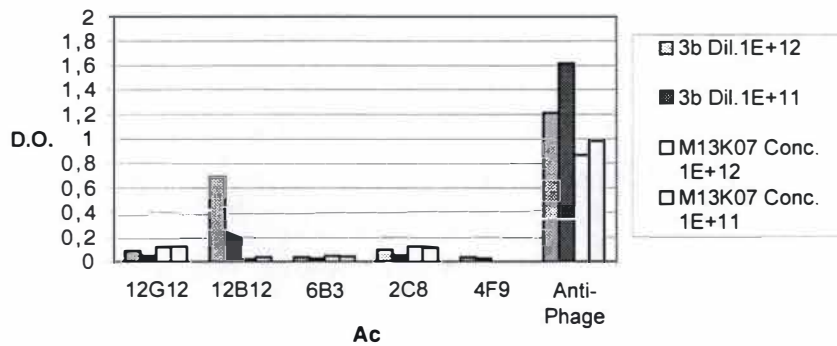
5. Annexes

Annexe 1 : Ensemble des résultats obtenus en ELISA indirect.

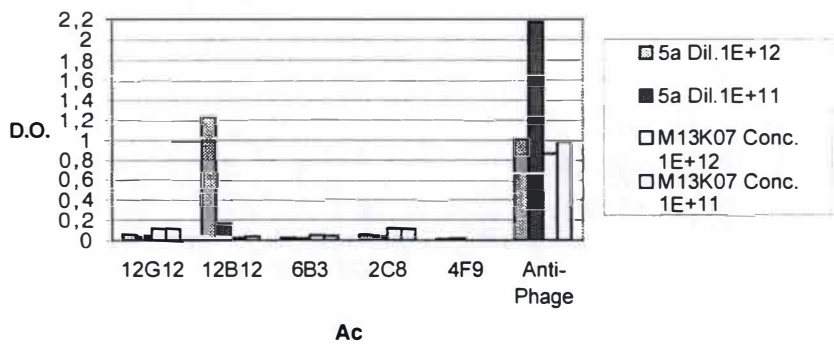
Affinité des différents Ac pour 2b



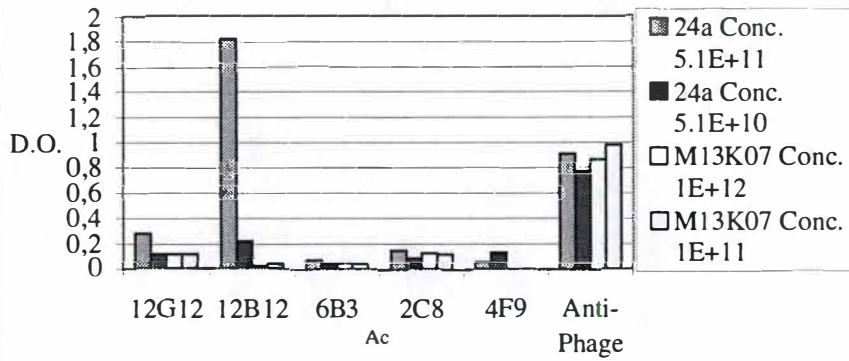
Affinité des différents Ac pour 3b



