



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation d'une sonde recombinante anti-alginates produite par phage display

GONZALEZ VALDESPINO, Cristina

Award date:
2005

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



**FACULTAIRES UNIVERSITAIRES NOTRE DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**CARACTERISATION D'UNE SONDE RECOMBINANTE
ANTI-ALGINATES PRODUITE PAR PHAGE DISPLAY**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié

en Sciences biologiques

Cristina GONZÁLEZ VALDESPINO

Juin 2005

Caractérisation d'une sonde recombinante anti-alginates produite par phage display

Cristina González Valdespino

Résumé

Le but de ce mémoire était de contribuer à la caractérisation d'une sonde recombinante contre des alginates. Les alginates sont des polysaccharides acides extraits d'algues brunes, importants en agroalimentaire en tant qu'agents épaississants, gélifiants, conservant, etc. Ce sont des copolymères d'acide guluronique et d'acide mannuronique. Sensible aux cations présents en solution, l'acide guluronique induit en présence de calcium une conformation tridimensionnelle dite en « egg box ».

Vu la carence en sondes spécifiques contre les alginates, il était intéressant de caractériser et d'optimiser la production d'une telle sonde existant au laboratoire, pour son utilisation en agroalimentaire, mais aussi pour l'étude des aspects physiologiques et signalétiques de ce polysaccharide.

Les anticorps recombinants isolés par criblage de banques « phage display », sont normalement produits sous deux formes différentes : sous forme de protéine de fusion exprimée en surface du phage M13, et sous forme soluble. La production de phage-anticorps a été réalisée et ceux-ci ont été caractérisés pour leur reconnaissance des alginates en présence d'ions calcium. La structure en « egg box » est bien détectée et les ions magnésium déstabilisent cette conformation comme le prévoit la théorie. Cette sonde nous a permis de différencier des lots d'alginates d'origines diverses. L'utilisation de ces sondes sous forme de phage peut toutefois poser problème en termes de bio-sécurité. De plus, leur utilisation en microscopie montre que la taille des phages-anticorps ne permet pas une localisation efficace des alginates sur des coupes de *Fucus vesiculosus*.

Si les anticorps recombinants sous forme soluble permettent la détermination et la localisation simple, précise et rapide d'un épitope, leur production peut néanmoins poser problème. Malgré de nombreux essais de culture bactérienne dans différents milieux et à différentes températures, ainsi que l'utilisation de plusieurs méthodes d'extraction et de purification, nous n'avons pu obtenir la sonde sous forme soluble. Celle-ci était produite en bonne concentration mais pas de manière active, probablement suite à un problème de repliement de la protéine sécrétée.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2005

Promoteur : P. Van Cutsem

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier le professeur P. Van Cutsem pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche en biologie moléculaire végétale. Je tiens également à remercier ma tutrice, Françoise Liners, qui m'a assistée et conseillée durant toute la réalisation de ce mémoire. Merci à Madame C. Devignon, de l'Unité interfacultaire de microscopie pour la réalisation des coupes de nos échantillons.

Je voudrais également remercier le peuple belge qui, par la chaleur de son accueil, m'a donné envie de rester dans ce pays jusqu'à la fin de mon séjour.

Je tiens également à remercier Pierre Cambier et Françoise Lonnoy, pour leur gentillesse et disponibilité. Merci aussi à mes condisciples du mémoire Aurélien, Marie-Céline et Benjamin.

A mes parents : Gracias por haberme apoyado y querido aun en la distancia, en este y todos los proyectos de mi vida, porque sois los mas importantes; No olvidarme tampoco de mi hermano, Juan, que me ha servido de ejemplo en tan duras experiencias como el aprendizaje fuera del hogar.

A mes amis Erasmus, avec lesquels nous avons partagé des moments incroyables; spécialement à Paqui (Alicante se sale), Maria Elena (tijeras) et Béo (Madrid capital), merci.

Je ne peux pas oublier mon ami spécial, mon cocoteur qui à joué un rôle important; Cho, ce paragraphe est petit mais il est pour toi.

Merci Imelda, pour m'avoir conduit à tous les endroits de l'université en évitant ma perte, surtout au début de l'année. El Pequeño Sylvain qui m'a montré les secrets de la pêche et qui a corrigé mon français en toutes occasions.

Je remercie le Kap-Sud pour m'avoir supporté au cours du deuxième semestre et avoir fait un effort pour comprendre mon français.

Merci à tous qui m'ont aidé.

ABRÉVIATIONS

CDR Complementary determining regions

EDTA ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HRP Horseradish peroxidase

IPTG isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

PBS phosphate -buffered saline

scFv single chain variable fragments

SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel

TBS «tris buffered saline»

Fab Fragment antibody binding

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION

I. 1. Les alginates	1
I.1.1 Structure chimique des alginates	1
I.1.2 Propriétés des alginates	3
I.1.3 Applications des alginates	4
I.2 Obtention, analyse et détection des alginates	5
I.2.1 Extraction des alginates	5
I.2.2 Analyse chimique des alginates	5
I.2.3 Localisation <i>in situ</i>	6
I.2.4 Immunolocalisation des alginates	7
I.2.4.1 Les anticorps (sérum et monoclonal)	7
I.2.4.2 Les anticorps recombinants	7
I.2.4.3 Les anticorps anti-alginates dans la littérature	8
I.3 Anticorps recombinants dirigés contre des alginates	10
I.3.1 Phage display	10
I.3.2.1 Les phages	11
I.3.2.2 Les banques d'anticorps sous forme de fragments scFv	12
I.3.2.3 La banque Griffin 1	13
I.3.2.4 Le promoteur lactose	13
I.3.2.5 Utilisation des souches d' <i>E. Coli</i> TGI et HB2151	14
I.3.2 Production des anticorps recombinants anti-alginates	14
I.3.2.1 Obtention des anticorps recombinants sous forme soluble	14
I.3.2.2 Le problème du repliement	15
I.4 Objectifs	17

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 Protocoles	18
II.1.1 PCR	18
II.1.2 Multiplication des phages recombinants	18
II.1.3 ELISA utilisant des phages	19
II.1.4 ELISA utilisant des ScFv solubles	20
II.1.5 Mise en culture des bactéries TGI et HB2151 recombinantes	21
II.1.6 Obtention des ScFv solubles	21
II.1.7 Purification des scFv sur colonne Ni ²⁺	24
II.1.8 Gel SDS- PAGE pour l'analyse des scFv	25
II.1.9 Western blotting et immunomarquages	26
II.1.10 Préparation et immunomarquage sur <i>Fucus vesiculosus</i>	27
II.2. Milieux	28

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III. 1 Caractérisation des phages recombinants	30
III. 1.1. Caractérisation par tests ELISA des phages recombinants.....	30
III.1.1.1 Test ELISA en présence d'ions Ca ²⁺	32
III.1.1.2 Test ELISA en présence d'ions Mg ²⁺	33
III.1.1.3 Test ELISA en présence d'EDTA.....	33
III.1.1.4 Microscopie de coupes de Fucus vesiculosus marquées aux phages-anticorps.....	35
III.2 Production des anticorps solubles	35
III.2.1 Optimisation de la production de sondes scFv	36
III.2.1.1 Production en conditions standard	36
III.2.1.2 Production à faible température.....	39
III.2.1.3 Production sous différents milieux et températures.....	41
III. 2.1.4 Production sous différents milieux, températures et concentrations d'IPTG	42

IV. CONCLUSIONS

IV.1 Phages recombinants anti-alginates	45
IV.2 Anticorps solubles anti-alginates	46

V. PERSPECTIVES

V.1 En ce qui concerne les phages anticorps	47
V.2 Dans le cas des sondes scFv produites sous forme soluble :.....	48

VI. BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie	50
---------------------	----

1. Introduction

I. 1. Les alginates

Les alginates sont des polysaccharides naturellement présents dans la paroi cellulaire des algues marines brunes (*Phaeophyceae*), dont ils représentent 40% de la matière sèche. Les algues brunes se retrouvent dans toutes les mers froides du monde et il en existe une grande diversité. Les parois des algues brunes sont majoritairement constituées de chaînes d'hétéropolysaccharides comprenant des blocs d'acide mannuronique et d'acide guluronique sous forme d'alginates. La composition des blocs dépend de l'espèce d'algue utilisée et de la partie du thalle duquel il est extrait.

(<http://www.monografias.com/trabajos12/alginato/alginato.shtml>)

Les alginates sont obtenus principalement par extraction à partir d'algues brunes dont les plus utilisées sont les laminaires, les *Fucus* et les *Macrocystis*. Chez ces algues, les alginates sont produits sous forme de sels de calcium, de magnésium, de sodium et de potassium (Boyland, 1970). Ils forment dans la paroi un complexe insoluble d'acide alginique et de sels calciques, magnésiques et de métaux alcalins en diverses proportions.

L'acide alginique a été extrait pour la première fois par Standford pendant les années 1880. Krefting fut le premier à en préparer de l'acide alginique à l'état pur et à présenter un modèle de structure des alginates (Nelson et Kretcher 1929, 1930).

I.1.1 Structure chimique des alginates

La structure fondamentale des alginates consiste en un copolymère linéaire de résidus acides β -D-mannuroniques et α -L-guluroniques (Figure 1), avec une large gamme de composition et de séquence. La structure des monomères est un tétrahydropyrane cyclique avec la possibilité de conformation en chaise (McHugh, 1988).

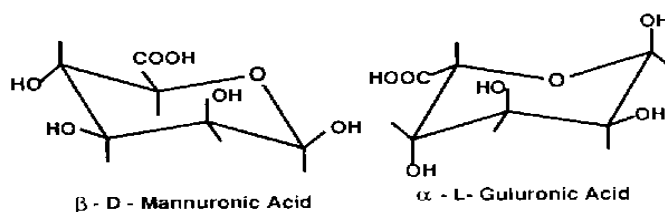


Figure 1 : Structure en chaise des monomères constitutifs des alginates (<http://www.lsbu.ac.uk/water/hvalg.html>)

Différents types de blocs existent : les blocs G, qui contiennent uniquement des unités dérivées de l'acide L-guluronique, les blocs M, formés d'acide D-mannuronique et les blocs MG, constitués des deux acides. Ceux-ci, formés des séquences MM et MG ont des

liaisons glucosidiques β (1 \rightarrow 4), tandis que les blocs constitués de GM ou GG ont des liaisons glucosidiques de type α (1 \rightarrow 4). (Figure 2)

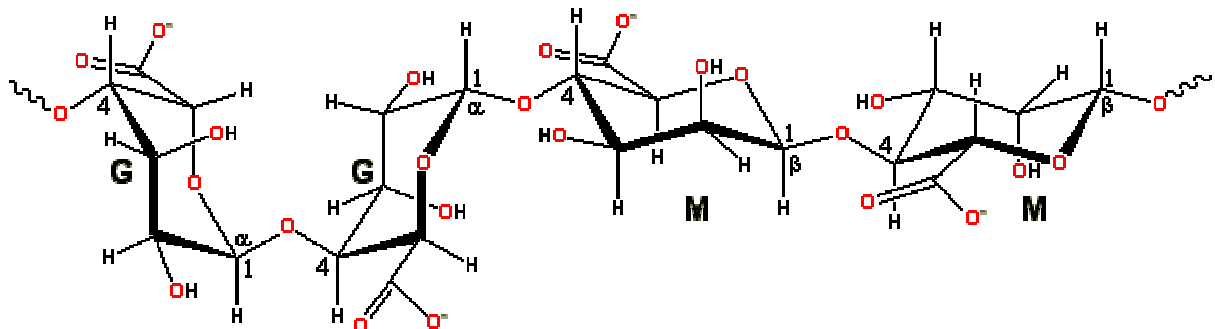


Figure 2 : Liaison entre des blocs G et GM α (1 \rightarrow 4) et entre des blocs MM et MG β (1 \rightarrow 4) (<http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>).

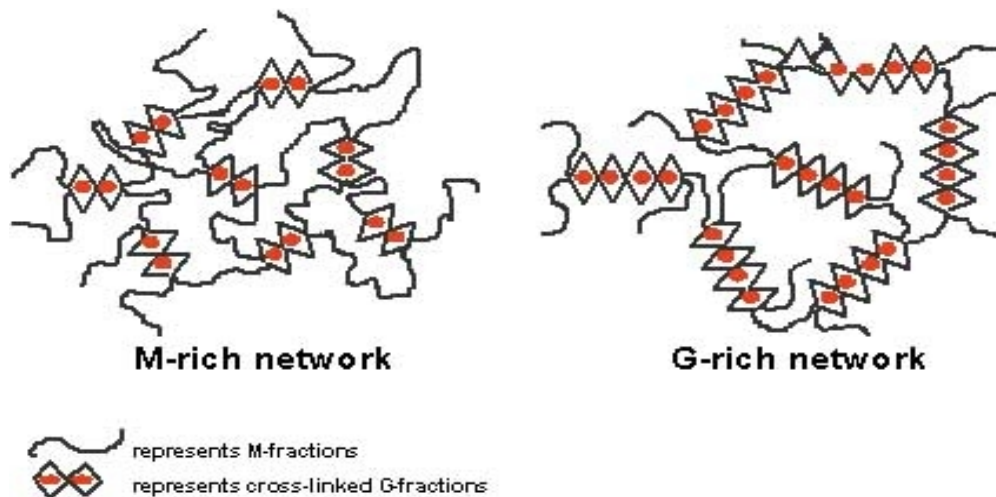


Figure 3 : Organisation des différents réseaux en fonction de leur composition (<http://www.genialab.de/inventory/alginate.html>).

Selon le pourcentage des blocs G et M, on observe des caractéristiques différentielles des gels d'alginate (Figure 3). Ce pourcentage varie en fonction du type d'algue ; par exemple l'alginate tiré de *Laminaria hyperborea* a un pourcentage élevé de segments polyguluroniques et forme des gels rigides avec une faible capacité de rétention d'eau et une tendance à la synérèse (perte d'eau). Quand deux chaînes de blocs G sont alignées, on voit apparaître une structure délimitant des cavités et appelée structure en « egg-box » (Figure 4). Cette structure a la taille idéale pour héberger des ions calcium qui peuvent ainsi dimériser des chaînes adjacentes par liaisons électrostatiques. Ce modèle a été proposé pour expliquer les propriétés gélifiantes des alginate en présence d'ions calcium (Draget *et al.*, 2000).

La production d'alginate à l'aide de cultures bactériennes de souches d'*Azotobacter vinelandii* ou de différents *Pseudomonas* a été réalisée. Ces alginates bactériens sont principalement de type polymannuronate (Chavagnat, 1996). Ils sont produits sous forme d'exopolysaccharides dans lesquels la distribution des acides uroniques est différente de celle observée chez les algues, et certains groupements hydroxyles sont acétylés, modifiant ainsi les propriétés physicochimiques de ces alginates (Shinn *et al.*, 2003).

La formation de biofilms bactériens visqueux de *P. aeruginosa* confère à celle-ci une résistance à des antibiotiques. Ces biofilms sont des polysaccharides sécrétés par *P. aeruginosa* comme agent protecteur de la cellule, et ils sont composés d'acide alginique. La conformation de l'acide alginique dépend à nouveau de la présence d'ions calcium qui provoquent un changement de structure du gel et causent une diminution de l'efficacité des antibiotiques. L'utilisation d'agents chélateurs comme l'EDTA diminue la quantité de calcium disponible pour les gels d'alginate et améliore l'effet des antibiotiques (Hiroshi, 1996).

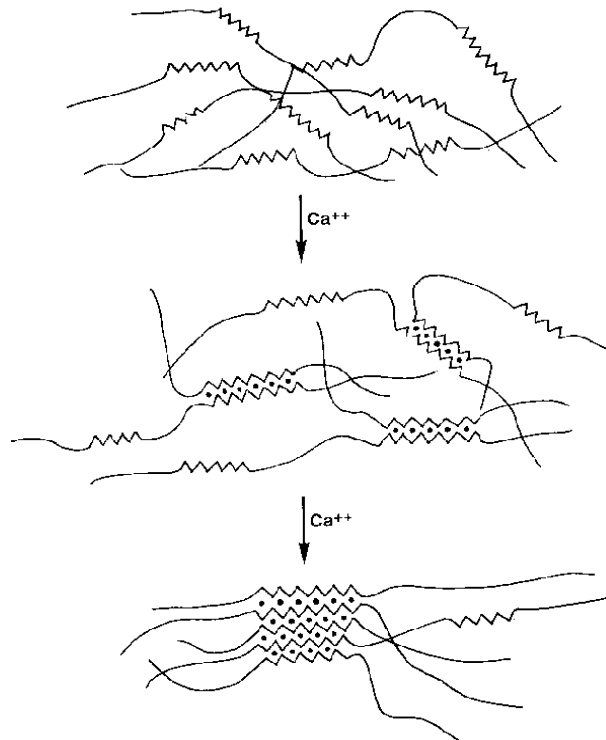


Figure 4 : Modèle egg-box en présence des ions calcium. (Dalla, 2000).

I.1.2 Propriétés des alginates

Le degré de polymérisation des alginates est une mesure du poids moléculaire moyen des molécules et correspond au nombre d'unités d'acides uroniques dans la chaîne polymérique. Si les chaînes courtes d'alginate sont plus stables, la viscosité des solutions d'alginate est directement fonction du degré de polymérisation et donc du poids moléculaire des polymères (Dalla, 2000).

En comparaison avec d'autres polysaccharides gélifiants, la propriété physico-chimique la plus frappante des alginates est leur sélectivité de fixation des cations multivalents au détriment des cations monovalents et/ou des cations plus hydratés. Ce mécanisme de fixation des cations multivalents est à la base de la formation de gels et est pour cette raison indépendant de la température : en présence d'ions calcium, une transition sol-gel a lieu.

La grande variabilité de composition des alginates se reflète dans leur capacité de rétention d'eau (propriétés d'hydrocolloïde). Cette rétention d'eau, due à leur géométrie moléculaire, confère aux alginates diverses propriétés de gélification, de viscosité et de stabilité (Draget *et al.*, 2000).

La solubilité des alginates dans l'eau est fonction du pH, celui-ci déterminant la présence de charges anioniques sur les résidus uroniques. La précipitation des acides alginiques se fait dans une gamme de pH relativement étroite, fonction non seulement de leur composition chimique brute, mais aussi de leur séquence : les alginates qui ont plus de blocs alternés (MG) précipitent à des pH plus faibles que les autres. Les blocs d'hétéropolymères semblent avoir moins de risque de précipiter, vu que la formation de structures cristallines est inversement proportionnelle au degré de désordre.

La dégradation des alginates est minimale à pH neutre et devient maximale à mesure que l'on s'écarte de la neutralité. En ce qui concerne ses propriétés biologiques, l'acide guluronique a la même fonction structurelle chez les algues brunes que l'acide galacturonique chez les plantes supérieures : tous deux forment des liaisons coordonnées aux ions de calcium (Kohn, 1975). Les chaînes polyanioniques peuvent ainsi se lier par pont calcium et former un gel. Cette gélification est réversible et peut reformer une structure plus fluide si le calcium est éliminé, ce qui peut se faire en présence d'EDTA, un agent chélateur d'ions bivalents, ou à pH faible. Une forte concentration en protons provoque en effet le déplacement du calcium des sites d'échange anioniques des alginates (Liners *et al.*, 1989).