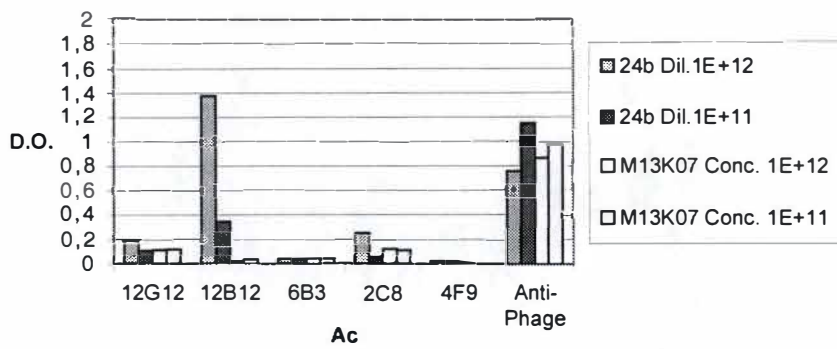
Affinité des différents Ac pour 5a



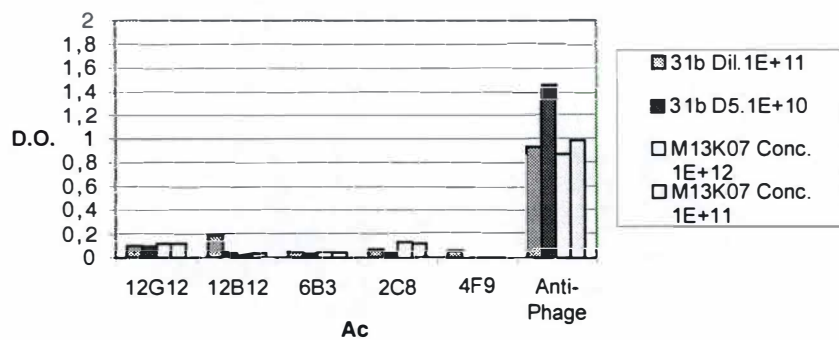
Affinité des différents Ac pour 24a



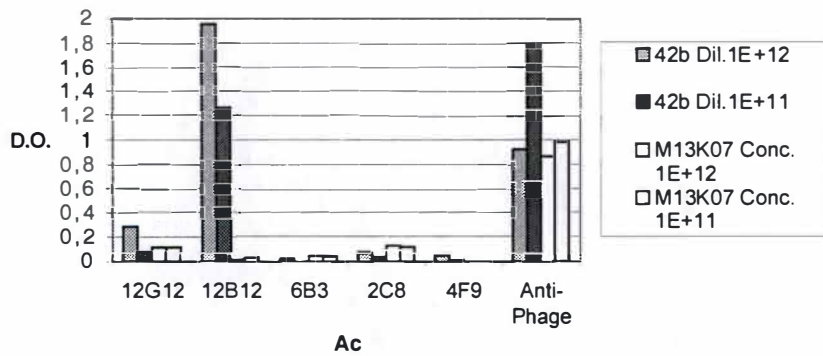
Affinité des différents Ac pour 24b



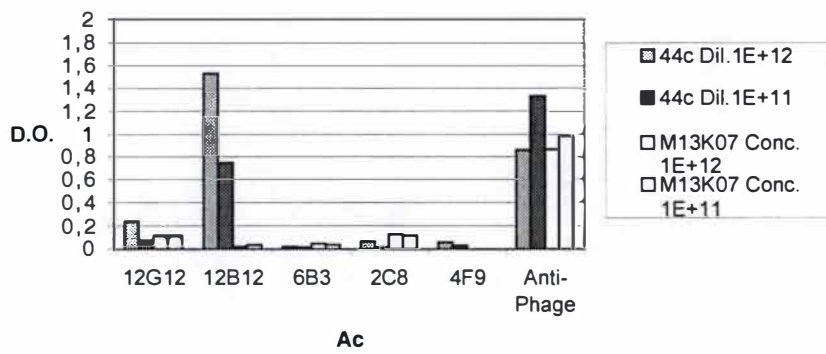
Affinité des différents Ac pour 31b



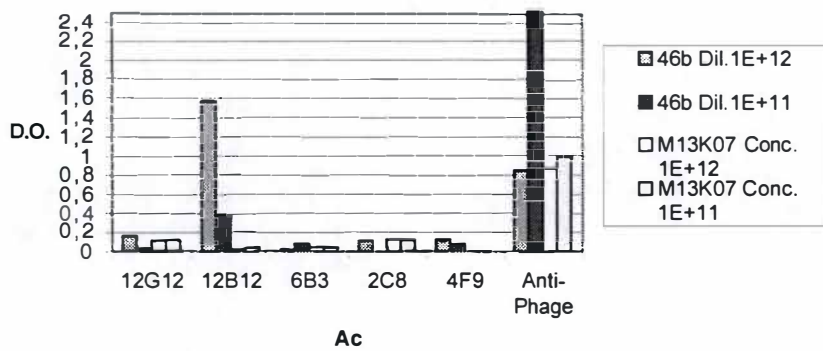
Affinité des différents Ac pour 42b



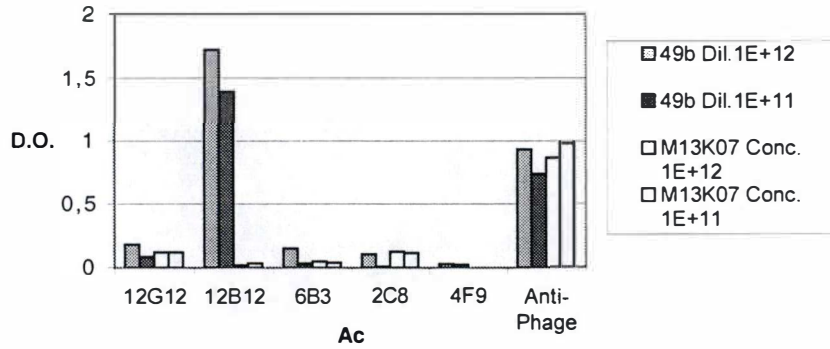
Affinité des différents Ac pour 44c



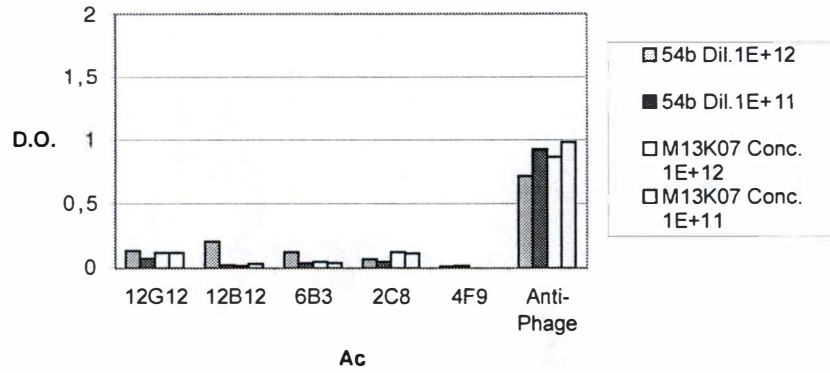
Affinité des différents Ac pour 46b



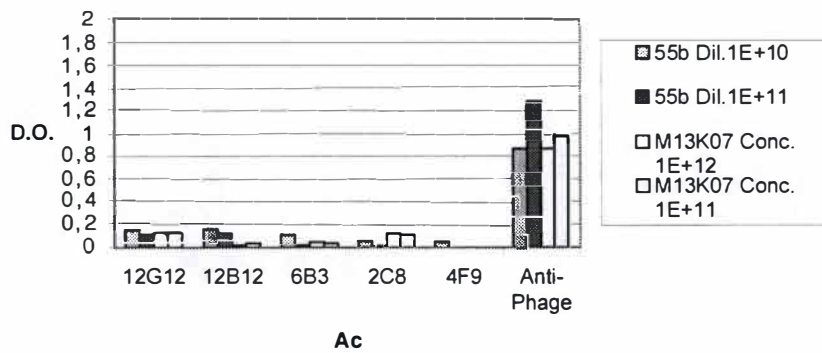