I.1.3 Applications des alginates

Les alginates étiquetés E 400 à E 405 dans les produits alimentaires, s'obtiennent à partir de diverses sortes d'algues brunes. Grâce à leurs caractéristiques gélifiantes et épaississantes, les alginates sont très souvent utilisés en agroalimentaire comme épaississants et stabilisants, entre autres dans des sauces et des crèmes. Dans la bière, ils sont utilisés pour stabiliser la mousse en formant des gels. On les trouve aussi dans des gélatines et dans la nourriture pour animaux (Dalla, 2000).

Les alginates font partie des agents stabilisants utilisés en glacerie pour diminuer ou retarder la cristallisation et abaisser le point de fusion des glaces. Ils y sont utilisés comme stabilisateurs seuls ou en mélange avec d'autres matières stabilisantes. En pâtisserie, ils sont autorisés dans les crèmes, desserts, décors, nappages et fourrages de pâtisserie, biscuiterie (Decraye, 2002).

Il s'avère que les alginates de sodium ont une activité antivirale contre le virus de la mosaïque du tabac en inhibant l'adsorption du virus sur la surface cellulaire. C'est la charge anionique des alginates qui interagit avec les groupes cationiques de la capsid du virus (Sano, 1999). Le degré d'inhibition de l'infection est par ailleurs en relation directe avec le rapport M/G, plus élevée pour des chaînes d'acide guluronique que pour des chaînes d'acide mannuronique.

En médecine et pharmacie, les alginates sont utilisés pour leurs caractéristiques épaississantes, pour leur vitesse d'hydratation et pour la confection de films permettant la cicatrisation de blessures (Shinn *et al.*, 2003).

Enfin les alginates sont utilisés industriellement pour l'immobilisation d'enzymes et pour l'impression sur tissus ou papier.

I.2 Obtention, analyse et détection des alginates

I.2.1 Extraction des alginates

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilité dans l'eau de l'acide alginique et de ses sels : les alginates de sodium et de potassium sont solubles, tandis que l'acide alginique tout comme son sel de calcium sont pratiquement insolubles. Plus de vingt étapes sont nécessaires pour arriver à purifier des alginates de haute qualité (Boyland *et al.*, 1970).

Prétraitement : l'algue subit un lavage à grande eau, suivi d'un rinçage à l'eau distillée. Cette opération débarrasse l'algue des impuretés telles que sable, sels, coquillages, algues parasites Elle est séchée à l'étuve à 50°C, puis broyée finement. Elle est ensuite traitée par une solution d'acide dilué, afin d'éliminer les sucres solubles localisés à la surface des algues.

L'extraction des alginates de sodium est basée sur leur solubilité. Ayant un caractère polyanionique marqué, l'acide alginique, insoluble dans l'eau, peut former des sels de potassium ou de magnésium solubles. L'extraction se fait ainsi en milieu alcalin dilué (NaHCO_3), ce qui libère facilement les alginates sous forme de sel de sodium, tout en hydrolysant leurs liaisons avec les protéines.

La récupération des alginates : l'extrait obtenu est filtré et les alginates sont récupérés par précipitation. A cet effet, plusieurs méthodes sont utilisées :

- Précipitation par l'ion calcium : par réaction spécifique des alginates et acide alginique, l'alginate de Ca^{2+} précipite lors de l'addition d'une solution de CaCl_2
- Précipitation à l'éthanol : classique, elle suffit pour récupérer les alginates. L'éthanol permet en fait de précipiter tous les polysaccharides.

I.2.2 Analyse chimique des alginates

Après isolement, les méthodes colorimétriques peuvent être appliquées aux alginates pour quantifier les acides D-mannuroniques (M) et L-guluroniques (G) (Draget, 2002). Les polyuronides traités par un acide minéral fort ou par le chlorure de zinc à chaud subissent une décarboxylation. Le CO_2 produit est précipité sous forme de BaCO_3 par l'hydroxyde de baryum Ba(OH)_2 et l'excès de Ba(OH)_2 est dosé en retour. Cette méthode ne permet toutefois pas de distinguer les mannuronates des guluronates.

La méthode la plus utilisée est la méthode au phénol / acide sulfurique. On utilise aussi la réduction du groupe carboxyle en méthylène par le borodéutérure de sodium, suivie d'une analyse en GC-MS (Li *et al.*, 1999).

La RMN du proton permet quant à elle d'établir la structure des alginates, d'étudier la géométrie des molécules en solution et la dynamique de leurs mouvements. Avec cette méthode, Larsen (1985) a caractérisé des algues de la mer rouge, dont la composition en blocs G et M des alginates.

Une analyse par RMN du C^{13} a démontré que les alginates de sodium de *Colpomenia peregrina* ont un rapport M/G de 0,48. La RMN du C^{13} est ainsi capable d'apporter une information sur les différentes liaisons du polymère saccharidique (Usov *et al.*, 2004).

Diverses méthodes chromatographiques existent :

- Chromatographie sur papier (CP) : sur papier Wattman n° 3, les échantillons sont entraînés par un système de solvant (Py / AcOEt / AcOH / H₂O – 5 / 5 / 1 / 3). La révélation se fait grâce à un réactif à l'oxalate d'aniline
- Chromatographie sur couche mince (CCM): Silicagel 60 – Le système de solvant comprend : Isopropanol / Etilacetate (AcOEt) / H₂O (6/3/1) et la révélation se fait avec du naphthorésorcinol à 0,2% dans EtOH. Le silicagel nous permet de faire une séparation plus fine par rapport à la chromatographie sur papier
- Des alginates ont été analysés par HPLC sur une colonne CarboPac PA 100 au laboratoire. Cette colonne contient une résine de polystyrène-divinylbenzène contenant des groupements sulfates (SO₃⁻) sur lesquels sont greffés des groupements amines (RN₃⁺). À pH 7, les alginates chargés négativement se fixent à la résine. Ils sont ensuite élués au moyen d'un gradient de NaOAc (de 5mM à 1M). Les alginates de degrés de polymérisation faibles, les moins chargés, sont élués les premiers. En sortie de la colonne, les groupements hydroxyles de l'acide guluronique sont ionisés dans une solution de NaOH (0,5M). La détection de ces molécules chargées est réalisée au moyen d'un détecteur à ampérométrie pulsée (Dionex)
- La chromatographie d'exclusion de taille (SEC) combinée avec un détecteur à diffraction de lumière (light scattering) et un détecteur de viscosité, est très souvent utilisée dans l'étude des propriétés des molécules en solution. (Christiansen, 2002)
- Les techniques séparatives (chromatographies liquide et gazeuse), l'absorption atomique ainsi que les techniques non invasives (spectrométries d'absorption [UV-visible, IR, RMN du solide], d'émission de fluorescence et de diffusion Raman, de masse) sont applicables aux alginates de sodium et de magnésium. (Steinbüchel *et al.*, 2002).

I.2.3 Localisation *in situ*

Pour l'analyse *in situ* d'échantillons, les microspectrométries optiques confocales (fluorescence et Raman) offrent une résolution spatiale fine, de l'ordre du micromètre. Ces méthodes nouvelles permettent l'analyse sélective et spécifique de molécules d'intérêt biologique pouvant atteindre l'échelle cellulaire (Dubois, 2002).

Les méthodes de localisation et de détection des alginates sont toutefois lourdes et requièrent souvent une extraction et une purification préalables. Les anticorps, qu'ils soient recombinants ou non, contre des alginates constituent dans ce cadre une alternative séduisante, vu leur simplicité d'utilisation, une fois les sondes produites et caractérisées.

I.2.4 Immunolocalisation des alginates

I.2.4.1 Les anticorps (sérum et monoclonal)

Pour rappel, les **anticorps polyclonaux** sont produits par plusieurs clones de lymphocytes B. Les lymphocytes B ne sont capables de synthétiser qu'un seul anticorps. Le choix de cet anticorps est déterminé par des réarrangements chromosomiques effectués au hasard pendant l'hématopoïèse. Quand un lymphocyte B reconnaît l'antigène qui correspond à son anticorps, il se divise et les cellules filles vont se différencier en plasmocytes qui synthétisent l'anticorps. Les cellules filles qui résultent de la division d'un seul lymphocyte B sont appelées des clones.

La technique polyclonale présente un certain nombre d'inconvénients bien connus : le sérum contient des anticorps dirigés contre la protéine à reconnaître, mais aussi d'autres anticorps qui peuvent entraîner un bruit de fond du marquage. Par ailleurs, le type exact des anticorps produits par un lymphocyte est le fruit du hasard. D'un animal à l'autre, les anticorps résultant d'un même protocole d'immunisation peuvent montrer des différences et les résultats n'être que partiellement reproductibles. Il n'est pas rare que la mort de l'animal entraîne la disparition d'un anticorps polyclonal très efficace dont aucun équivalent ne pourra être retrouvé plus tard.

Les **anticorps monoclonaux** permettent de pallier les inconvénients des anticorps polyclonaux. Ils sont en effet fabriqués par un seul clone de lymphocyte B, et donc ils sont tous identiques et reconnaissent un seul épitope. Dès lors, ils gagnent en précision ce qu'ils perdent en sensibilité.

La première étape d'obtention d'anticorps monoclonaux est la production d'un sérum polyclonal. Ce sérum obtenu, on récupère les plasmocytes, dont certains sont présents dans le sérum avec les cellules sanguines, et on les met en culture. On les immortalise en les fusionnant avec des cellules de myélome pour obtenir des hybridomes producteurs d'anticorps. On procède ensuite au criblage des hybridomes afin d'isoler progressivement un clone producteur d'un anticorps spécifique contre la molécule de criblage, même si au départ le sérum reconnaît plusieurs protéines. L'anticorps produit va précisément permettre par après de purifier la protéine.

Les anticorps monoclonaux sont à la fois une réussite technique remarquable et l'un des plus beaux ratés financiers de l'histoire de la biologie. Aujourd'hui toutefois, la fabrication des anticorps monoclonaux est une des entreprises de biotechnologie les plus rentables, avec un marché de plusieurs centaines de milliards de dollars.

I.2.4.2 Les anticorps recombinants

Les anticorps, avec leur degré élevé de spécificité et leur capacité à se fixer sur toute une gamme de molécules cibles, connaissent des applications importantes, surtout dans le biomédical, mais aussi en sécurité alimentaire, biotechnologie végétale, détection des contaminants de l'environnement, etc. (Reina, 2003).

La rareté des sondes dirigées contre des alginates, et leur utilité comme méthode de détection simple, a inspiré notre démarche dans le cadre de ce mémoire : notre but est de contribuer à la

mise à disposition de telles sondes. Elles constitueraient en effet un outil très simple à utiliser pour la localisation des alginates, aussi bien dans la paroi des algues qu'en agroalimentaire.

I.2.4.3 Les anticorps anti-alginates dans la littérature

Quelques sondes dirigées contre des alginates ont déjà été décrites dans la littérature.

Un antisérum anti-alginates très sensible aux cellules de la paroi cellulaire a été obtenu contre des alginates, mais avec une reconnaissance non spécifique des différentes épitopes des alginates (Chi, 1999)

Valérie Vreeland a effectué de nombreux travaux sur des anticorps anti-alginates. En 1969, elle décrit des sérums contre des alginates, mais ceux-ci s'avèrent non spécifiques, donc inefficaces.

En 1971, des essais sur des sérums anti-alginates couplés à une peroxydase marquée en fluorescence ont été menés. Ils montrent des différences de marquage dues à une solubilité différentielle des alginates, qui peuvent parfois former des agrégats (Vreeland, 1971).

En 1984, Vreeland, à nouveau, tente de générer des sondes monoclonales anti-alginates couplées à un fluorochrome, et elle parvient à détecter des alginates. Ces sondes souffrent cependant d'une réactivité croisée avec d'autres molécules de la paroi cellulaire.

En 1985, elle utilise des anticorps monoclonaux en présence d'ions calcium ou d'EDTA, et elle confirme l'affinité de ses sondes pour des séquences de polyguluronate. (Vreeland, 1985).

En 1988, Valérie Vreeland toujours, effectue un travail avec des anticorps monoclonaux anti-alginates et du calcofluor white, mais l'incubation des anticorps pose problème au niveau de la reconnaissance des antigènes.

I.3 Anticorps recombinants dirigés contre des algines

I.3.1 Phage display

La technique. Depuis que Smith a publié son premier article sur le phage display, le concept a été modifié et adapté. La technique du phage display permet d'exprimer à la surface d'un phage une protéine ou un peptide étranger. Pour obtenir ce résultat, il est nécessaire de fusionner le gène qui code pour cette protéine au gène qui code pour la protéine de la capsid du phage. Lorsqu'il y a assemblage des particules de la capsid, la protéine d'intérêt est physiquement liée à celle-ci (Smith, 1976; Willats et al. 2000).

Une procédure appelée « panning » permet de sélectionner dans une large collection de phages, certains qui sont porteurs de peptides déterminés : dans un micropuits où l'on fixe l'antigène d'intérêt, on incube la collection en question et des lavages successifs éliminent les phages qui présentent à leur surface des protéines qui n'interagissent pas avec l'antigène. Après amplification et enrichissement, on peut obtenir des clones individuels alors caractérisés par séquençage et par des tests ELISA (Pung, 2005).

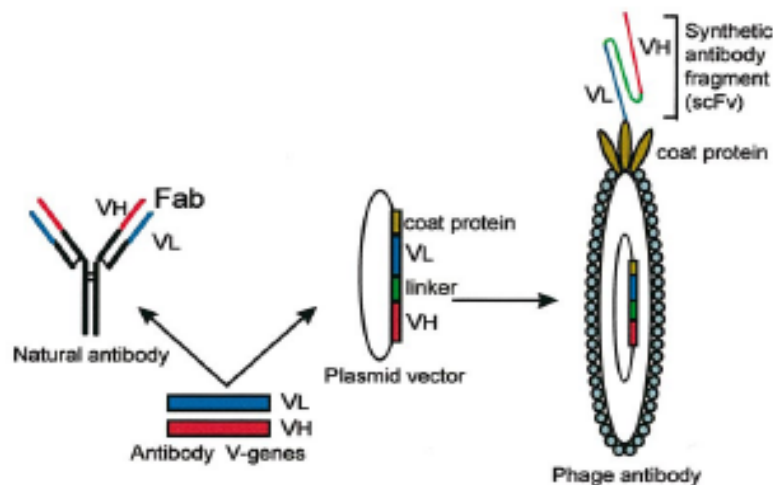


Figure 5 : Représentation schématique des principes de la technologie phage display. Gènes codant pour les régions variables de la chaîne lourde V_H et légère (V_L). Chaînes réarrangées et fusionnées avec les gènes codants pour les protéines de la capsid du phage (Willats, 1999).

Les banques de phages recombinants et la technique du phage display sont aujourd'hui des outils essentiels pour l'identification et la caractérisation de molécules qui lient une cible spécifique. La technique du phage display permet la construction et le criblage rapide de banques de ligands comme des peptides ou des fragments d'anticorps. Dans les banques d'anticorps recombinants, les phages expriment à leur surface un fragment scFv d'anticorps, normalement monoclonal (Winter *et al.*, 1994 ; Willats, 2004).

I.3.1.1 Avantages et inconvénients du phage display

Le phénotype du phage est directement lié à son génotype ; cet accès direct à la séquence du phage permet éventuellement d'augmenter l'affinité des anticorps pour leur épitope par mutation dirigée ou aléatoire dans les séquences des CDR (Willats, 2002). Mais surtout, les clones intéressants une fois isolés peuvent être produits massivement et à faible coût, sans équipement spécial.

Travailler avec des phages n'est toutefois pas toujours facile d'un point de vue pratique : les phages sont physiquement très résistants et posent donc problème en termes de biosécurité. Par ailleurs, la taille des phages interdit leur utilisation comme sondes dans les techniques de localisation microscopique (Willats, 2002). Celle-ci n'est possible que si des fragments scFv solubles peuvent être produits. Dans notre cas l'absence de site de clivage enzymatique entre le fragment scFv et la protéine de capsid impose toutefois des contraintes particulières pour la production de sondes libres, comme nous le verrons plus loin.

I.3.2.1 Les phages

Le phage M13 classiquement utilisé en phage display est un phage filamenteux appartenant à la famille des *Ioviridae*. Il possède un ADN simple brin circulaire et d'une taille de 6kb. Son aspect est celui d'un filament flexible, sa longueur moyenne est d'un μm et son diamètre est de 6 nm. Il rentre dans les cellules par les pili sexuels. Quand l'ADN a pénétré la bactérie, il passe en double brin, puis commence à se répliquer comme un plasmide mais la réplication devient continue sur un seul brin (« rolling circle »).

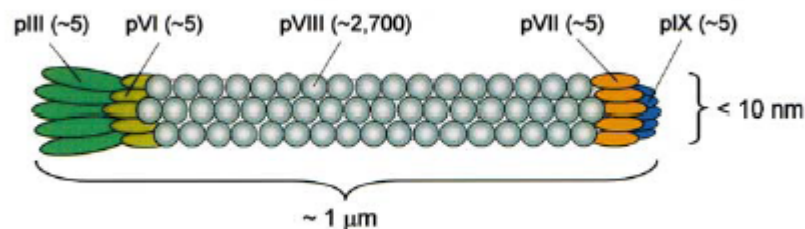


Figure 6 : Schéma du phage M13 (Willats 2002).

Le phage M13 est à la base d'un système de clonage étudié pour permettre des modifications à l'intérieur du génome du phage. Le génome code pour un total de 10 gènes dont le gène VIII code pour la protéine structurale majeure de la capsid et le gène III code pour la protéine mineure pIII de cette capsid, protéine située à la fin du phage et nécessaire pour l'étape d'infection (Sidhu, 2001).

I.3.2.2 Les banques d'anticorps sous forme de fragments scFv

Ils constituent un outil d'importance pour vérifier les différentes affinités soit entre protéines soit entre protéines et antigènes. Les fragments scFv sont formés par les domaines variables d'un anticorps (V_H et V_L). Les chaînes V_H et V_L qui les composent viennent du réarrangement naturel de plusieurs gènes, et constituent la partie spécifique la plus petite des anticorps qui permet la reconnaissance des antigènes. Ces deux chaînes sont liées grâce à un peptide artificiel ($\text{glyc}_4 - \text{ser}_3$). Les gènes variables de la chaîne lourde V_H proviennent de l'arrangement naturel de plusieurs gènes, dans ce cas des segments nommés V, D et J ; alors que les gènes variables des chaînes légères κ et λ V_L sont le résultat du réarrangement des segments V et J.