Affinité des différents Ac pour 49b



Affinité des différents Ac pour 54b

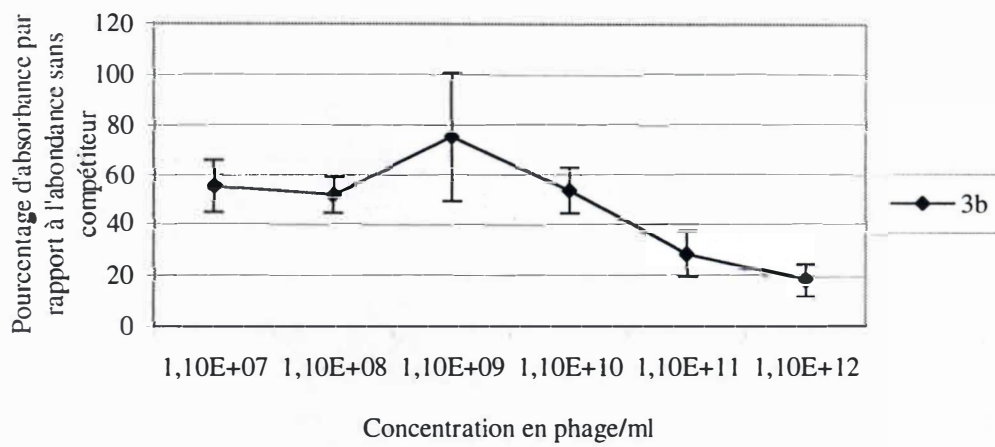


Affinité des différents Ac pour 55b

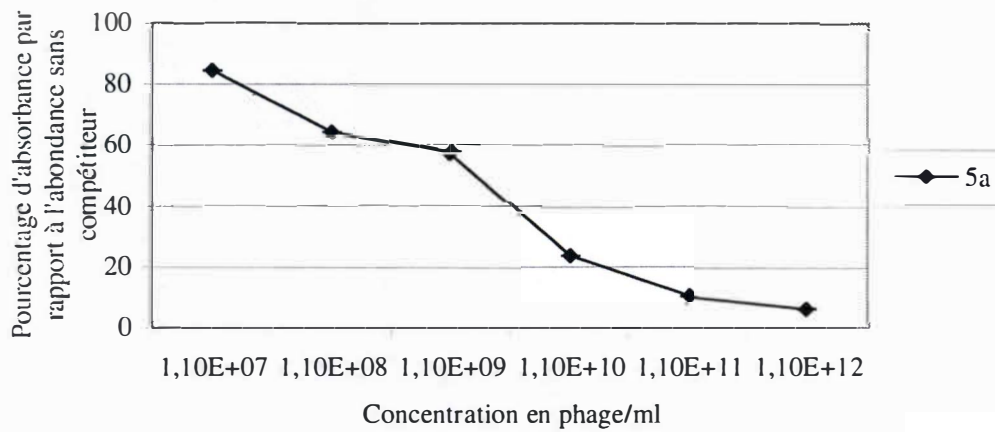


Annexe 2 : Ensemble des résultats obtenus en ELISA de compétition.