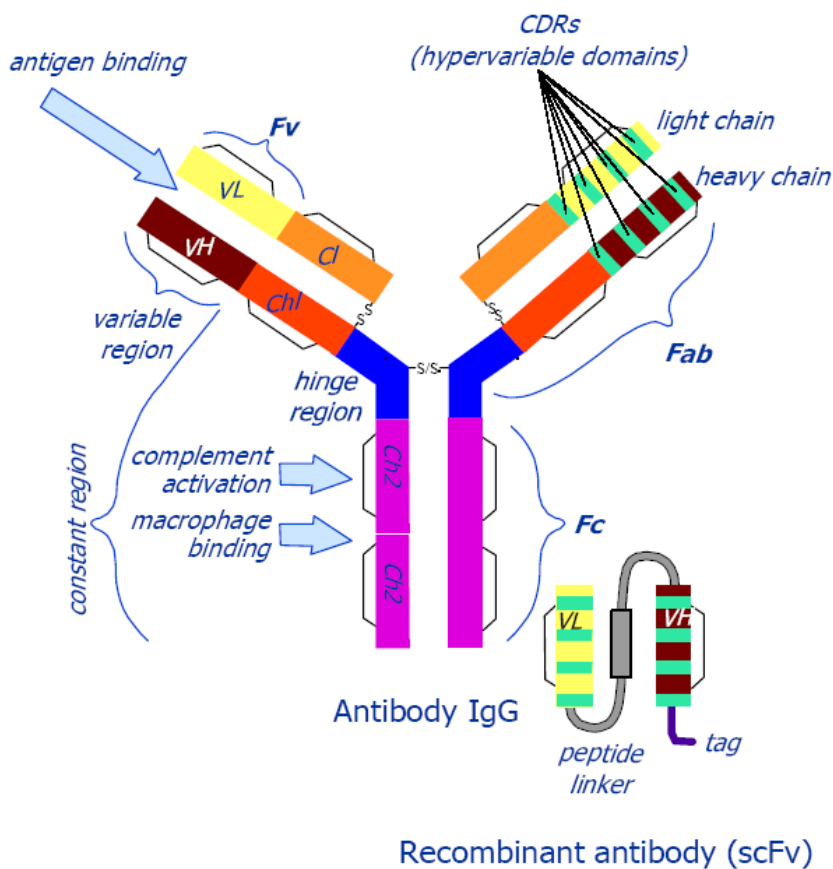


Figure 7 : Schéma d'un anticorps Ig G et d'un anticorps recombinant. (Dübel et Breitlig, 1999)

I.3.2.3 La banque Griffin 1

La banque Griffin.1 a été construite en combinant les portions codant pour les régions variables des immunoglobulines humaines dont les gènes ont été clonés antérieurement. Les différentes chaînes légères (kappa et lambda) ont été clonées par la suite dans le vecteur accepteur fdDOG2loxV_kDel comprenant le gène de résistance à la tétracycline. Le répertoire des chaînes lourdes a été cloné dans le vecteur donneur pUC19-2loxV_HDel comprenant un gène de résistance à l'ampicilline. Les répertoires des chaînes lourdes et légères ont été combinés en infectant une souche de *E. coli* ayant le vecteur donneur avec des phages fd ayant le vecteur accepteur. Pour la création de la banque Griffin.1, les portions VH-VL du répertoire Fab ont été clonées dans le vecteur phen2 pour la production des scFvs (Dübel, 1999).

Ce vecteur phen2 utilisé dans la banque Griffin.1 est un phagemide, soit un vecteur comprenant une origine de répllication bactérienne, une origine de répllication du phage (M13ori), un opéron lactose et un gène de résistance à l'ampicilline. Les portions VH-VL y ont été clonées de part et d'autre de la séquence codant pour un lien peptidique artificiel afin de créer les scFv. Un codon ambre a été inséré entre la séquence codant pour la protéine g3p et celle codant pour les scFv (Willats 2000).

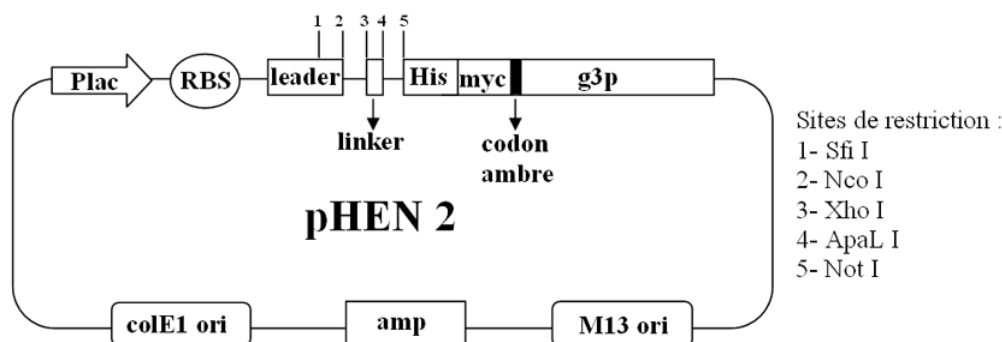


Figure 7 : Représentation schématique du phagemide pHen2 utilisé pour le clonage des gènes scFv (<http://www.theses.ulaval.ca/2003/21058/ch02.html>). Ori colE1 : origine de répllication bactérienne ; Ori M13 : origine de répllication du phage M13 ; amp : marqueur de sélection, résistance ampicilline ; Plac : promoteur lactose ; RBS : site de liaison des ribosomes. (Dübel et Breitling, 1999)

I.3.2.4 Le promoteur lactose

Le promoteur lac de l'opéron lactose constitue le meilleur système de régulation et le plus connu en bactérie. L'opéron lactose assure la présence des enzymes de dégradation du lactose uniquement quand il y a du lactose présent dans le milieu. Sans lactose, les gènes de ces enzymes sont réprimés par un répresseur, une protéine LacI codée par un gène extérieur à l'opéron. LacI se lie à une région de l'ADN proche du promoteur qui empêche la progression de l'ARN polymérase. En présence de lactose dans le milieu, le sucre se lie au répresseur LacI, changeant ainsi sa conformation. Ceci lui fait perdre son affinité pour l'opérateur, permettant ainsi la transcription du promoteur. Le lactose ou un analogue chimique comme l'IPTG sont utilisés comme inducteurs

L'IPTG présente plusieurs avantages, comme le fait que sa diffusion passive au travers de la membrane est facile et qu'il n'est pas clivé par la β -galactosidase (Schumman, 2004).

Il existe un autre mécanisme de régulation appelé répression catabolique. Ce n'est que lorsque la concentration en glucose diminue que le métabolisme du lactose devient nécessaire. En présence de lactose et de glucose, le glucose est utilisé préférentiellement au lactose et le niveau de transcription de l'opéron lactose est très faible (Borde, 2002).

I.3.2.5 Utilisation des souches d'*E. Coli* TGI et HB2151

Nous avons vu que les vecteurs phen2 ont, entre la séquence du gène codant pour leur fragment d'anticorps scFv et la séquence codant pour une protéine PIII du phage, un codon stop ambre (TAG). La souche d'*E. coli* appelée TGI, souche dite suppressive, ne reconnaît pas ce codon stop ambre et permet ainsi d'obtenir les molécules d'intérêt fusionnées à l'extrémité N-terminale de PIII, elle-même fixée à la surface des phages.

Une autre souche d'*E. coli* appelée HB2151, est dite non suppressive car elle reconnaît le codon stop ambre comme un signal d'arrêt de traduction : les protéines sont alors théoriquement produites dans le milieu sous forme soluble (Willats, 2002).

Il y a donc deux manières différentes de produire un anticorps recombinant : sous forme de scFv soluble, ou alors fusionné à PIII en surface de phage. La sonde préférée est bien sûr l'anticorps libre, mais un obstacle non négligeable doit encore être franchi pour y arriver : celui que constitue le repliement correct de la protéine lors de sa synthèse.

I.3.2 Production des anticorps recombinants anti-alginates

I.3.2.1 Obtention des anticorps recombinants sous forme soluble

On l'a compris, cette approche par sonde recombinante phage display constitue une alternative puissante aux méthodes physico-chimiques de détection et de localisation des alginates et aux limitations rencontrées lors des essais de production de sérums et de monoclonaux. Mais si elle offre l'avantage de la simplicité et de la rapidité d'utilisation, elle se heurte aux problèmes de production des fragments scFv sous forme soluble.

Pour une telle production, on utilise la souche *E. coli* HB2151 qui possède la machinerie nécessaire à la synthèse de peptides solubles. On peut distinguer différentes étapes dans le processus d'obtention de sondes recombinantes solubles :

- Tout d'abord la mise en culture des bactéries en présence de glucose et d'ampicilline
- Quand les bactéries sont en phase de croissance exponentielle, on lève le blocage de l'opéron Lac en éliminant le glucose et en ajoutant de l'IPTG
- On purifie la protéine (Dietrich, 2003).
- Les protéines produites peuvent aboutir à différents endroits de la cellule :

dans le cytoplasme : dans ce cas, les protéines synthétisées au niveau du cytoplasme pourront souffrir de problèmes associés à l'environnement réducteur. Les liaisons entre les cystéines de l'anticorps sont des ponts disulfures qui nécessitent un milieu oxydant pour se former et conférer une conformation adéquate à la protéine (Figure 9). La présence de corps d'inclusion (agrégats de protéines avec des impuretés) est une conséquence de la production massive de protéines recombinantes dans le cytoplasme (Dietrich, 2003)

dans l'espace périplasmique : on peut y retrouver des protéines en faible concentration mais, étant donné que l'environnement y est oxydant, les ponts disulfures s'y maintiennent sans problème. La dégradation protéique y est relativement faible et la concentration en protéines totales y avoisine les 4 %. Dès lors, l'espace périplasmique constitue non seulement une destination optimale pour des protéines recombinantes, mais aussi un compartiment d'où il est facile de les récupérer par choc osmotique (Ghosh *et al.*, 2004)

de manière soluble : la production des protéines sous forme soluble pose problème vu la faible concentration à laquelle elles sont produites (Ghosh *et al.*, 2004).

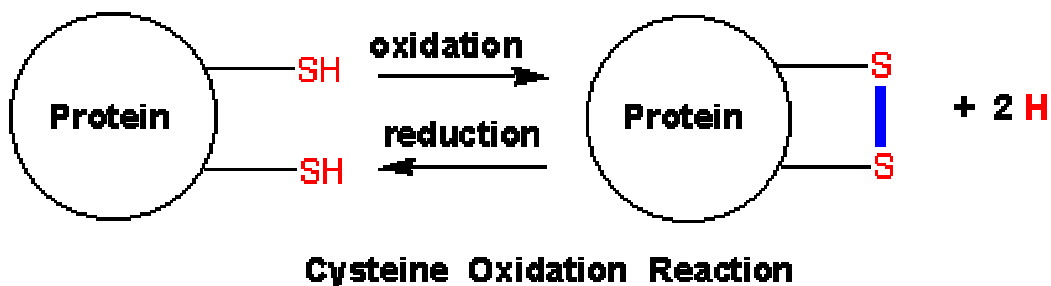


Figure 8 : Formation de ponts disulfures. (http://mapage.noos.fr/genomeathome/Genome@home_scientific_background.htm)

I.3.2.2 Le problème du repliement

Il y a vingt acides aminés différents, et les protéines contiennent jusqu'à plusieurs centaines d'acides aminés. Le nombre de séquences de protéines possibles est bien sûr astronomique. Toutefois, la séquence en acides aminés est le principal déterminant de la conformation d'une protéine, et un nombre restreint de combinaisons de résidus d'acides aminés est essentiel pour guider ou orienter la chaîne polypeptidique vers sa structure tridimensionnelle fonctionnelle. Dans le futur, l'avènement d'algorithmes et d'ordinateurs toujours plus puissants devrait permettre de comprendre le processus de repliement d'une protéine (<http://www.research.ibm.com/journal/sj/402/duan.html>).

Loin d'être pour le moment entièrement compris, ce repliement des protéines est nettement plus complexe *in vivo* que dans un tube à essai (Sassoon-Clavier *et al.*, 2001). En ce qui concerne le fragment scFv qui nous intéresse, les liaisons qui vont prendre de l'importance sont très certainement les ponts disulfures formés entre résidus cystéines de chaînes latérales spatialement proches.

La production en bactérie amène très souvent la précipitation des protéines recombinantes sous forme d'agrégats insolubles inactifs, les corps d'inclusion. Cette agrégation est un phénomène intermoléculaire non spécifique causé essentiellement par des interactions hydrophobes entre des protéines mal ou pas repliées. Les petits agrégats formés voient alors leur taille progressivement augmenter par la formation de ponts disulfures, dont les protéines extracellulaires sont souvent très riches (De Bernardez Clark, 1998). Le problème est compris comme étant causé par un échec du mécanisme de contrôle du repliement des protéines, soit parce que les enzymes qui ont cette fonction sont dépassées en cas de surproduction de la protéine, soit parce qu'elles sont elles-mêmes en trop faible concentration (Ghosh *et al.*, 2004).

Les protéines qui agissent sur le repliement des protéines sont des chaperones et des foldases. Les chaperones et les foldases sont uniquement des catalyseurs du repliement : elles accélèrent et rendent plus efficace le processus de repliement et évitent la formation de structures non natives (Llorca *et al.*, 2001). Les foldases sont des protéines disulfures isomérases qui interagissent avec les chaperones pour la formation des ponts disulfures. Les chaperones quant à elles sont une famille de protéines très conservées. Elles aident les polypeptides à adopter une bonne conformation et contribuent à leur localisation finale, mais sans en faire partie. Tous ces mécanismes ont lieu dans le cytoplasme et sont présents chez *E. coli* (Xu *et al.*, 1997).

I.4 Objectifs

Le laboratoire URBV a pu, dans le passé, produire diverses sondes de type phage display contre des polysaccharides d'origine végétale (Liners *et al.*, 2005). Parmi ces sondes, un clone anti-alginates dénommé D5 a été obtenu, mais n'a pu être caractérisé faute de temps.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons voulu caractériser ce clone, décrire sa spécificité vis-à-vis de différents types d'alginates et tenter d'obtenir une production soluble du fragment scFv.

Les propriétés de repliement d'une protéine sont largement fonction de leur séquence. Il n'est donc pas encore possible *a priori* de prédire les conditions optimales de production d'une protéine recombinante fonctionnelle. Nous avons dès lors tenté plusieurs approches différentes, à savoir :

Dans l'étape de culture des bactéries, l'utilisation de milieux moins riches limitant la production protéique afin d'éviter la surcharge des mécanismes de repliement.

Dans l'étape d'induction, la diminution de la température de culture, en vue de diminuer la quantité de protéines produites. Les mécanismes de repliement devraient ainsi agir plus efficacement sur ces protéines. L'utilisation de très faibles concentrations d'IPTG ainsi que des inductions répétées ont aussi été tentées (Xianzong Shi, 2002)

L'utilisation de supports en verre pour les milieux de culture, centrifugations, inductions, etc. et non en plastique semble aussi avoir son importance, le verre permettant d'éviter des interactions paroi - protéine (Gosh *et al.*, 2004)

Une augmentation de la pression osmotique qui favorise la synthèse d'osmoprotecteurs et aide au repliement des protéines (Robert *et al.*, 2005)

Dans l'étape d'isolement et de purification des protéines, on a tenté une purification sur colonne nickel grâce à un tag poly-His porté par les protéines recombinantes. Les protéines ainsi fixées sur la colonne nickel peuvent être dénaturées et renaturées par interaction avec des molécules de faible poids moléculaire. Une autre approche a consisté à dialyser les protéines produites face à des quantités de plus en plus faibles d'agent dénaturant (Oganessian, 2003).

L'objectif final étant bien sûr de produire cette sonde scFv en quantité et sous une forme active utilisable tant dans des tests de type ELISA qu'en immunocytochimie.

II. Matériel et méthodes

II.1 Protocoles

II.1.1 PCR

Matériel :

PCR buffer 10x concentré (Roche), dNTP Mix (10mM) (Roche), Taq polymérase 5U/ μ l (Boehringer), Primers : pHEN-SEQ (100 pmol/ μ l) et LMB3 (100 pmol/ μ l) (Eurogentec). Appareils PCR : Minicycler TM (MJ Research, Biozym) ou PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, biozym). Tubes PCR 0,2 ml (AxyGen, Inc., n°Cat. PCR-02-A)

Protocole :

1. Dans un tube eppendorf, préparer X fois le mélange PCR suivant sur glace : 5 μ l de PCR buffer 10x ; 2 μ l de dNTP Mix ; 1,25 μ l de $MgCl_2$ 50mM ; 1 μ l primer pHEN-SEQ ; 1 μ l primer LMB3 ; 0,5 μ l Taq polymérase et compléter à 50 μ l avec H_2O .
2. Vortexer brièvement et distribuer x fois 50 μ l de cette solution dans x tubes PCR. Placer ces tubes sur glace.
3. Sous hotte, piquer dans une colonie bactérienne avec un embout et plonger celui-ci dans un tube contenant du mélange PCR. Disperser les bactéries dans la solution par aspiration-refoulement. Dans le cas de phages, ajouter 1 μ l de suspension de phages au mélange PCR. Répéter l'opération X fois. Mettre les tubes dans l'appareil PCR et effectuer la réaction suivante : 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 60°C et 2 min à 72°C. Terminer par une élongation de 10 min à 72°C.
4. Dépôt de 10 μ l du produit PCR et additionné de 2 μ l de tampon de chargement sur gel d'agarose analytique (1%)
5. Faire migrer avec une intensité de 85 à 90 mA

II.1.2 Multiplication des phages recombinants

Matériel :

Boîtes de Petri (diamètre 9 cm) ; milieu liquide 2XTY (voir milieux). Stock de glucose 20% ; stock d'ampicilline 1mg/ml.; stock de kanamycine 1 mg/ml. Stock de phage helper (M13KO7), titre : $9,28 \times 10^{13}$ pfu/ml.

Protocole :

- 1.ensemencer une colonie de chaque clone TG1 (B3, D5 et G8) dans 10 ml de milieu 2XTY contenant 2% de glucose et 100 μ l/ml d'ampicilline
2. Incuber à 37°C sous agitation de 250 rpm jusqu'à avoir une DO_{600nm} entre 0,4 et 0,6
3. Estimer le nombre de bactéries par ml de suspension par le calcul suivant : $D.O_{600nm} \times 8 \times 10^{18}$ bact/ml
4. Déposer 5 ml de suspension bactérienne dans un tube Falcon de 50 ml et y ajouter des phages helper de manière à ce que leur nombre soit 20 fois supérieur au nombre de bactéries présentes dans la solution.
5. Mettre dans un bain à 37°C pendant 30 min

- 6 Centrifuger 3500 rpm 10-20 min à 4°C
- 7 Elimination du surnageant et resuspension du culot dans 50 ml de milieu 2XTY contenant 50µg/ml de kanamycine et 100µg/ml d'ampicilline.
- 8 Laisser tout la nuit à 30°C sous une agitation de 235 rpm
- 9 Centrifugation de la suspension à 4500 rpm pendant 30 min à 4°C
- 10 Récolter les surnageants contenant les phages recombinants et les stocker à 4°C.

II.1.3 ELISA utilisant des phages

Matériel :

Plaques de microtitration 96 puits en polystyrène (Nunc-Immuno module Maxisorp F-8 ; Gibco) ; Poly-L-Lysine 1 mg/ml ; Alginate (Fluka n° 05550), Acide alginique (Sigma n° A-7003), Acide mannuronique (Sigma n° C-1263) et Carraghénanes iota (Sigma n° C 4014) tous préparés à 1mg/ml en H₂O et stockés à -20°C.