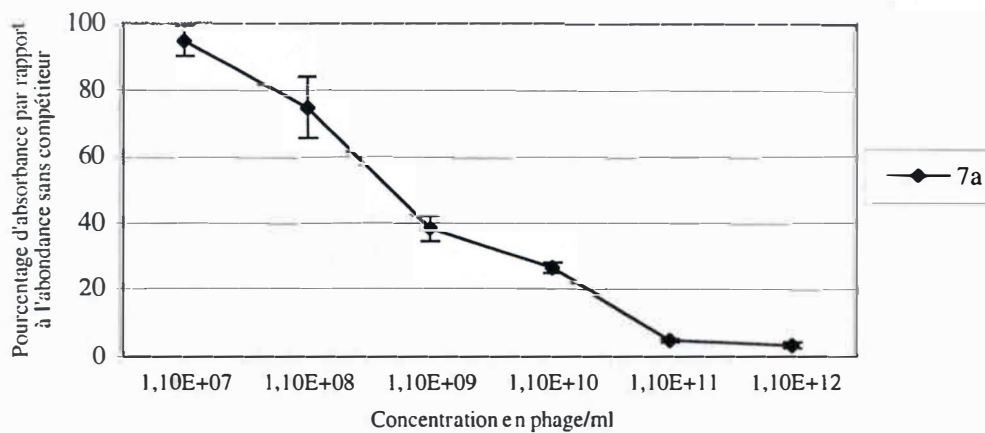
ELISA de compétition avec le peptide 3b



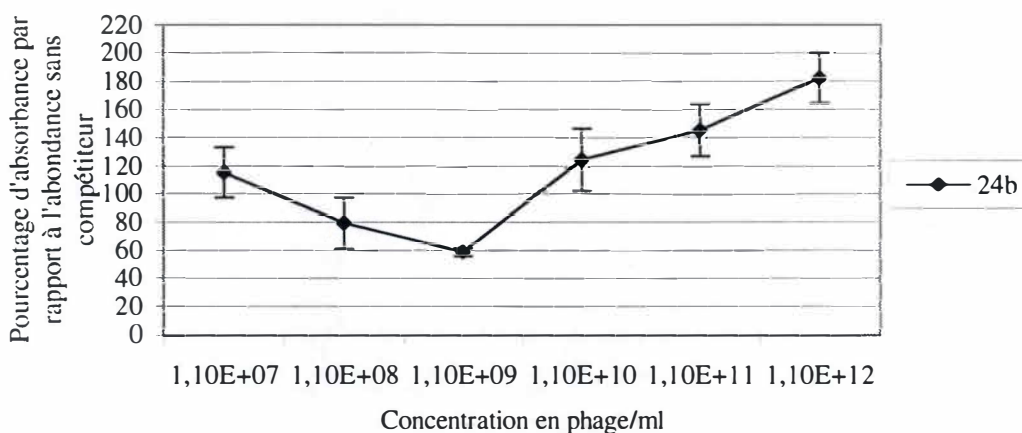
ELISA de compétition avec le peptide 5a



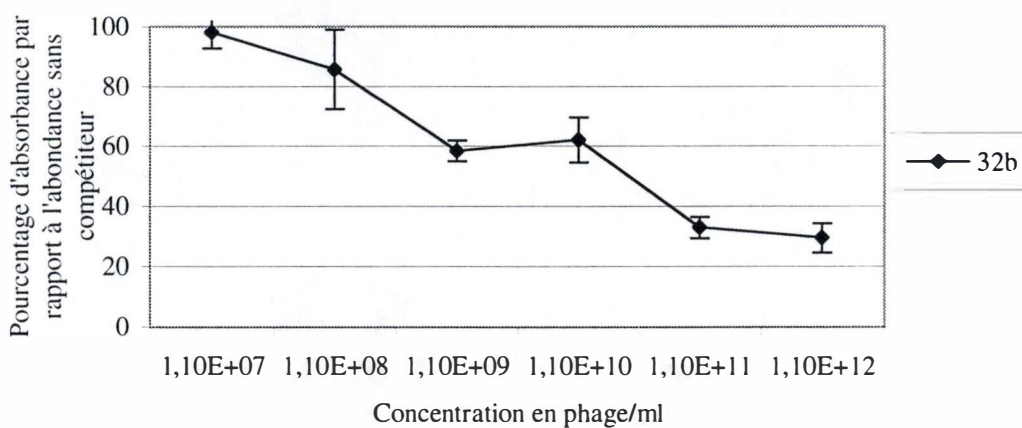
ELISA de compétition avec le peptide 7a



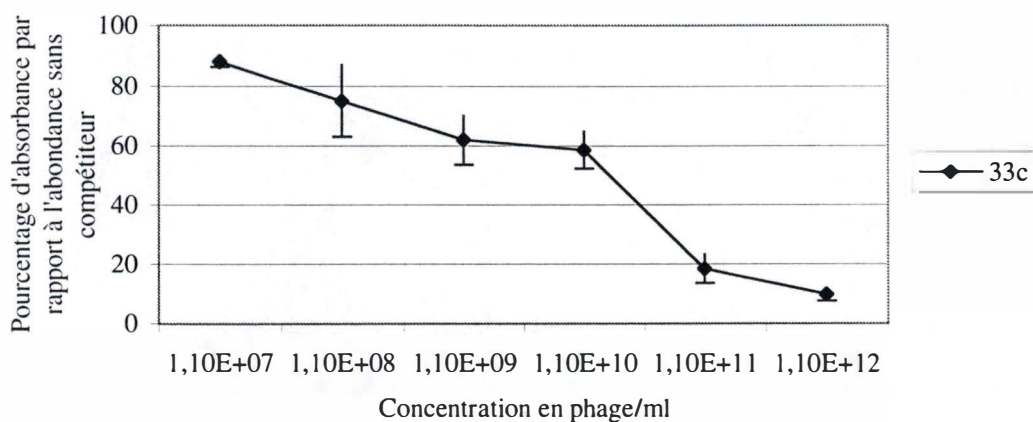
ELISA de compétition avec le peptide 24b