Tampon PBS : 5.84 g/L NaCl, 4.72 g/L Na₂HPO₄, 2.64 g/L Na H₂PO₄, pH 7.2

Tampon T-Ca-Na: Tris 2.42 g /L, Na Cl 8.76 g/L, CaCl₂ 0.073 g/L, pH 7.2

Tampon T-Mg-Na: Tris 2.42 g /L, Na Cl 8.76 g/L, Mg Cl₂ 0.101g/L, pH 7.2

Tampon EDTA: Tris 2.42 g /L, Na Cl 8.76 g/L, EDTA 5mM, pH 7.2

Anticorps de souris anti-M13-HRP amersham 279421-01

Enhanced K-Blue TMB (3,3',5,5-tetramethylbenzidine) substrate (Neogen Corporation, Lexington KY USA; n° 318176)

Protocole :

- 1 Coating à la poly-L-lysine : dépôt de 100µL/puits d'une solution à 0.05 mg/mL en H₂O. Laisser 1 heure à température ambiante.
- 2 Effectuer trois lavages en tampon approprié (250 µL/puits).
- 3 Déposer les polysaccharides préparés à raison de 100 µg/ml en tampon approprié (100 µL/puits) et incuber une nuit à 4°C.
- 4 Lavage des puits trois fois en tampon approprié (250µL/puits).
- 5 Bloquer l'adsorption non spécifique avec une solution de caséine Hammerstein 1% dans le tampon approprié (250 µl/puits) et laisser 2 heures à 24°C.
- 6 Diluer les phages dans une solution de caséine 1% en tampon approprié. Laisser sous agitation pendant une demie heure à température ambiante.
- 7 Laver les puits trois fois en tampon approprié (250µL/puits). Ajouter les suspensions de phages dilués 10 fois, à raison de 100 µL/puits, et incuber pendant 2 heures à 24°C.
- 8 Laver trois fois en tampon approprié contenant 0.1% Tween 20 et trois fois avec le tampon seul (250µL/puits).
- 9 Déposer l'anticorps secondaire anti-M13-HRP, dilué 1000 fois en tampon approprié contenant 1% de caséine, à raison de 100µl/puits; et incuber 1 heure à 24°C.
- 10 Laver trois fois en tampon approprié-0.1% Tween 20 et trois fois en tampon seul 250µL/puits.
- 11 Révéler avec une solution d'enhanced K-Blue (100 µL/puits). Laisser à température ambiante pendant 20 minutes à l'obscurité.
- 12 Ajouter 100 µL/puits de HCl 1M pour arrêter la réaction enzymatique.
- 13 Mesurer l'absorbance à 450 nm.

II.1.4 ELISA utilisant des ScFv solubles

Matériel :

Plaques de microtitration 96 puits en polystyrène (Nunc-Immuno module Maxisorp F-8 ; Gibco) ; Poly-L-Lysine 1 mg/ml ; Alginate (Fluka n° 05550), Acide alginique (Sigma n° A-7003), Acide mannuronique (Sigma n° C-1263) et Carraghénanes iota (Sigma n° C 4014) tous préparés à 1mg/ml en H₂O et stockés à -20°C.

Tampon PBS: 5.84 g/L NaCl, 4.72 g/L Na₂HPO₄, 2.64 g/L Na H₂PO₄, pH 7.2

Tampon T-Ca-Na: Tris 2.42 g /L, Na Cl 8.76 g/L, CaCl₂ 0.073 g/L, pH 7.2

Anticorps anti-c-myc couplé à l'HRP invitrogen n°460709

Anticorps anti-c-myc non couplé invitrogen n° 46-0603

Anticorp anti-souris couplé à l'HRP Amersham n° NA931IV

Enhanced K-Blue TMB (3,3',5,5-tetramethylbenzidine) substrate (Neogen Corporation, Lexington KY USA; n° 318176)

Protocole :

- 1 Coating à la poly-L-lysine : dépôt de 100µL/puits d'une solution à 0.05 mg/mL en H₂O. Laisser 1 heure à température ambiante.
- 2 Effectuer trois lavages en tampon approprié (250 µL/puits).
- 3 Déposer les polysaccharides préparés à raison de 100 µg/ml en tampon approprié (100 µL/puits) et incuber une nuit à 4°C.
- 4 Lavage des puits trois fois en tampon approprié (250µL/puits).
- 5 Bloquer l'adsorption non spécifique avec une solution de caséine Hammerstein 1% dans le tampon approprié (250 µl/puits) et laisser 2 heures à 24°C.
- 6 Diluer 10 fois les préparations de scFv correspondant au clone D5 anti-alginate en tampon approprié contenant 1% caséine. Laisser sous agitation pendant une demie heure à température ambiante. Dans certains tests, des préparations de scFv correspondant au clone B3 anti-carraghénane sont utilisées comme contrôle. Elles sont utilisées de la même façon que les préparations de scFv dérivées du clone D5.
- 7 Laver les puits trois fois avec le tampon correspondant (250µL/puits)
- 8 Ajouter les préparation de scFv (100 µL/puits) et incubation 2 heures à 24°C
- 9 Laver trois fois en tampon approprié contenant 0.1% Tween 20 et trois fois avec le tampon seul (250µL/puits).
- 10 Déposer 100µl/puits d'anticorps secondaire anti-c-myc-HRP, dilué 1000 fois en tampon approprié contenant 1% de caséine et incubé 1 heure à 24°C.
- 11 Laver trois fois en tampon approprié contenant 0.1% Tween 20 et trois fois en tampon seul (250µL/puits).
- 12 Révéler avec une solution d'enhanced K-Blue (100 µL/puits). Laisser à température ambiante pendant 20' à l'obscurité.
- 13 Ajouter 100 µL/puits de HCl 1M pour arrêter la réaction
- 14 Mesurer l'absorbance à 450 nm.

NB : Dans certains cas ce protocole a été réalisé avec les variations suivantes :

Étape 10 du protocole décrit ci-dessus : incubé avec un anticorps anti-c-myc non couplé dilué 1000 fois en tampon approprié contenant 1% de caséine et incubé 1 heure à 24°C. Effectuer ensuite les lavages comme décrit au point 11 et ajout d'une étape d'incubation de 1 h à 24°C avec un anticorps anti-souris-HRP dilué 5000 fois (100 µl /puits). Effectuer les lavages comme décrit au point 11 et révéler comme décrit ci-dessus.

II.1.5 Mise en culture des bactéries TG1 et HB2151 recombinantes

Matériel :

Boîtes de Pétri (9 cm de diamètre); Milieu 2XTY (voir milieux). stocks de glucose 20% et d'ampicilline à 1 mg/mL ; Stocks glycérol de bactéries TG1 ou HB2151 correspondant aux clones D5, G8 et B3 (-80°C)

Protocole :

- Couler du milieu 2XTY contenant du glucose 2% et de l'ampicilline à 100 µg/mL dans des boîtes de Pétri
- Strier les bactéries au départ des stocks glycérol et incubé pendant une nuit à 30° C
- Conserver les boîtes à 4°C pendant 2 à 3 semaines

II.1.6 Obtention des ScFv solubles

Protocole 1 (Liners et al., 2005)

Celui-ci est un protocole classique qui utilise une température de 30°C pour l'induction

Matériel :

Tampon TES: 0.2 M Tris HCl pH 8 0.5 mM EDTA 0.5 M sucrose

Milieu liquide 2XTY (voir milieux) ; Stocks de glucose 20% et d'ampicilline 1mg/ml, Stock d'IPTG 100mM (Duchefa n° I 1401).

Protocole :

- Préculture : ensemencer une colonie de bactéries HB2151 dans 5 ml de milieu 2XTY contenant 2% glucose et 100µg/ml d'ampicilline et laisser toute la nuit à 30°C sous agitation de 235 rpm
- Ensemencer 50 ml de milieu 2XTY-glc-amp avec la préculture et laisser encore 1 heure à 30°C sous agitation.
- Centrifuger la suspension à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C, éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 50 ml de milieu 2xTY contenant de l'ampicilline 100µg/ml et de l'IPTG à 1mM. Laisser pousser 3 heures à 30°C sous agitation.
- Centrifuger la suspension 10 minutes à 3500 rpm à 4°C
- Récolter le surnageant et le stocker à -20°C : il constituera ce que nous appellerons dans ce travail la « fraction soluble ».
- Resuspendre le culot dans 1 ml de TES froid (stocké dans un mélange glace-eau) et y ajouter 1,5 ml de TES dilué 5x (stocké dans un mélange glace-eau) et laisser sur glace 30 min. Transférer cette suspension dans des tubes eppendorf et centrifuger 10 min à vitesse maximale à 4 °C
- Transférer les surnageants dans de nouveaux tubes eppendorf et les conserver à -20 °C. Il constitueront ce que nous appellerons la « fraction périplasmique ».

Protocole 2 (Plückthun et al.,1997)

Ce deuxième protocole diffère du premier par le fait que l'étape d'induction s'effectue à une température plus faible : 28°C.

Matériel :

Tampon TES: 0.2 M Tris HCl pH 8, 0.5 mM EDTA, 0.5 M sucrose
Milieu liquide 2XTY (voir milieux). Stocks de glucose 20% et 1mg /ml d'ampicilline
Stock d'IPTG 100mM (Duchefa n° I 1401).

Protocole :

- Ensemencer 50 ml de milieu 2XTY-glc-amp avec des bactéries HB2151 B3 et D5 et laisser pousser à 28°C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,5.
- Centrifuger la culture liquide à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C. Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 50 ml de 2xTY contenant de l'ampicilline à 100µg/ml et de l'IPTG à 1mM. Laisser 1 nuit à 28°C sous agitation.
Extraire les scFv en suivant la procédure décrite dans le premier protocole.

Protocole 3 (Zheng et al., 2003)

Le troisième protocole diffère des autres par le fait que l'étape d'induction s'effectue à une température de 22°C et que le milieu utilisé est un milieu LB.

Matériel :

Milieux LB (voir milieux) ; Stocks de glucose 20% et d'ampicilline 1mg /ml.
Tampon TES: 0.2 M Tris HCl pH 8, 0.5 mM EDTA, 0.5 M sucrose.
Tampon de lyse : Tris 20mM pH 8, 300mM NaCl, 10mM imidazole
Stock d'IPTG 100mM (Duchefa n° I 1401).

Protocole :

- Ensemencer 10 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml ampicilline et 2% de glucose avec des bactéries HB2151 D5 ou B3. Incuber toute la nuit à 30°C sous une agitation de 230 rpm.
- Ensemencer un litre de milieu LB contenant 100µg/ml d'ampicilline avec 2 ml de la préculture et incubé à 22°C sous agitation jusqu'à avoir une DO_{600nm} de 0.5
- Ajouter de l'IPTG pour atteindre une concentration finale de 1mM et laisser pousser 15 h à 22°C.
- Procéder à l'extraction des protéines de la manière suivante :
 - Centrifuger à 4000g à 4°C pendant 15 min et conserver ce surnageant à -20°C (fraction soluble).
 - Mettre en suspension le culot correspondant à un demi-litre de culture avec 5 ml de tampon TES froid (mélange glace-eau) et y ajouter 7.5 ml de tampon TES dilué 5X. Laisser une demie heure dans un mélange glace-eau, transférer les suspensions dans des eppendorfs et centrifuger ensuite 10 min à vitesse maximale à 4°C. récolter les surnageants (fraction périplasmique) et les congeler à -80°C.

- Mettre en suspension le culot correspondant à un demi-litre de culture avec 12.5 ml de tampon de lyse.
- Soniquer 20 fois 10 secondes et centrifuger à une vitesse de 4000g à 4°C pendant 15 min.
- Finalement purifier sur colonne nickel (voir protocole 7)

Protocole 4 (Robert *et al.*, 2004)

Ce quatrième protocole diffère des autres par le fait que l'étape d'induction s'effectue à deux températures différentes (25 et 37°C) et que différents milieux sont utilisés (2XTY, TB et LB).

Matériel :

Tampon TES 1x : 0.2 M Tris HCl pH 8 0.5 mM EDTA 0.5 M sucrose
 Milieu 2XTY contenant 0,4M de saccharose, milieux TB et LB Lennox (voir milieux)
 Stocks de glucose 20% et d'ampicilline 1mg /ml.
 Stock d'IPTG 100mM (Duchefa n° I 1401).

Protocole :

- Précultures : ensemencer une colonie de bactéries *E.coli* HB2151 correspondant respectivement aux clones B3 et D5 dans 10 ml de milieu 2XTY contenant 0.4 M saccharose, de milieu TB et de milieu LB Lennox, tous additionnés de 2% de glucose et de 100µg/ml d'ampicilline. Laisser pousser toute la nuit à 37°C sous une agitation de 230 rpm.
- Ensemencer 50 ml de chaque milieu (2XTY-saccharose, TB et LB Lennox) contenant 2% de glucose et 100 µg/ml d'ampicilline avec les précultures correspondantes diluées 60 fois et laisser pousser à 37°C jusqu'atteindre une $DO_{600\text{ nm}}$ 0.7. Cette opération est réalisée en double de manière à pouvoir réaliser des inductions de production de protéines à différentes températures.
- Centrifuger les cultures liquides à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C, éliminer les surnageants et reprendre les culots dans 50 ml de milieu correspondant (2XTY-saccharose, TB et LB Lennox) contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 1mM d'IPTG. Laisser pousser toute la nuit respectivement à 30°C ou 25° C sous agitation. Extraire les scFv en suivant la procédure décrite dans le premier protocole.

Protocole 5 (Pung, 2005)

Ce cinquième protocole diffère des autres par le fait que l'étape d'induction s'effectue à deux températures différentes (16 et 25°C), avec deux concentrations différentes en IPTG (0,1 et 1 mM) et que différents milieux sont utilisés (LB et LB Lennox).

Matériel :

Milieu LB et LB Lennox (voir milieux); Stocks de glucose 20% et d'ampicilline 1mg /ml, stock d'IPTG 100mM (Duchefa n° I 1401).
 Tampon TES 1x : 0.2 M Tris HCl pH 8 0.5 mM EDTA 0.5 M sucrose

Protocole :

- Préculture : ensemercer une colonie de bactéries *E.coli* HB2151 correspondant respectivement aux clones B3 et D5 dans 10 ml de milieu LB et LB Lennox contenant 2% de glucose et 100µg/ml d'ampicilline. Laisser toute la nuit à 37°C sous une agitation de 230 rpm.
- Ensemercer 50 ml de milieu LB et LB Lennox contenant 2% de glucose et 100µg/ml d'ampicilline avec 1 ml de préculture correspondante. Laisser pousser à 37°C jusqu'à avoir une DO_{600nm} de 0.7. Pour un milieu considéré, cette opération est répétée quatre fois de manière à pouvoir réaliser des inductions de production de protéines à différentes températures et différentes concentrations d'IPTG.
- Centrifuger chaque culture liquide à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C. Eliminer les surnageant et reprendre chaque culot dans 50 ml de milieu correspondant contenant de l'ampicilline à 100µg/ml et de l'IPTG à 0.1 ou 1 mM. Laisser pousser toute la nuit à 16°C ou 25° C sous agitation.
Extraire les scFv en suivant la procédure décrite dans le premier protocole.

II.1.7 Purification des scFv sur colonne Ni²⁺

Matériel:

Résine His Bind (Novagen)

Charge buffer: NiSO₄ 50mM

Binding Buffer: Tris-HCl 20mM pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole

Washing Buffer: Tris-HCl 20 mM pH 8, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole

Elution Buffer: Tris-HCl 20 mM pH 8, 300mM NaCl, 250 mM imidazole

Strip buffer : Tris-HCl 80 mM pH 8, 0.5 M NaCl, 100mM EDTA

Protocole:

Les scFv ont été purifiés en suivant strictement les indications fournies par le fabricant et en procédant comme suit :

- Déposer préalablement quelques ml d'eau dans la colonne vide afin de permettre le flux de liquide
- Déposer ensuite la résine His bind (2 ml) dans la colonne et ensuite procéder au chargement de la résine : laver la résine avec 3 volumes (6 ml) d'eau stérile, déposer ensuite 5 volumes (10 ml) de tampon de chargement suivis de 3 volumes (6 ml) de binding buffer.
- Déposer les extraits protéiques contenant des scFv (voir remarque ci-dessous) et récolter le flow through qui est stocké à -20°C.
- Laver la colonne avec 10 volumes (20 ml) de binding buffer et récolter cette solution de lavage afin de l'analyser.
- Laver la colonne avec 6 volumes (12 ml) de washing buffer.
- Eluer avec 6 volumes (12 ml) d'eluting buffer et récolter par fractions de 1 ml
- Régénérer la colonne avec 3 volumes (6 ml) de strip buffer et la conserver à 4°C.

Remarque

Nous avons appliqué ce protocole de purification sous deux types de conditions :

- (a) conditions natives (tampons sans guanidine, dont les compositions sont données ci-dessus), appliquées à des extraits protéiques préparés selon le protocole de Zheng et al. (2003). Dépôt de 10 ml d'extrait sur la colonne
- (b) conditions dénaturantes (tampons Binding et Elution idem ci-dessus mais additionnés de guanidine 6M, tampon Washing : Tris-HCl 20 mM pH 8, 300 mM NaCl, 20mM imidazole; 6M Guanidine), appliquées à des extraits protéiques préparés selon le protocole de Pung (2005). Dépôt sur la colonne de 2 ml d'extraits périplasmiques (préparés au départ de cultures effectuées en milieu LB Lennox à 16°C et induites par de l'IPTG à 1 et 0.1 mM) dialysés une nuit à 4°C contre du binding buffer. Nous avons ensuite procédé à un essai de renaturation des scFv élués en les dialysant contre du binding buffer contenant des concentrations décroissantes en guanidine (6M, 3M, 2M, 1M, 0.5M et 0M). Ces dialyses ont été effectuées à 4°C, par fractions de 2h par tampon.

II.1.8 Gel SDS- PAGE pour l'analyse des scFv

Matériel :

Acrylamide/Bis 30% : Acrylamid : N,N'Methylenbiaacrylamide, solution 37.5 :1 (Bio-Rad, 65868) ; SDS : Sodium dodecyl sulfate (J.T. Baker, 4095-0) ; APS : Amonium persulfate 98% (Jansen, 20.153.74) ; TEMED : N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamine (Sigma, T-8133). Etalon de poids moléculaire : prestained SDS-PAGE standards (Bio-Rad, 161-0372). Tampon d'électrophorèse : Tris 25mM, Glycine 250 mM, SDS 0,1% (pH 8,3) Tampon de chargement (5x) : Tris 250 mM, DTT 500 mM, SDS 10% β -Mercaptoéthanol 10%, Glycérol 50%, Bleu e Bromophénol 0,25% (pH 6,8)

Cuve d'électrophorèse : Mini-PROTEAN II and ready gel cell accesories (Bio-Rad, 165-2944) et Protean II xi cell (Bio-Rad, 165-1844)

Solution de coloration: Comassie Brilliant Blue R250 0.1%, Méthanol 40%, H₂O 50%, Acide acétique 10%.

Solution de décoloration : Méthanol 40%, Acide acétique 10%, H₂O 50%.

Protocole:

Nous avons préparé des gels 12% en mélangeant les différents composants de la manière suivante :

	Running gel	Stacking gel
Eau	1.6ml	1.6 ml
Bis acrylamide 30%	2 ml	0.34ml
Tris 1.5 M pH 8.8	1.3ml	--
Tris 1M pH 6,8	--	0,26 ml
SDS 10%	0.05ml	0.02ml
APS 10%	0.05ml	0,02ml
TEMED	0.002ml	0,002

Après avoir ajouté les 2 catalyseurs (APS et TMED) aux mélanges acrylamide-bisacrylamide, le Running Gel est coulé entre 2 plaques de verre séparées par des spacers et laissé à polymériser 30 minutes. Le peigne (0.75 mm d'épaisseur) est ensuite placé et le stacking gel est coulé. Après la polymérisation du Stacking Gel (30 minutes), le peigne est

enlevé et les puits sont rincés avec quelques ml de tampon d'électrophorèse. L'électrophorèse est réalisée dans une cuve prévue à cet effet sous une tension de 150 V. Après la migration électrophorétique, le gel est retiré délicatement de son support de verre et prolongé dans la solution de coloration pendant au minimum 30 minutes. Des bains successifs dans la solution de décoloration permettent ensuite de visualiser les protéines.