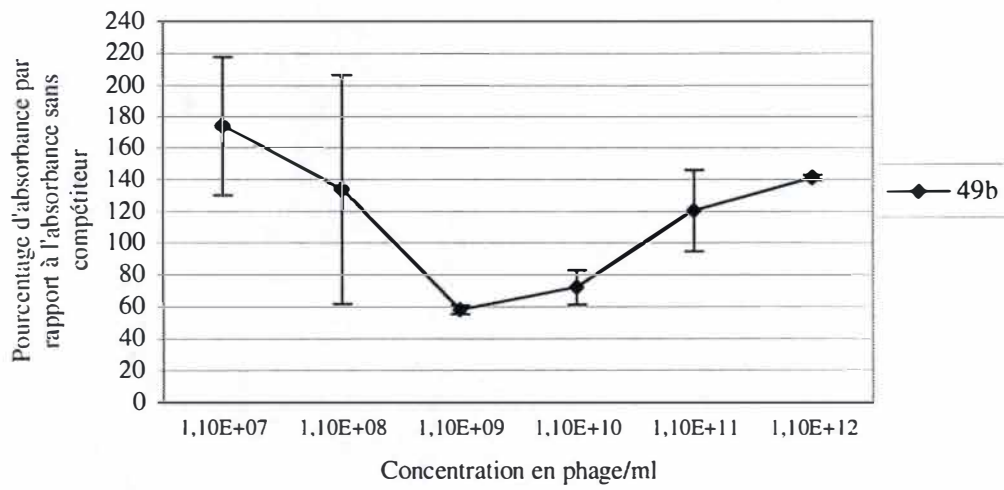
ELISA de compétition avec le peptide 32b



ELISA de compétition avec le peptide 33c



ELISA de compétition avec le peptide 49b



6. Bibliographie

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M. (1988) Techniques for the brucellosis laboratory. *Institut National de la Recherche Agronomique ,Paris*, **0**, 0-0.

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

Cesareni, G., Minenkova, O., Dente, L., Iannolo, G., Zucconi, A., Helmer Citterich, M., Lanfrancotti, A., Castagnoli, L. and Vetriani, C. (1995) Structural and functional constraints in the display of peptides on filamentous phage capsids. *de Gruyter ,Berlin*, **0**, 113-126.

Charbit, A., Boulain, J.C., Ryter, A. and Hofnung, M. (1986) Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. *Embo J*, **5**, 3029-3037.

Cherwonogrodsky, J.W. *et al.* (1990) Antigenes of *Brucella*, *CRC Press, Boston*, **1**, 19-64.

Clavareau, C., Tryland, M., Wellemans, V., Michel, P., Boelaert, F., Walravens, K., Letesson, J.J. and Godfroid, J. (1997) Isolation of *Brucella* spp. in Minke Whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *American Society for Microbiology ,NADC Virtual Congress*, **0**, 0-0.

Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S., Dubray, G. and Limet, J.N. (1993) Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J Gen Microbiol*, **139**, 1551-1556.

Corbel, M.J. (1997a) Brucellosis an overview. *Emerging Infectious Diseases*, **3**, 213-221.

Corbel, M.J. (1997b) First international conference on emerging Zoonose Jerusalem, Israel. Brucellosis: an overview. *emerging infectious diseases*, **3**.