II.1.9 Western blotting et immunomarquages

Matériel :

Membrane de PVDF (Hybond™-P, Amersham, n° RPN 2020F)

Tampon de transfert Bio-Rad : Tris 48mM, Glycine 39mM, Méthanol analytique 20%, SDS 0,0375%

Appareil de transfert semi-dry (Bio-Rad) « Trans-blot semi-dry transfer cell » branché à une source Pharmacia LKB, GPS 200/400, 125 VA, 50/60 Hz

Tampon TBS Tris 20 mM NaCl 137mM pH 7,6.

Tween-20 (Fluka, 93773), Poudre de lait (Nestlé) ; NBT : Nitobluie tetrazoliumchloride (Boehringer, 1383213) ; BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Roche, 1383221)

Anticorps anti-cmyc invitrogen n° 46-0603

Anticorps anti-souris liée à la phosphatase alcaline Sigma n°A 3562

Tampon de révélation 25mM Tris 250mM Glycine 0.1% SDS

Protocole:

- Découper un morceau de membrane PVDF correspondant à la taille du gel SDS-PAGE (8,8 x 5,5 cm)
- Incuber la membrane PVDF quelques secondes dans méthanol suivi directement d'une incubation de 5 minutes dans l'eau des ionisée ; Equilibrer ensuite la membrane et les papiers absorbants (9 x 13 cm) dans le tampon de transfert durant au moins 30 min.
- Après l'électrophorèse, équilibrer le gel dans le tampon de transfert et assembler le montage de transfert dans l'appareil semi-dry en évitant la formation de bulles d'air.
- Réaliser le transfert des protéines du gel SDS-PAGE vers la membrane PVDF pendant 40 min sous une alimentation de 15 Volts.
- Pour vérifier que le transfert a bien eu lieu, on procède à la coloration et décoloration du gel SDS-PAGE.

Procéder ensuite à l'immunomarquage des membranes de la manière suivante :

- Saturer la membrane dans 5% de poudre de lait en tampon TBS pendant 1 heure à température ambiante sous agitation
- Effectuer 3 lavages (1 x 2'; 1x 15'; 1 x 5') en TBS-Tween 0,1 %
- Incubation avec l'anticorps anti-cmyc dilué 5000x dans le TBS-Tween0,1% pendant 1 nuit à 4°C sous agitation
- Effectuer 3 lavages (1 x 2'; 1x 15'; 1 x 5') en TBS-Tween-0,1% .
- Incuber avec l'anticorps anti-Ig de souris couplé à la phosphatase alcaline dilué 15000x en TBS-Tween 0,1 % pendant 1 heure à température ambiante sous agitation
- Effectuer 3 lavages (1 x 2'; 1x 15'; 1 x 5') en TBS-Tween, rincer la membrane avec le tampon de révélation et incuber ensuite cette membrane dans 10 ml de tampon de

révélation contenant 50µl de NBT et 37,5 µl de BCIP et laisser révéler jusqu'à apparition des bandes. Finalement rincer la membrane avec de l'eau et laisser sécher.

II.1.10 Préparation et immunomarquage sur *Fucus vesiculosus*

Matériel :

Formaldéhyde, glutaraldéhyde, éthanol, résine LR White (London resin Co Ltd);
 Tampon T-Ca-Na: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0.5 mM, pH 7,2
 Anticorps de souris anti-M13 Amersham n° 279421-01 ; Anticorps anti-souris-Alexa 488

Protocole :

Des échantillons de *Fucus vesiculosus* ont été préparés pour la microscopie de la manière suivante:

- Fixation avec 2% de formaldéhyde et 2% de glutaraldéhyde en eau de mer stérile pendant 2 h à température ambiante suivies de 1 nuit à 4°C dans une solution de fixation renouvelée.
- Laver les échantillons deux fois 20 minutes avec de l'eau de mer et procéder à la déshydratation par des bains successifs éthanol/eau de mer 20,30 et 40 % (vol/vol) et éthanol/eau désionisée 50, 60, 70, 80 et 90 % (30 à min par bain, température ambiante).
- Après deux bains de 30 min dans 100 % d'éthanol, infiltrer progressivement avec la résine par des bains (1-4 h chacun sous agitation) dans des solutions contenant 2 :1 ; 1 :1 et 1 :2 (v :v) éthanol absolu/LR White
- Transférer les échantillons dans de la résine fraîche et laisser agiter 1 nuit à 4°C. Changer la résine et laisser 2h à température ambiante.
- Transférer les échantillons dans des gélules en gélatine, remplir ces dernières de résine et laisser polymériser celle-ci pendant 6h à 60°C.

Des coupes semi-fines des différents échantillons ont été effectuées par Madame C. Devignon, de l'Unité interfacultaire de microscopie.

Nous avons procédé au marquage des coupes de la manière suivante

- Déposer 25 µl tampon Tris-Ca-Na contenant de la caséine 1% et incuber 1h à température ambiante
- Enlever la solution de saturation et déposer ensuite 25 µl du phage D5 dilué 10x en tampon Tris-Ca-Na-caséine 1%. Incuber pendant une nuit à 4°C. Un contrôle négatif a été réalisé en omettant à cette étape le phage D5 sur certaines coupes qui ont été incubées avec le tampon. Toutes les étapes ultérieures ont été réalisées de la même façon dans tous les cas.
- Effectuer trois lavages (25 µl) en Tris-Ca-Na contenant 0.1% Tween et trois lavages en Tris-Ca-Na seul.
- Incuber pendant 1 h à température ambiante avec 25 µl d'anticorps de souris anti-M13 dilué 100 x en tampon T-Ca-Na-caseine1%
- Effectuer les lavages comme décrit précédemment et incuber ensuite pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps anti-Ig de souris couplé au fluorochrome Alexa 488 dilué 100x en tampon T-Ca-Na-caseine1%
- Effectuer les lavages comme décrit précédemment et monter les coupes.

NB Les coupes marquées ont été examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss. Les photographies ont été prises sur un film couleur 400 ASA (Kodak)

II.2. Milieux

	2xTY	LB	LB Lennox
Bactotryptone	17 g/L	10 g/L	10 g/L
Yeast extract	10 g/L	5 g/L	5 g/L
Na Cl	5 g/L	10 g/L	5 g/L

Les milieux solides dérivés de ces différents milieux contenaient en plus de l'agar en concentration 15 g/L

MILIEU TB

Solution 1

KH_2PO_4

K_2HPO_4

Solution 2

Bactotryptone 12g/L

Yeast extract 24g/L

Glycerol 4g/L

Autoclaver séparément ces deux solutions et mélanger (v/v) 1/9 de la première avec 8/9 de la deuxième.

III. Résultats et discussion

Notre projet de production d'anticorps dirigés contre des polysaccharides d'intérêt agroalimentaire avait pour but de répondre à la carence actuelle en outils de détection spécifiques utilisables pour l'identification de ces polymères dans des mélanges complexes tels des aliments. Dans les pages qui suivent, nous allons décrire de manière succincte les procédures utilisées au cours de ce travail pour l'optimisation et la caractérisation de cet outil que sont les anticorps anti-alginates, avant de présenter les résultats obtenus.

Deux formes de la sonde anti-alginates ont été testées :

Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests avec des phages recombinants, lesquels peuvent exprimer l'anticorps à la surface du phage. Nous sommes partis des clones d'un panning préexistant. La procédure utilisée pour obtenir des phages-anticorps recombinants débute avec la mise en culture des clones TG1 en présence de glucose (répression du promoteur lac situé en amont du cadre de lecture du gène de fusion dans le phagemide pHEN2) et d'ampicilline (marqueur de sélection). Arrivée en phase de croissance exponentielle, la culture bactérienne est ensuite infectée par des phages helper (M13K07) de façon à produire des particules de phages recombinants exposant à leur surface des scFv fusionnés à la protéine pIII, sélectionnés en présence de kanamycine et ampicilline. L'absence de glucose dans le milieu de culture permet cette fois la transcription du gène de fusion. On a donc, à ce moment, des phages recombinants à disposition.

Dans un deuxième temps, la production d'anticorps scFv sous forme soluble a nécessité un protocole plus long et complexe. Cette méthode diffère de la première au niveau de l'utilisation d'une souche d'*E. coli* (HB2151) transformée avec le même phagemide pHEN2, mais qui va permettre d'obtenir l'anticorps de manière soluble. Dans ce cas, il n'y a pas besoin d'une infection préalable par les phages pour obtenir l'expression des anticorps : la bactérie possède tous les éléments de synthèse nécessaires. On met les bactéries en culture sur milieu riche en glucose et ampicilline. Quand la croissance est exponentielle, l'opéron lac est induit avec de l'IPTG en absence de glucose pour éviter la répression de celui-ci. Il reste à procéder à des purifications de la protéine, grâce à son tag poly-his, qui va se lier à une colonne de nickel. Il est possible de tenter une renaturation sur colonne, ou en effectuant une dialyse avec des concentrations décroissantes de l'agent dénaturant. De cette manière, on pourrait théoriquement dérouler la protéine pour procéder ensuite à une renaturation douce qui maintiendrait l'activité de l'anticorps.

Il faut distinguer les protéines produites de manière soluble de celles se trouvant dans l'espace périplasmique. Les fractions obtenues de manière soluble sont toujours moins abondantes, leur transport posant problème. De plus, les protéines synthétisées dans le cytoplasme subissent un environnement réducteur peu favorable à la formation de ponts désulfures. A l'inverse, l'environnement oxydant de l'espace périplasmique ressemble à celui du réticulum endoplasmique des cellules eucaryotes et est donc plus favorable à ce type de liaison.

Pour les sondes obtenues par ces deux méthodes, nous avons vérifié par tests ELISA la capacité des anticorps à se lier aux alginates.

III. 1 Caractérisation des phages recombinants

Nous avons réalisé une culture de bactéries TGI et nous l'avons infectée avec les phages M13. Une PCR sur phages et l'électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons obtenus sur les clones G8 et D5 nous a permis de vérifier la présence de l'insert qui code pour l'anticorps anti-alginate. Ce test a été réalisé avec comme contrôle positif le clone B3 anticarraghénanes (Liners *et al.*, 2005) car il possède un insert de taille très similaire à ceux de D5 et G8 (Figure10).

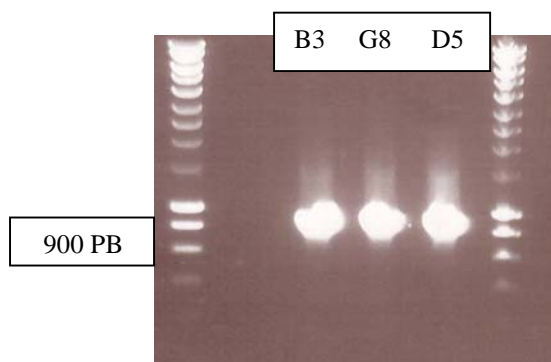


Figure 9 : Analyse sur gel d'agarose 1% des amplicons obtenues par PCR en utilisant des amorces spécifiques (SEQ et LMB3) pour le vecteur phen2. Clones antialginates D8 et D5 ; B3 anticarraghénanes Iota.

III. 1.1. Caractérisation par tests ELISA des phages recombinants

A la suite de cette procédure, nous avons testé l'affinité de ces anticorps en présence d'alginate de différentes origines. Le clone D5 montre une spécificité élevée contre des alginates composés du copolymère (acide guluronique et mannuronique) par rapport au clone G8 qui a une réponse très faible pour tous les types d'alginate. Le clone B3 a été utilisé comme contrôle positif contre des carraghénanes type Iota (Figure 11). Ces premiers résultats nous ont permis de conclure que notre étude devait se poursuivre sur le clone D5, sans plus se préoccuper du clone G8.

Les essais suivants ont eu pour but de caractériser la liaison spécifique des phages recombinants à leurs antigènes en présence de différents tampons utilisés dans les tests ELISA. Le choix de ces tampons est basé sur les changements de conformation caractéristiques des séquences homopolyguluroniques, changements induits par les cations présents en solution.

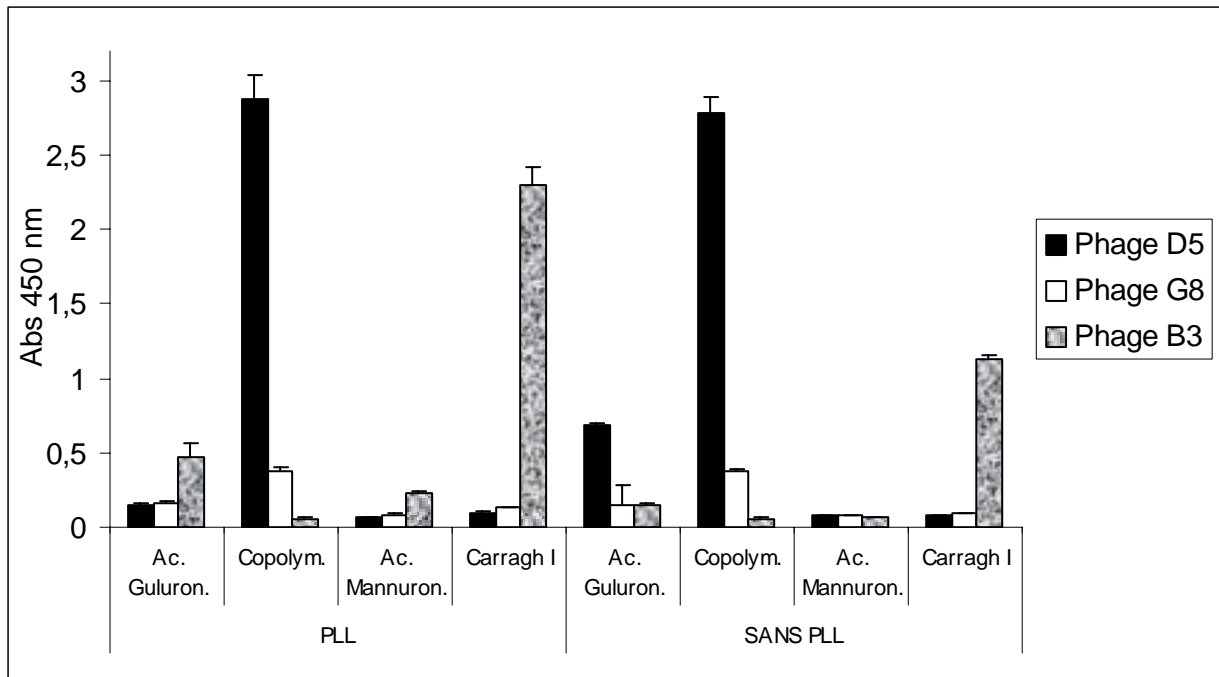


Figure 10 : Test ELISA indirect des phages G8 et D5 contre des alginates; le phage B3 est utilisé contre des carraghénanes iota comme contrôle positif. Anticorps secondaire anti-M13 couplé à la peroxydase de raifort (HRP) et révélation avec le substrat TMB. L'écart type est calculé sur trois valeurs. Le tampon utilisé est du PBS à pH 7,2 .

Tous les tests ELISA pour les phages recombinants ont été réalisés avec des tampons maintenus à pH 7,2 indépendamment de leur composition. L'anticorps secondaire utilisé (anti M13 couplé à l'HRP, la peroxydase de raifort) a été le même dans tous les tests.

Théoriquement, les ions de calcium favorisent une conformation spéciale dans laquelle les blocs d'acide guluronique retiennent des ions calcium par liaisons électrostatiques. L'agrégation des chaînes parallèles, relativement rigides, via ces ponts calcium conduit à l'assemblage géométrique tridimensionnel et régulier qu'on appelle « egg-box ». Cette liaison est ioniquement réversible mais non thermo-réversible. La reconnaissance des séquences homopolyguluroniques des alginates sous forme de boîtes à oeufs plutôt que sous forme de chaînes isolées ou d'agrégats multimoléculaires de chaînes dimérisées est une information essentielle pour la caractérisation de notre sonde.

La teneur en cations monovalents tels le K^+ ou le Na^+ dans l'environnement du polyanion est à cet égard primordiale, le calcium pouvant être déplacé par une forte concentration en ions monovalents, malgré l'avantage d'électrosélectivité que confère son caractère bivalent. Par analogie avec ce qui a été fait sur la pectine (Liners *et al.*, 1993), un tampon Tris-Ca-Na avec un rapport Ca^{2+} / Na^+ de 0,5 mM / 150 mM a été utilisé, ce qui devrait garantir la formation de dimères en « egg-box », mais ni de chaînes isolées, ni de multimères.

Nous avons aussi essayé différents tampons, en présence d'ions calcium ou d'un autre cation bivalent, le magnésium Mg^{2+} . Celui-ci est beaucoup plus hydraté que le calcium et ses

interactions électrostatiques sont trop faibles avec les anions guluronates pour lui permettre de maintenir cette conformation en boîte à œufs des alginales.

Finalement, l'expérience du laboratoire en matière de tests ELISA avec des polysaccharides nous a conduit à tester notre sonde sur des alginales déposés dans des micropuits éventuellement pré-traités par de la poly-L-lysine. Les alginales, comme les carraghénanes, les pectines et bien d'autres polymères, sont des polyanions fortement hydratés qui ne s'adsorbent pas toujours bien sur des surfaces classiquement prévues pour fixer des protéines, elles au moins partiellement hydrophobes. Le traitement préalable de la surface des micropuits par un polycation organique tel la poly-L-lysine, améliore souvent fortement la fixation du polysaccharide à tester, et la réponse du test ELISA.

III. 1.1.1 Test ELISA en présence d'ions Ca^{2+}

Le premier test ELISA a ainsi été réalisé en utilisant, parallèlement, un tampon PBS et un tampon Tris-Ca-Na, ce dernier avec une concentration de 0,5 mM de $CaCl_2$ comme indiqué ci-dessus. Dans ces conditions, nous avons pu vérifier que les ions calcium favorisaient la liaison des phages anticorps aux alginales, surtout au copolymère composé d'acide guluronique et mannuronique (Figure 12). Une réponse supérieure sur le copolymère est normale, la banque ayant été enrichie avec le copolymère. Malgré l'écart type non négligeable obtenu pour la reconnaissance du copolymère par le D5 en présence de calcium, la différence par rapport aux conditions en PBS est toujours significative. Curieusement, le polymère d'acide guluronique répond très peu en présence de tampon T-Ca-Na, contrairement à ce qu'on imaginerait.