Cull, M.G., Miller, J.F. and Schatz, P.J. (1992) Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1865-1869.

Bibliographie

De Bolle, X., *et al.*, (1999) Antigenic Properties of Peptidic Mimics for Epitopes of the Lipopolysaccharide from *Brucella*. *J. Mol. Biol.*, **294**, 181-191.

Ewalt, D.R., Payeur, J.B., Martin, B.M., Cummins, D.R. and Miller, W.G. (1998) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet diagn Invest*, **6**, 448-452.

Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappeli, R. and Cesareni, G. (1991) Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.*, **222**, 301-310.

Garin-Bastuji. (1993) Brucellose bovine, ovine et caprine : contrôle et prévention. *Le point vétérinaire*, **25 n° 152**, 107-114.

Garin-Bastuji. (1993) Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. *Le point vétérinaire*, **25 n° 152**, 115-124.

Godfroid. (1992) Le diagnostic de la brucellose bovine dans le cadre d'un programme d'éradication de la maladie. *Ann. Méd. Vét.*, **136**, 429-434.

Gordon, E.M., *et al.* (1994). Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions. *J. Med. Chem.*, **37**, 1385-1401.

Greenwood, J., Willis, A.E. and Perham, R.N. (1991) Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J. Mol. Biol.*, **220**, 821-827.

Kieber-Emmons, T. (1998) Peptide mimotopes of carbohydrate antigens. *Immunol Res*, **17**, 95-108.

Lenstra, J.A., Erkens, J.H.F., Langeveld, J.G.A., Posthumus, W.P.A., Melen, R.H., Gebauer, F., Correa, I., Enjuanes, L. and Stanley, K.K. (1992) Isolation of sequences from a random-sequence expression library that mimic viral epitopes. *J Immunol Methods*, **152**, 149-157.

Mandell G.L., D.R., Bennett JE., (1990) *Principle and practice of infectious diseases*, New York.

Bibliographie

Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. and Dower, W.J. (1994) An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9022-9026.

Needels, M.N. *et al.* (1993). Generation and screening of an oligonucleotide-encoded synthetic peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10700-10704.

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

Phalipon, A., Folgori, A., Arondel, J., Sgaramella, G., Fortugno, P., Cortese, R., Sansonetti, P.J. and Felici, F. (1997) Induction of anti-carbohydrate antibodies by phage library-selected peptide mimics. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 2620-2625.

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

Smith, G.P. (1991) Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Curr Opin Biotechnol*, **2**, 668-673.

Smith, G.P. and Scott, J.K. (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Academic Press, New York*, **0**, 228-257.

Souriau, C., Hua, T.D., Lefranc, M.P. and Weill, M. (1998) Présentation à la surface des phages filamenteux : les multiples applications du phage display. *m/s*, **14**, 300-309.

Tibor. (1999) caractérisation de trois protéines de la membrane externe de *Brucelle abortus*. . *FUNDP*.

Valadon, P., Nussbaum, G., Oh, J. and Scharff, M.D. (1998) Aspects of antigen mimicry revealed by immunization with a peptide mimetic of Cryptococcus neoformans polysaccharide. *J Exp Med*, **185**, 685-694.

Westerink, M., Giardina, P., Apicella, M. and Kieber-Emmons, T. (1995) Peptide mimicry of the meningococcal group C capsular polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4021-4025.

Weynants, V. (1998) Développement de nouveaux tests de dépistage dans le cadre de l'épidémiologie-surveillance de la brucellose bovine : applications aux réactions sérologiques faussement positives. , *Fundp*, **0**, 0-0.

Bibliographie

Weynants, V., Gilson, D., Cloeckaert, A., Denoel, P.A., Tibor, A., Thiange, P., Limet, J.N. and Letesson, J.J. (1996) 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.

Weynants V., T.A., Denoël P., Saegerman C., Godfroid J., Thiange P., Letesson J-J. (1995) Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O/9 a cause of false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic test. *Vet. Microbiol.*, **45**, 101-112.

Young, E.J. (1995) An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis*, **21**, 283-290.