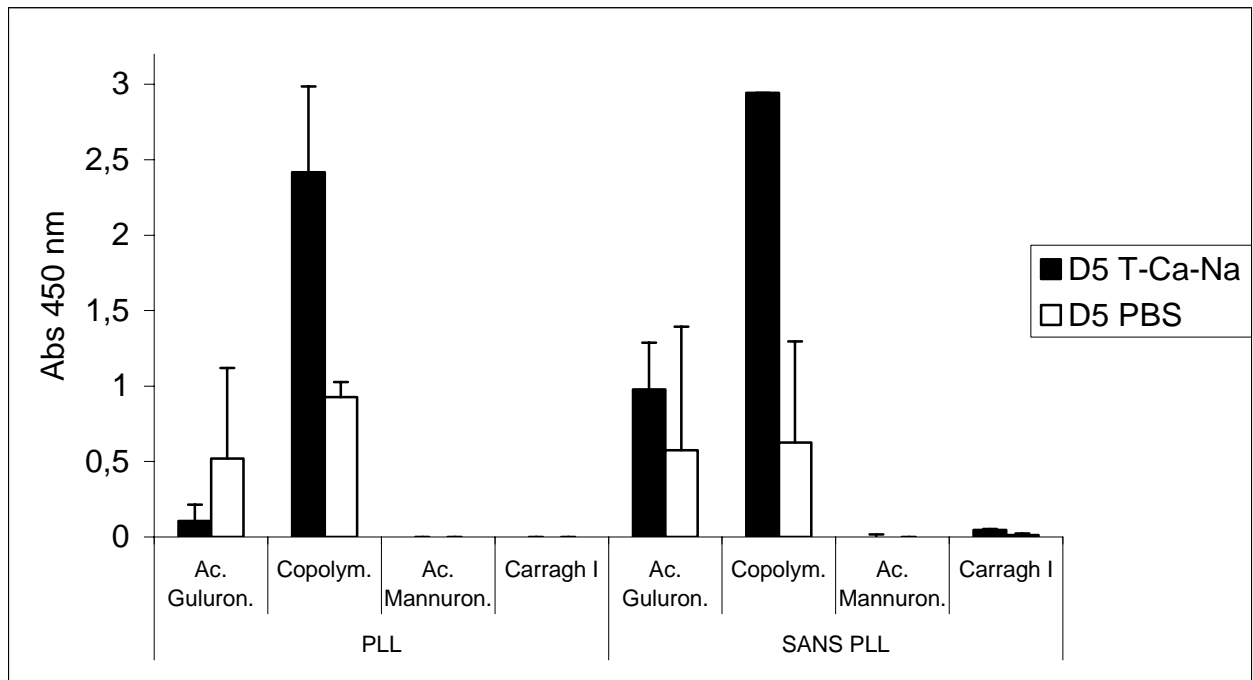


Figure 11 : Test ELISA indirect des phages D5 avec les tampons PBS et Tris-Ca-Na contre différents types d'alginales ; l'anticorps secondaire anti-M13 est couplé à de la peroxydase de raifort (HRP) et le substrat est du TMB enhanced k blue. L'écart type est calculé sur trois valeurs.

III.1.1.2 Test ELISA en présence d'ions Mg^{2+}

Un test ELISA réalisé en présence d'ions soit magnésium soit calcium montre de manière claire comment le calcium favorise la liaison du phage-anticorps par rapport à des ions de magnésium connus pour déstabiliser la conformation en « egg-box » (Figure 13). A nouveau, le copolymère est mieux reconnu, ce qui n'est pas le cas du polyguluronate. Il est intéressant de souligner ici que l'utilisation de poly-L-lysine favorise bien la liaison des alginate au support, permettant une meilleure réponse.

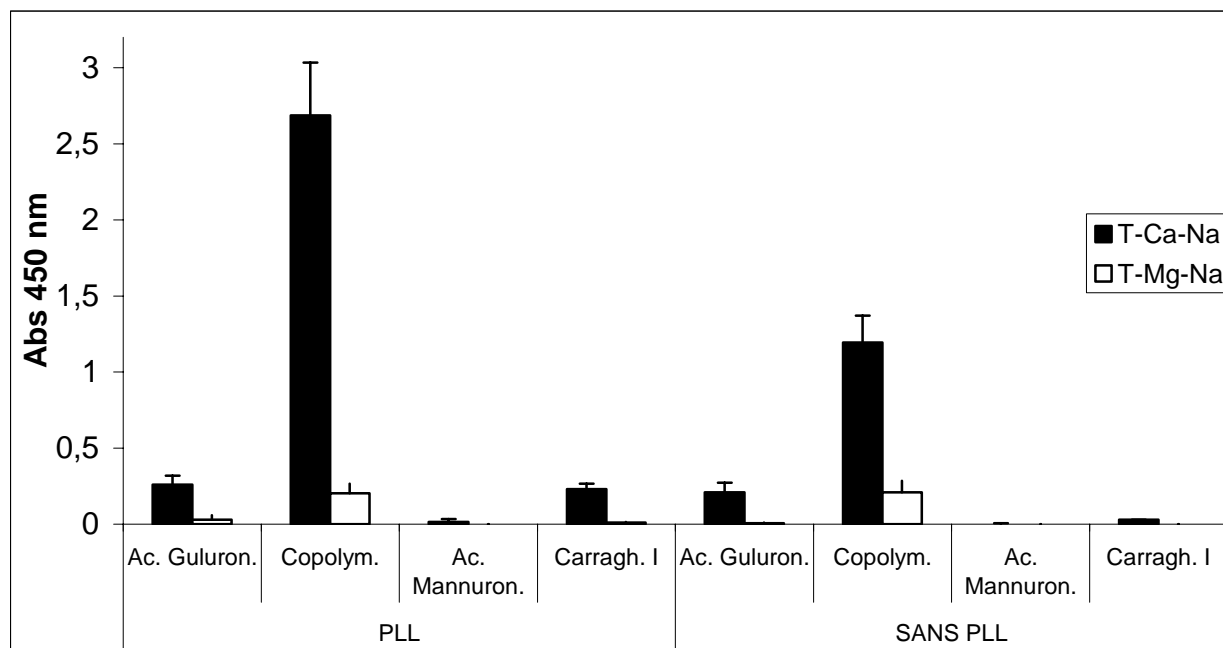


Figure 12 : Test ELISA indirect des phages D5 avec les tampons Tris-Mg-Na et Tris-Ca-Na contre différents types d'alginate ; l'anticorps secondaire anti-M13 est couplé à de la peroxydase de raifort (HRP) et le substrat est du TMB enhanced k blue. L'écart type est calculé sur trois valeurs.

III.1.1.3 Test ELISA en présence d'EDTA

Une dernière expérience a eu pour but de caractériser la sonde anti- alginate en présence d'EDTA, par comparaison au tampon habituel contenant des ions calcium Ca^{2+} . L'EDTA est un chélateur organique qui possède une affinité importante pour les ions bivalents, dont des métaux lourds. Dans notre cas, l'EDTA est intéressant car c'est un puissant chélateur des ions calcium. La présence d'EDTA en forte concentration (ici, à raison de 5mM) doit ainsi empêcher la formation de la structure en « egg-box » chez les pectines comme chez les alginate.

En absence de Poly-L-Lys, nous obtenons une réponse plausible : le phage-anticorps répond très bien sur le copolymère en tampon T-Ca-Na et, en présence d'EDTA, la réponse est plus faible. Par contre, les résultats obtenus en présence d'EDTA face au polymère immobilisé par la Poly-L-Lysine sont très semblables à ceux observés en présence des ions calcium (Figure 14). Pour expliquer cette dernière observation, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : le fait que nous n'ayons pas matériellement pu optimiser la concentration en phages recombinants pour ce type de test est peut-être responsable de la réponse trop élevée dans le

cas de l'EDTA en présence de PLL. Un argument en ce sens est le fait que l'absorbance des puits contenant le copolymère testé en T-Ca-Na est systématiquement au plateau maximum de détection. Une dilution de la solution de phages-anticorps aurait probablement ramené les lectures des puits traités à l'EDTA à des valeurs nettement plus faibles et compatibles avec l'hypothèse de la conformation en « egg-box ».

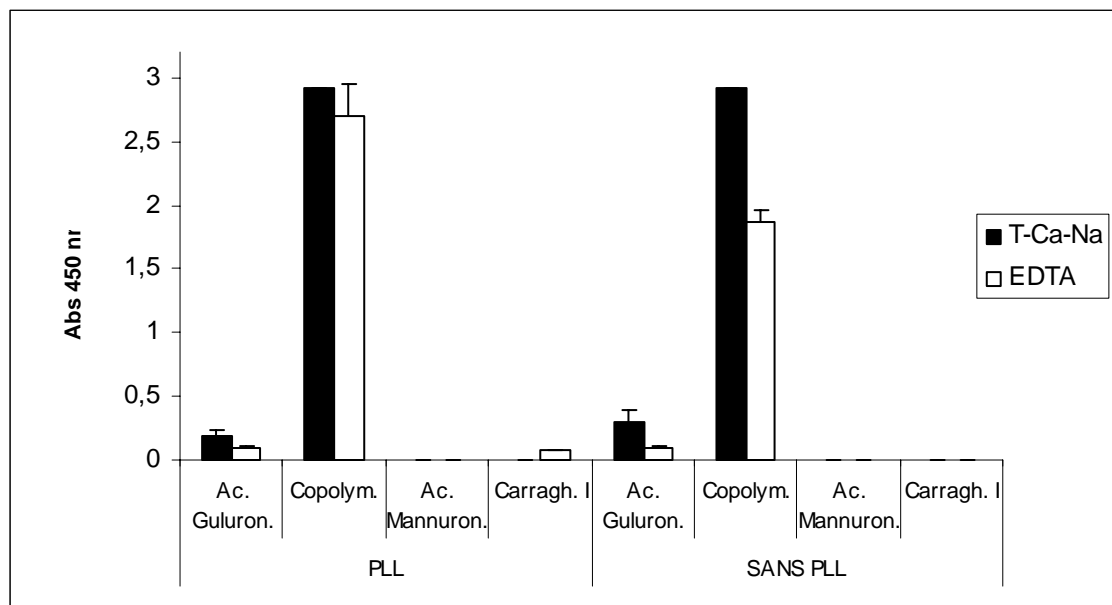


Figure 13 : Test ELISA indirect des phages D5 avec deux tampons différents, EDTA et Tris-Ca-Na contre différents trois types d'alginate et des carraghénanes iota comme contrôle négatif. L'anticorps secondaire anti-M13 est couplé à l'HRP et le substrat est du TMB enhanced k blue. L'écart type est calculé sur trois valeurs.

Notons une fois de plus que la réponse la plus élevée se situe au niveau des copolymères, et pas dans le cas de l'acide guluronique. Expliquer la réponse positive des phages-anticorps contre le copolymère de résidus guluroniques – mannuronique en présence d'ions calcium est *a priori* facile : le « panning » qui a permis l'isolement du clone D5 a été effectué avec le copolymère, ce qui explique la réponse systématiquement positive des phages D5 contre celui-ci. Valider l'hypothèse de la reconnaissance de la structure tridimensionnelle en boîte à œufs est raisonnable : les blocs homopolyguluroniques seuls capables d'adopter cette conformation en présence de calcium mais pas de magnésium sont présents dans le copolymère. Mais un problème plus délicat à résoudre est la non reconnaissance systématique de l'acide polyguluronique, seul censé former ces « egg-box » en présence de calcium.

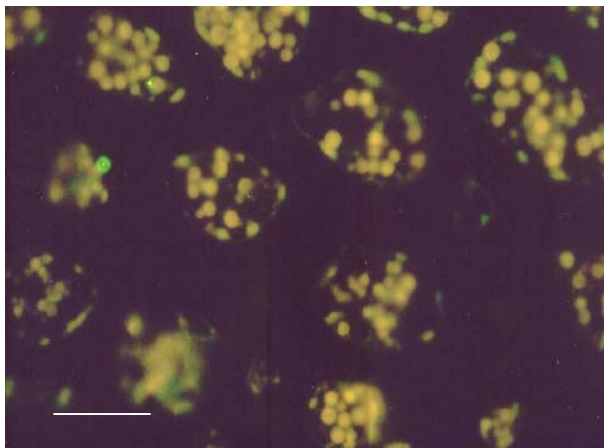
Pour trancher sur la nature précise de l'épitope reconnu, il est indispensable de connaître la composition exacte de chacun de ces polymères et d'en déduire leur conformation. Une première approche nécessiterait une hydrolyse spécifique des trois alginate, suivie d'une analyse détaillée en HPLC pour d'abord caractériser leurs teneurs en acides mannuroniques et guluroniques et déduire ensuite la présence effective de blocs homopolyguluroniques.

Une hypothèse envisageable serait que l'épitope reconnu comprenne mais ne se limite pas à une séquence guluronique en « egg-box ». Une hypothèse plus triviale reposerait sur une erreur d'identification de l'alginate polyguluronique ou sur sa dégradation lors du stockage.

III.1.1.4 Microscopie de coupes de *Fucus vesiculosus* marquées aux phages-anticorps

La microscopie optique de sections de *Fucus vesiculosus* marquées avec notre phage-anticorps anti-alginates D5 (Figure 15) confirme bien que les techniques d'immunofluorescence basées sur un phage sont inefficaces. On n'observe aucun marquage spécifique dans le contrôle négatif réalisé en absence du phage-anticorps anti-alginates D5 (Figure 15 a). Par contre, dans la figure 15 b, nous pouvons voir des agrégats fluorescents au centre de l'image. La localisation du marquage est faible et aléatoire sur toutes les coupes que nous avons obtenues. L'hétérogénéité de ce marquage nous amène à conclure à sa non-spécificité, non pas due intrinsèquement au fragment recombinant, mais bien à la taille du phage auquel elle est fusionnée.

La microscopie ne nous apporte donc pas beaucoup d'information, ni sur la localisation *in situ* de l'épitope, ni sur la spécificité de l'anticorps. Elle valide en fait notre démarche visant à l'obtention de la sonde sous forme soluble.



6,7 μm

Figure 14 a

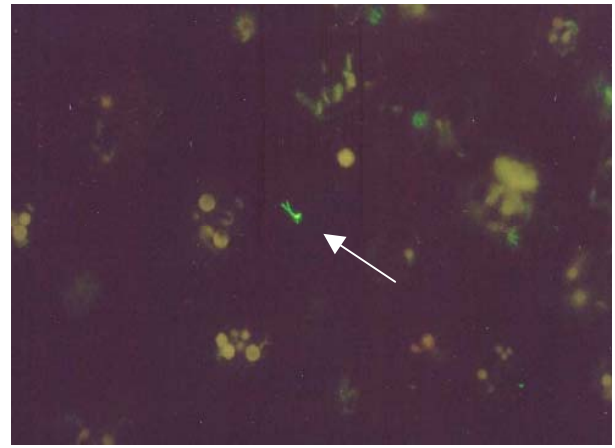


Figure 14 b

Figure 14 : La figure 15 a montre une coupe de *Fucus vesiculosus* comme contrôle négatif, à un grossissement de 40X ; la figure 15 b montre un marquage au phage anticorps D5 au même grossissement. Dans le centre de l'image, quelques phages forment des agrégats.

III.2 Production des anticorps solubles

Comme nous souhaitons obtenir des anticorps scFv solubles, nous avons utilisé différents protocoles de production dont les protéines produites ont été testées en ELISA. La mise en évidence de nos protéines a été réalisée par gel SDS-PAGE pour vérifier la présence et la localisation du produit. Des Western blots ont été possibles grâce au myc-tag présent sur le peptide recombinant et qui permet la détection par un anticorps secondaire anti-c-myc. Ces Western blots ont permis non seulement de vérifier la taille de la protéine recombinante qui doit être de 33 kDa, mais aussi le respect du cadre de lecture de la construction.

Nous avons d'abord suivi la même procédure que pour les phages : nous avons vérifié la présence de l'insert dans les colonies d' *E. coli* HB2151. Une PCR suivie d'une

électrophorèse sur gel d'agarose nous a permis de confirmer la présence d'un insert de bonne taille (Figure 16).

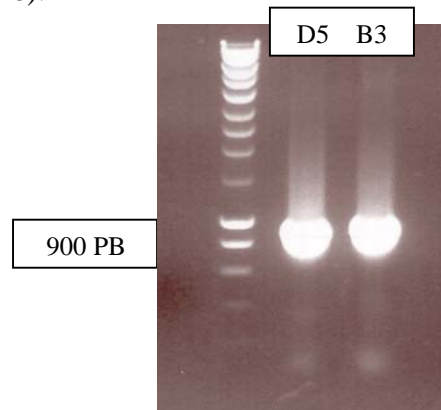


Figure 15 : Analyse sur gel d'agarose 1% des amplicons obtenues par PCR en utilisant des amorces spécifiques du vecteur phen SEQ et LMB3, sur souches d'*E. coli* HB2151.

Les protocoles de production suivants ont eu pour but de tester différents facteurs pouvant agir sur la production des scFv ainsi que sur leur activité. Ces facteurs sont : une température faible, qui permet une synthèse moins rapide et donc une efficacité accrue des mécanismes de repliement sous forme fonctionnelle des anticorps ; une concentration réduite en IPTG qui peut elle aussi limiter une synthèse trop forte des protéines, empêchant par là même l'adoption d'une conformation active ; la richesse du milieu qui a une influence sur la vitesse de croissance. Notons qu'une synthèse massive de protéines recombinantes peut aussi provoquer une toxicité chez la bactérie en formant des agrégats (Ghosh *et al.*, 2004).

Toutes ces conditions de production devaient donc favoriser une synthèse lente des anticorps, permettant aux systèmes de repliement d'agir avec une efficacité maximale. Nous verrons plus loin dans ce chapitre qu'après ces tests de synthèse, nous nous sommes focalisés sur la récupération de cette activité et nous avons tenté une dénaturation et une renaturation à partir des protéines natives ou de protéines dénaturées.

III.2.1 Optimisation de la production de sondes scFv

III.2.1.1 Production en conditions standard

A cet stade, nous avons tout d'abord sélectionné un protocole de production classique à 30°C (Liners *et al.*, 2005) qui a par ailleurs permis d'obtenir des sondes anti-carraghénanes iota Le test ELISA réalisé en PBS sur les protéines solubles dans le milieu (Figure 17) nous a clairement montré que les conditions de production n'étaient pas adéquates car l'activité de notre surnageant de culture du clone D5 était nulle, contrairement au clone B3 anti-carraghénanes.

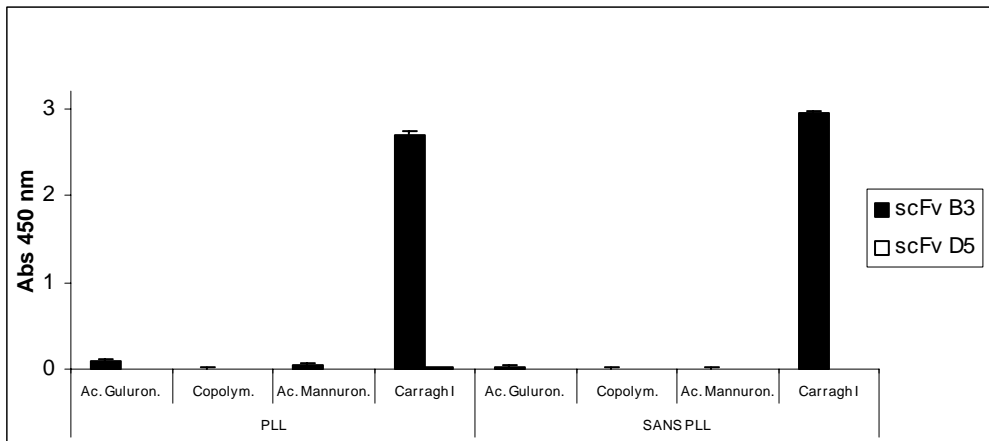


Figure 16 : Test ELISA indirect des protéines obtenues de manière soluble en suivant le protocole de Liners *et al.* (2005) à 30°C. Le surnageant du clone D5 est testé contre trois alginates et le scFv B3 sert de contrôle positif contre des carraghénanes. L'anticorps secondaire est un anticorps anti c-myc couplé à l'HRP. Pour la révélation, on utilise du TMB stabilized. L'écart type est calculé sur trois valeurs. Le tampon utilisé est du PBS à pH 7,2.

Un deuxième protocole de production à 28°C (Plückthun *et al.*, 1997) a été suivi et les tests en ELISA des surnageants de culture ont montré des résultats semblables au protocole précédent (Figure 18).

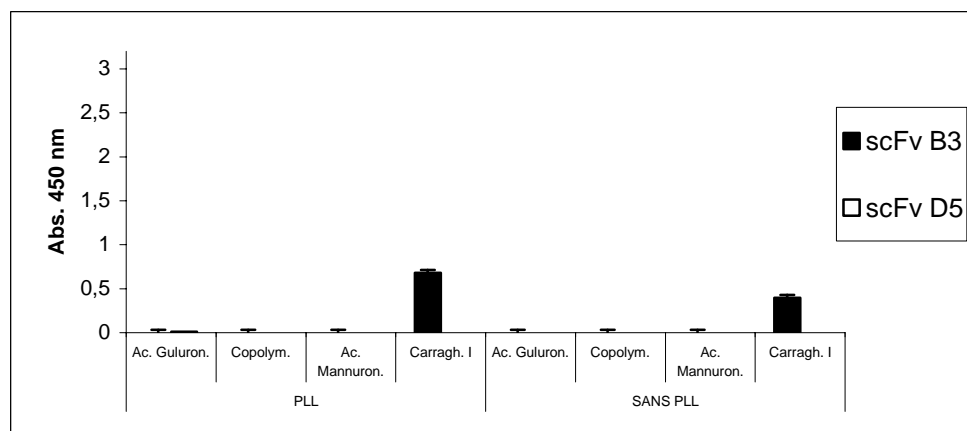


Figure 17 : Test ELISA indirect des protéines solubles obtenues du clone D5 selon le protocole Plückthun *et al.* (1997) à 28°C. Les scFv solubles du clone B3 sont utilisés comme contrôle positif contre des carraghénanes iota. L'anticorps secondaire est un anticorps anti c-myc couplé à l'HRP. Pour la révélation, on utilise du TMB stabilized. L'écart type est calculé sur trois valeurs. Le tampon utilisé est du PBS à pH 7,2.

Un troisième test ELISA en présence d'ions calcium (T-Ca-Na pH 7,2) plutôt que de PBS avec les protéines des surnageants de culture obtenus en suivant les deux protocoles précédemment cités et avec les phages-anticorps correspondants, confirme l'absence d'activité de reconnaissance (Figure 19). Nous n'avons pas poursuivi plus avant, estimant que les températures de production de ces deux protocoles étaient trop élevées pour permettre une synthèse des anticorps dans la bonne conformation.

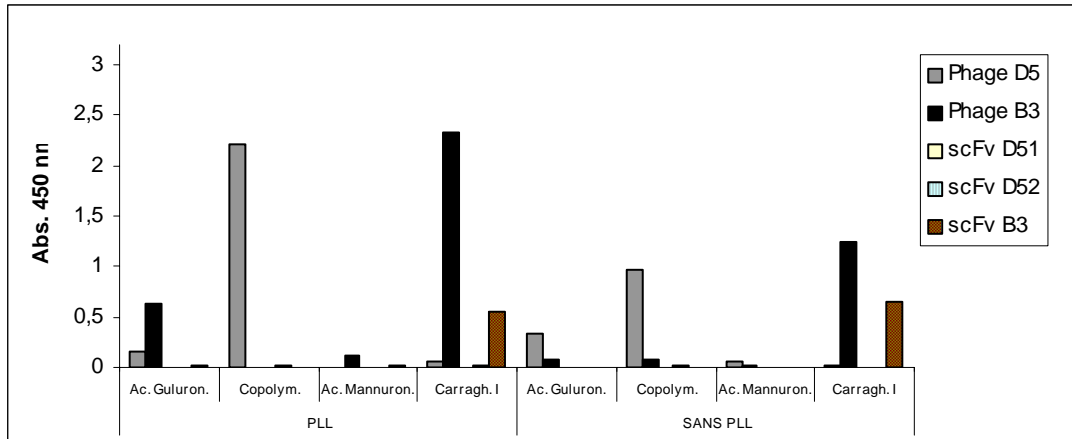


Figure 18 : Test ELISA indirect en T-Ca-Na pH 7,2 pour les protéines périplasmiques obtenues avec les protocoles de Liners à 30°C (D51) et Plückthun *et al.* (1997) à 28°C (D52) ; phage B3 comme contrôle positif contre des carraghénanes, protéines B3 (Plückthun) et D51 (Liners) et D52 (Plückthun) comme test contre des alginates; Un anticorps anti-c-myc couplé à l’HRP a été utilisé contre les protéines solubles et un anti-M13 contre les phages. Pour la révélation, on a utilisé le TMB stabilized, un substrat pour HRP. L’écart-type est calculé sur trois valeurs.

Nous nous sommes toutefois demandés si cette absence de réponse lors des tests ELISA n’était pas due à une concentration insuffisante en protéines d’intérêt dans le surnageant de culture, plutôt qu’à leur inactivité. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé un gel SDS-PAGE suivi d’un Western blot pour chacune des productions (figure 20).

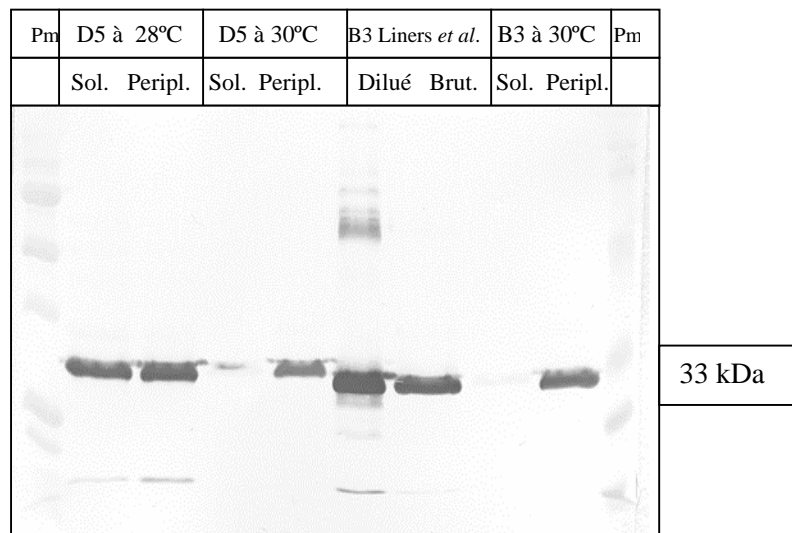


Figure 19 : Western Blot des protéines solubles (Sol.) et périplasmiques (Peripl.) produites à 28°C et à 30°C. « Pm » désigne les marqueurs de poids moléculaire. Mise en évidence avec un anticorps primaire anti-c-myc et un anticorps secondaire anti-souris couplé à la phosphatase alcaline. La révélation s’est faite avec NTB et BCIP.

Nous constatons qu'à 30°C, les protéines des clones tant D5 que B3 sont peu présentes sous forme soluble ; par contre, à 28°C les protéines sont toujours présentes, que ce soit en solution ou dans l'espace périplasmique. La température joue donc bien un rôle important sur la quantité et la localisation des protéines produites.

III.2.1.2 Production à faible température

Nous avons alors décidé de travailler à des températures plus faibles pour la production des anticorps. Le protocole suivi (Zheng *et al.*, 2003) préconise une culture à 22°C et à une concentration en IPTG de 1mM. Encore une fois, nous avons constaté en ELISA l'absence d'activité de nos sondes aussi bien pour la fraction soluble que pour la fraction périplasmique (Figure 21). Par contre, nous avons observé avec surprise que les scFv anti-carraghénanes iota solubles dans le milieu de culture avaient une activité élevée par rapport à des expériences précédentes. Ce résultat confirme bien que les conditions de production optimales sont fonction de chaque type d'anticorps, et qu'il n'existe pas de règle générale pour arriver à une production suffisante de sonde active.

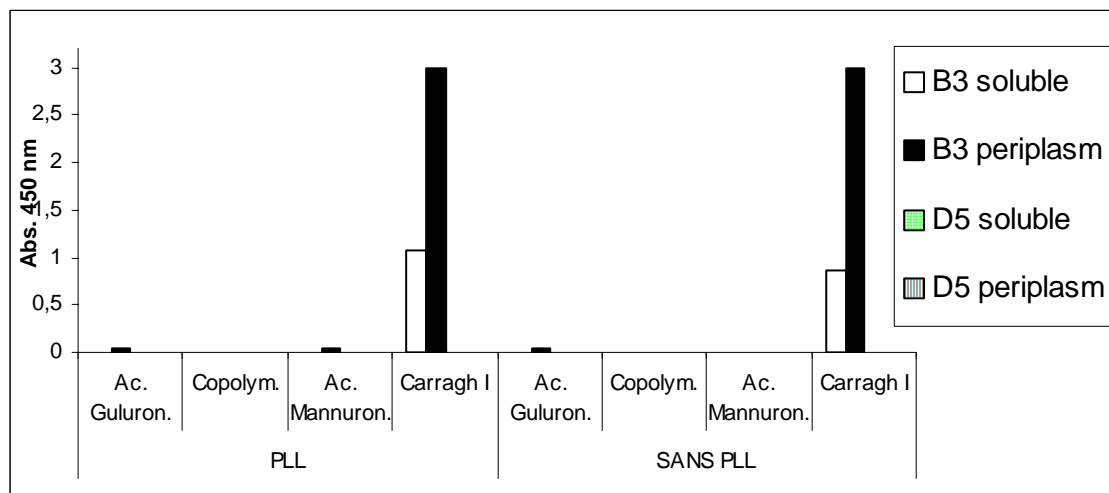


Figure 20 : Test ELISA indirect pour des protéines produites en suivant le protocole de Zheng à 22°C. Le clone D5 produit des anticorps anti-alginates en fractions soluble et périplasmique, et le clone B3 produit des anticorps anti-carraghénanes iota, utilisés comme contrôle positif.

Purification sur colonne nickel des protéines solubles produites à 22°C

A ce stade de notre démarche, nous avons jugé opportun de tenter une purification sur colonne nickel des protéines solubles obtenues à 22°C et d'essayer de les renaturer.

Cette purification est possible grâce à l'étiquette poly-hys que possède notre phagemide. Comme cette étiquette se trouve à l'extrémité C-terminale de notre protéine, nous sommes certains que, quelle que soit la conformation tridimensionnelle de notre protéine, celle-ci s'accrochera à la colonne. De plus, comme la souche *E. coli* utilisée ne possède pas de tel tag, notre protéine sera la seule à se fixer sur la colonne, permettant sa purification directe. Dans le tampon, il faut noter la présence d'imidazole que nous avons utilisé en quantités croissantes pour favoriser la solubilisation de la protéine.

Après avoir récolté les différentes fractions obtenues, nous avons procédé à un test d'activité par ELISA en tampon T-Ca-Na (Figure 22) et en tampon PBS (Figure 23). Une fois de plus, nous n'avons observé aucune activité spécifique de la sonde.

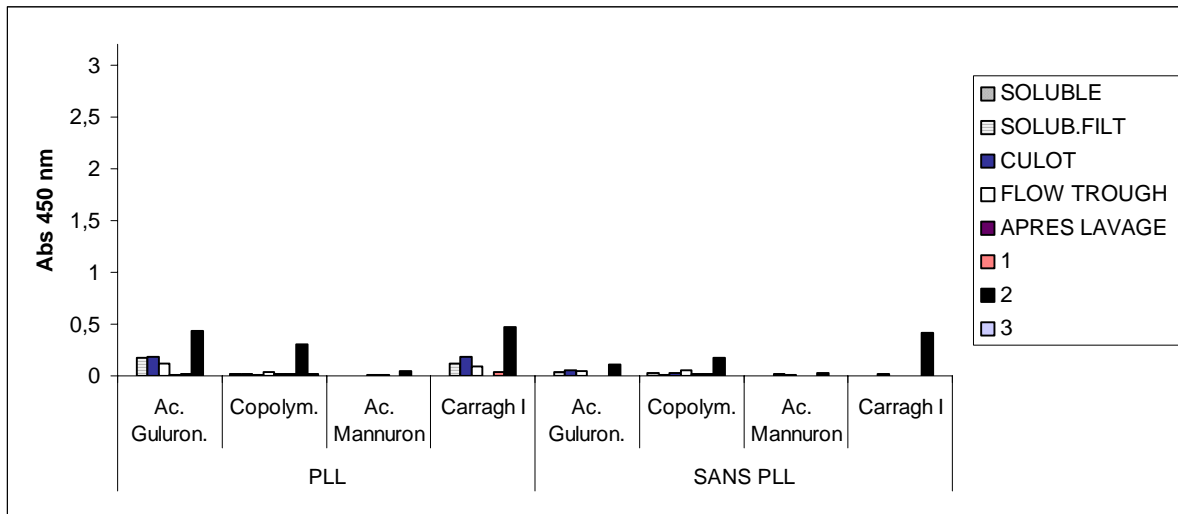


Figure 21 : Test Elisa indirect en tampon T-Ca-Na à pH 7,2 avec des protéines du clone D5 produites selon le protocole de (Zheng *et al.*, 2003) à 22°C et purifiées sur colonne de nickel. Les échantillons 1, 2 et 3 sont des fractions sériées obtenues par élution avec le tampon. Les protéines ont été testées contre trois types d'alginate. La détection a été effectuée par un anticorps primaire anti-c-myc suivi d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à de l'HRP. Pour la révélation, on a utilisé du TMB stabilisé.

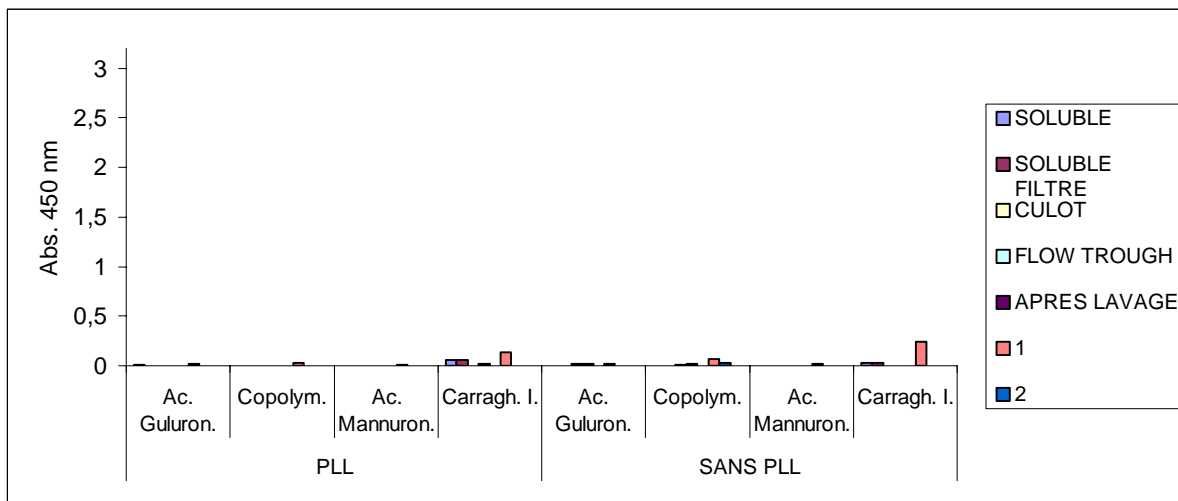


Figure 22 : Test ELISA indirect en tampon PBS à pH 7,2 avec des protéines du clone D5 produites dans le surnageant selon le protocole de (Zheng *et al.*, 2003) à 22°C et purifiées sur colonne de nickel. 1, 2 et 3 sont des fractions sériées après élution par le tampon. Les protéines ont été testées contre différents types d'alginate. Détection par un anticorps primaire anti-c-myc suivi d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à HRP. Pour la révélation, on utilise le TMB stabilized, un substrat pour HRP.

Au vu de ces résultats négatifs en ELISA, nous avons voulu nous assurer de la présence de notre protéine dans l'éluat, en effectuant un gel SDS-PAGE. Celui-ci montre (Figure 24) que la protéine est bien présente à 33 kDa, ce qui prouve que les résultats négatifs sont effectivement dus à une absence d'activité de la protéine.



Figure 23 : Electrophorèse en gel SDS- PAGE 1% des protéines produites à 22°C selon le protocole de Zheng (2003) et purifiées sur colonne nickel. Les pistes 1 et 10 représentent les marqueurs de poids moléculaire (Bio rad réf. 161-0318) ; en piste 2, le culot ; en 3, la fraction soluble dans le surnageant ; en 4 la même fraction soluble filtrée (porosité du filtre 0,22 μm) ; en 5 le flow through de la colonne ; en 6, la deuxième fraction après le rinçage ; en 7, 8 et 9, les fractions sériées récoltées lors de l'élution par le tampon.

La protéine recombinante est donc bien présente dans le surnageant, mais elle est inactive. Cette tentative de renaturation des protéines scFv n'étant pas a priori efficace, nous avons poursuivi nos essais de production dans différentes conditions expérimentales. Après avoir testé de faibles températures, nous avons suivi un protocole qui combine différents milieux et différentes températures.

III.2.1.3 Production sous différents milieux et températures

Le protocole suivant (Robert et al., 2004) a ainsi été utilisé pour comparer trois milieux : LB, TB et 2XTY. La stratégie consistait à tenter d'obtenir une production différentielle des protéines en se basant sur le postulat que plus un milieu est riche, plus la production de protéines recombinantes devrait être rapide.

LB est à cet égard le milieu le moins riche, TB le plus riche et 2XTY est intermédiaire. Le milieu 2XTY a, en plus, comme particularité une pression osmotique élevée due à sa forte concentration en saccharose. Cette forte concentration induit la sécrétion d'osmoprotecteurs comme le glycérol, qui peuvent aider au bon repliement de la protéine. En ce qui concerne la

température, on estime de prime abord que la production des anticorps va être plus rapide à 37°C qu'à 25°C.

Le test ELISA pour chacune de ces productions en présence d'ions calcium a donné des résultats négatifs (non présentés). Le Western blot, quant à lui (Figure 25), montre la présence des protéines scFv au niveau périplasmique et sous forme soluble. Ces résultats semblent également conforter l'hypothèse du rôle de la température sur la quantité de protéine produite. En effet, si cette méthode ne permet pas de quantification, la taille des spots protéiques indique une meilleure production à 25°C qu'à 37°C. Nous devons toutefois rester prudents vu que cette technique est une technique de détection des protéines, et non de quantification.

Ces résultats nous montrent aussi que le milieu moins riche (LB dans notre cas) favorise la production de protéines recombinantes en quantité plus élevée. En revanche, le milieu 2XTY avec saccharose ne donne pas d'indication significative quant à l'éventuelle influence de la pression osmotique dans le processus de synthèse des protéines.

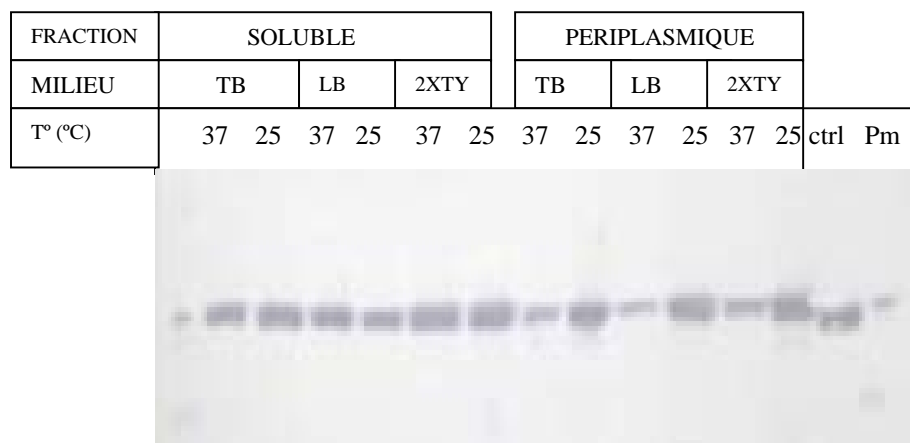


Figure 24 : Analyse par Western blot des fractions protéiques solubles et périplasmiques obtenues suite à la culture des bactéries D5 HB2151 dans différents milieux (TB, LB, 2XTY) sous différents températures (37 et 25°C) selon le protocole de Robert, 2004. Mise en évidence de la présence de ScFv par marquage du blot avec un anticorps primaire anti-c-myc et un anticorps secondaire anti-souris couplé à la phosphatase alcaline. Révélation avec NTB et BCIP. Contrôle positif : fraction périplasmique préparée à partir de cultures bactériennes de B3 - HB2151.

III. 2.1.4 Production sous différents milieux, températures et concentrations d'IPTG

La dernière expérience de production a permis de tester trois variables : la température, la concentration en IPTG et la nature du milieu de production (Pung et al., 2005). Les températures de production de protéines choisies étaient 16°C et 25°C. Deux concentrations d'IPTG, à savoir 0,1 et 1 mM ont été testées dans deux types de milieu, soit LB et LB Lennox.

Si l'ELISA effectué avec les protéines périplasmiques et solubles ne donne aucune réponse (résultats non présentés), ni en PBS ni en présence d'ions calcium, le Western Blot nous renseigne quant à l'influence du milieu moins riche (LB Lennox) et de la concentration en IPTG (figure 26).

Les résultats confortent deux hypothèse déjà formulées suite au Western blot de la figure 14 : on constate que la taille des spots protéiques est nettement plus importante à 16°C qu'à 25°C, et que la quantité de protéines produites est inversement proportionnelle à la richesse du milieu. Une autre information découle également de ces résultats : il semble que la concentration en IPTG de 0,1 mM soit plus bénéfique que celle de 1 mM, au moins en milieu LB Lennox.

Milieu	LB Lennox				LB normal							
Fraction	Périplasmique		soluble		Périplasmique			soluble		ctrl		
IPTG (mM)	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	B3	
T° (°C)	25	25	16	16	16	25	25	16	16	16	16	peripl.



Figure 25 : Analyse par Western blot des fractions protéiques solubles et périplasmiques obtenues suite à la culture des bactéries D5 HB2151 dans différents milieux (LB, et LB Lennox) sous différentes températures (16 et 25°C) et concentrations en IPTG (1 et 0,1 mM) selon le protocole de Pung (2005). Mise en évidence des ScFv par détection avec un anticorps primaire anti-c-myc et un anticorps secondaire anti-souris couplé à la phosphatase alcaline. Révélation avec du NTB et BCIP. Contrôle positif : fraction périplasmique préparée à partir de cultures bactériennes de B3 - HB2151.

Une production abondante de protéines ayant été obtenue sur milieu Lennox et à 16°C, une renaturation des protéines synthétisées a été à nouveau tentée en utilisant une fois encore un protocole de purification sur une colonne nickel, mais en conditions dénaturantes obtenues par une concentration 6M en guanidine HCl. La guanidine-HCl est une molécule de faible poids moléculaire, qui peut agir comme l'urée en et permettre après élimination la renaturation éventuelle de la protéine. La renaturation a été tentée à l'aide de la dialyse avec des quantités décroissantes d'hydrochlorure de guanidine (Sinacola, 2002).

Les résultats des tests ELISA en conditions calcium pour les protéines renaturées de cette façon nous donnent une réponse peu significative (Figure 27). La réponse élevée de B3 contre l'acide guluronique peut être due au fait que nous n'avons pas optimisé la *concentration des anticorps*.

En effet, les alginates comme les carraghénanes, sont fortement chargés négativement. Une non optimisation des anticorps au niveau de concentration peut provoquer une réponse aberrante comme celle que l'on observe sur la figure 27 et causée par des interactions électrostatiques, la sonde étant elle-même potentiellement chargée positivement.

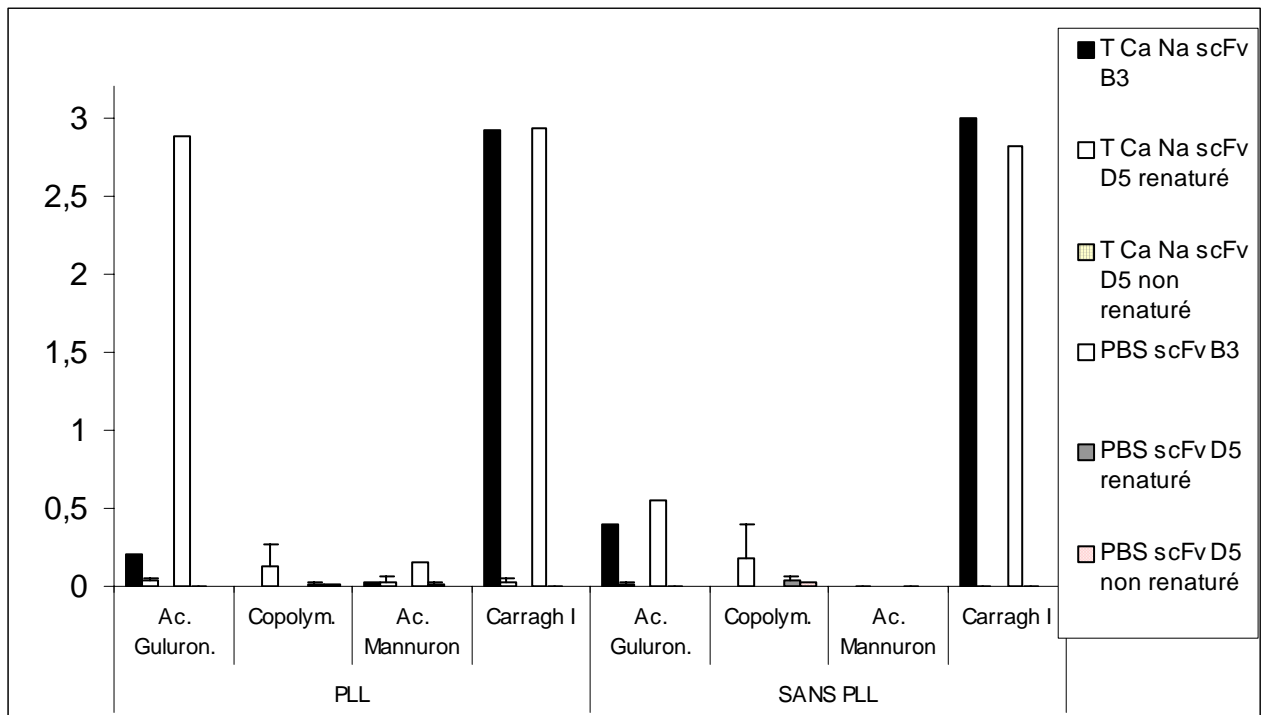


Figure 26 : Test ELISA indirect avec les anticorps obtenus en suivant le protocole de purification sur colonne Ni en conditions dénaturantes (Novagen His.Bind Kits) et dialyse progressive contre de la guanidine HCl en concentrations décroissantes (Sinacola). Anticorps anti-c-myc pour détecter les scFv et anticorps anti-souris couplé HRP pour détecter ce dernier. Pour la révélation, on a utilisé du TMB stabilisé. Les écarts types ont été calculés pour trois valeurs de D5.

IV. Conclusions

IV.1 Phages recombinants anti-alignates

La réalisation, en parallèle, de tests ELISA et de gels SDS-PAGE comme méthodes de mesure de l'activité et de la présence de la sonde recombinante du clone D5, constituent des outils adéquats pour tester l'activité des anticorps.

La reconnaissance systématiquement plus élevée du copolymère d'alginate par rapport à l'acide guluronique est due au fait que la banque a été enrichie avec le copolymère.

Au-delà des problèmes rencontrés avec l'EDTA, il est clair que les ions calcium Ca^{2+} favorisent la reconnaissance par les phages recombinants d'une structure qui est probablement celle en «egg-box». Inversement, la présence d'ions magnésium Mg^{2+} empêche toute reconnaissance des alginates, ce qui confirme l'interprétation proposée quant à la conformation en «boîtes à œufs». La reconnaissance du rapport G/M chez le copolymère ne nous permet toutefois pas d'affirmer catégoriquement que l'effet des ions calcium est dû à la seule formation d'«egg-box»: d'autres structures, présentes dans le copolymère, pourraient faire partie de l'épitope reconnu par notre sonde. Pour ce qui concerne spécifiquement les tests en présence d'EDTA, la première hypothèse que nous favorisons est celle d'un manque d'optimisation de la concentration de nos phages pour le test ELISA.

Une analyse chimique de l'acide guluronique utilisé dans nos tests nous permettra à cet égard le trancher plus sûrement quant à la nature exacte de l'épitope reconnu par notre phage D5.

La microscopie basée sur les phages-anticorps n'a pas donné de résultats probants. Les phages formant des structures trop grandes pour cette technique, leur utilisation n'a pas permis de localiser précisément les alignates dans les coupes de différents organes de *Fucus vesiculosus*. La production de fragments scFv sous forme soluble pouvant se révéler un outil avantageux pour l'immunocytochimie, nous avons ainsi tenté de produire les sondes sous forme soluble, non fusionnées à la protéine PV de capsid du phage.

IV.2 Anticorps solubles anti-alginates

Après avoir testé différents protocoles de production, nous arrivons à la conclusion qu'une faible température joue un rôle important pour la production des sondes sous forme soluble, tout comme une richesse limitée du milieu dans lequel ces sondes sont produites.

Néanmoins la synthèse et la sécrétion des scFv solubles dans le milieu posent problème en ce qui concerne la reconnaissance de leurs épitopes, malgré nos tentatives de renaturer les protéines produites.

Le temps nous a manqué pour tester suffisamment de solutions tampon connu pour favoriser l'oxydation des cystéines, nécessaire au repliement. De tels tampons sont souvent composés de thiols, glutathion oxydé, paires cystéine/cystéine, cystéine/cystéamine et DTT/glutathion oxydé. Reconnaissons toutefois qu'obtenir des anticorps actifs à partir de corps d'inclusion n'est pas aisé.

Notre conclusion générale est que si nos phages anti-alginates constituent des sondes intéressantes pour la reconnaissance en ELISA d'un type précis de polymère, leur utilisation en immunocytochimie est impossible. L'obtention de sondes scFv solubles est à cet égard un passage obligé, mais qui se heurte à des difficultés réelles en ce qui concerne la structure tridimensionnelle des protéines recombinantes obtenues sous forme soluble.

Un effort doit donc être poursuivi visant à obtenir de telles sondes anti-alginates scFv solubles, contre des alginates finement caractérisés.

V. Perspectives

V.1 En ce qui concerne les phages anticorps

Ayant déjà fait l'objet de nombreuses recherches, les phages anticorps antialginates ont probablement livré la majorité de leurs secrets. Dans notre cas, il serait toutefois essentiel de caractériser les liaisons spécifiques des phages avec les alginates, mais il serait également utile de déterminer la proportion G-M du copolymère.

L'optimisation de la concentration du phage utilisé dans les tests ELISA par le biais d'une courbe de calibration devrait nous éviter des problèmes tels que des réponses non spécifiques observées par exemple dans nos tests en présence d'EDTA.

V.2 Dans le cas des sondes scFv produites sous forme soluble :

L'utilisation des sondes scFv sous forme soluble constitue un outil très puissant et intéressant par rapport aux phages recombinants. La littérature indique plusieurs stratégies pour la production de sondes actives :

1. L'expression des sondes recombinantes sous forme de corps d'inclusion. Elle peut se révéler avantageuse, d'abord parce qu'elle permet une production abondante de protéines sous forme hautement enrichie, et ensuite parce que ces protéines précipitées dans des agrégats sont protégées contre la dégradation protéolytique.
Ces corps d'inclusion peuvent être ensuite extraits par homogénéisation des cellules sous haute pression ou grâce au lysozyme, et différents détergents et agents dénaturants peuvent solubiliser les protéines des agrégats. Enfin, un processus contrôlé de renaturation peut permettre de rétablir des ponts disulfures corrects dans la protéine et ainsi récupérer une capacité normale de reconnaissance des épitopes. Nous avons vu les limites de cette stratégie.
2. La stratégie générale que nous préconisons est basée sur une production limitée des anticorps solubles, par une température de production plus faible et un milieu moins riche. Une telle production évite les problèmes de toxicité qui peuvent interférer avec la croissance bactérienne (Zahn *et al.*, 1999). Elle permet souvent de prévenir l'agrégation des protéines recombinantes. La littérature indique toutefois que le succès de cette approche n'est pas évident, étant donné que le processus d'agrégation est très rapide et entre en compétition avec la renaturation, étant provoqué par des interactions hydrophobes et par la non formation de ponts disulfures intramoléculaires (Gosh *et al.*, 2004)
3. Diminuer le caractère réducteur du cytoplasme par le biais de molécules comme le glutathion peut permettre d'obtenir des sondes actives. Le problème est alors que la protéine localisée dans le cytoplasme peut être soumise à dégradation
4. Il pourrait être intéressant d'essayer de moduler la synthèse de protéines recombinantes chez *E. coli* en activant son système de transport de Gly-Gly. Le dipeptide glycine-glycine peut intervenir dans le mécanisme de repliement de la protéine (Gosh *et al.*, 2004). Trois hypothèses pourraient expliquer ce mécanisme :
 - la glycine-glycine agirait elle-même comme chaperonne
 - elle déclencherait la synthèse des chaperonnes
 - elle agirait directement sur la cellule. En effet, la glycine-glycine en concentration élevée (de 100mM à 1M) serait activement transportée du milieu vers la cellule. L'énergie dépensée pour ce transport actif ne pourrait être utilisée pour la synthèse de protéines (Ghosh *et al.*, 2004).
5. Une induction intermittente avec de l'IPTG peut aussi agir sur le repliement correct de la protéine. Une synthèse cyclique (alternance d'inductions et de pauses) permettrait en effet aux systèmes du repliement des protéines d'agir plus efficacement (Shi *et al.*, 2002)

6. Une approche concevable consisterait à ajouter des chaperonnes, principaux assistants dans le repliement des protéines, directement au milieu de culture, mais rares sont les laboratoires qui les fabriquent, et ils ne sont pas disponibles commercialement. L'induction de la synthèse de chaperonnes, par exemple par un choc osmotique qui peut s'obtenir avec de fortes concentrations en saccharose, constitue une approche pour la synthèse des chaperonnes qui pourrait être exploitée
7. Le séquençage de l'anticorps et la comparaison avec des séquences d'autres anticorps et de leurs conditions d'obtention optimales peuvent s'avérer une démarche très lourde, sans garantie de trouver une relation fiable entre la séquence et un protocole de production
8. Il serait finalement intéressant de cloner la séquence correspondant au scFv D5 dans un vecteur pourvu d'un site de clivage protéique entre la séquence du scFv et celle de la protéine pIII du phage, ceci permettant l'hydrolyse et la libération des scFv directement au départ de phages recombinants

VI. Bibliographie

- Belin, P., Dassa, J., Drevet, P., Lajeunesse, E., Savatier, A., Boulain, J. C. & Menez, A. Toxicity-based selection of *Escherichia coli* mutants for functional recombinant protein production: application to an antibody fragment. *Protein Engineering Design & Selection* 17, 491-500 (2004).
- Bejorn, E. Christensen, 2002 <http://www.ordibo.be/scm/christensen.pdf>
- Bernal, A. J. & Willats, W. G. Plant science in the age of phage. *Trends Plant Science* 9, 465-8 (2004).
- Bhandari, P. & Gowrishankar, J. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *Journal of Bacteriology* 179, 4403-4406 (1997).
- Borde, N. 2002 <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/operonlactose/>
- Boyland, E. Chemical influences on behavior. Chairman's closing remarks. *Ciba Found Study Group* 35, 211-3 (1970).
- Brichta, J., Vesela, H. & Franek, M. Production of scFv recombinant fragments against 2,4-dichlorophenoxyacetic acid hapten using naive phage library. *Veterinarni Medicina* 48, 237-247 (2003).
- Chavagnat, F., Duez, C., Guinand, M., Potin, P., Barbeyron, T., Henrissat, B., Wallach, J. & Ghuysen, J. M. Cloning, sequencing and overexpression in *Escherichia coli* of the alginate-lyase-encoding gene of *Pseudomonas alginovora*: Identification of three classes of alginate lyases. *Biochemical Journal* 319, 575-583 (1996).
- Chi, E.-S., Henri, E.C., Kawai, H. & Okuda, K. Immunogold-labeling analysis of alginate distributions in the cell walls of chromophyte algae. *Phycological research* 53 (1999).
- Cowell, J. L. Energetics of Glycylglycine Transport in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 120, 139-146 (1974).
- Dalla, E., <http://www.monografias.com/trabajos12/alginato/alginato.shtml> (2000)
- Devi, V. S., Binz, H. K., Stumpp, M. T., Pluckthun, A., Bosshard, H. R. & Jelesarov, I. Folding of a designed simple ankyrin repeat protein. *Protein Science* 13, 2864-2870 (2004).
- De Bernardez Clark, E. Protein Refolding for Industrial Processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12 202-207. (2001)
- Dietrich, A., Rudolph, R., Schäffner, F., *BIOforum Europe* (2003). 34-36
http://www.scilproteins.de/789001/Uploaded/Download_protein_folding.pdf
- Donati, I., Holtan, S., Morch, Y. A., Borgogna, M., Dentini, M. & Skjak-Braek, G. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules* 6, 1031-40 (2005).
- Draget, K. I., Strand, B., Hartmann, M., Valla, S., Smidsrod, O. & Skjak-Braek, G. Ionic and acid gel formation of epimerized alginates; the effect of Alge4. *International Journal of Biological Macromolecules* 27, 117-122 (2000).
- Dubnovitsky, A. P., Kravchuk, Z. I., Chumanovich, A. A., Cozzi, A., Arosio, P. & Martsev, S. P. Expression, refolding, and ferritin-binding activity of the isolated VL-domain of monoclonal antibody F11. *Biochemistry-Moscow* 65, 1011-1018 (2000).
- Dubois, P (http://www.univ-tours.fr/PIMIR/fr_colloidal.htm#alginates) (2002)
- Dûbel, F. B., S. Recombinant antibodies. pg. 1-14 et 34-42. *John.* (1999).
- Fernandez, L. A., Sola, I., Enjuanes, L. & de Lorenzo, V. Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5024-+ (2000).

- Gavilondo JV, Larrick JW.. Antibody Engineering at the millenium. *Biotechniques*. 1:128-32, 134-6, 138 (2000).
- Ghosh, S., Rasheedi, S., Rahim, S. S., Banerjee, S., Choudhary, R. K., Chakhaiyar, P., Ehtesham, N. Z., Mukhopadhyay, S. & Hasnain, S. E. Method for enhancing solubility of the expressed recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechniques* 37, 418-+ (2004).
- Ghuysen, J.-M. Chavagnat F, Duez C, Guinand M, Potin P, Barbeyron T, Henrissat B, Wallach J., Cloning, sequencing and overexpression in *E. coli* of the alginate-lyase -encoding aly gene of *Pseudomonas alginovora*: Identification of three classes of alginate lyases. *Journal of Biochemistry* 319, 575-83 (1996).
- Guo, L. e. c. Selected and expressing protective single-chain Fv fragment to stabilize L-asparaginase against inactivation by trypsin. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31, 21-27 (2000).
- Gupta, M. N. Three phase partitioning of carbohydrate polymers: separation and purification of alginates. (2001).
- Hinfray, J. Le phage display. *Biofutur. Le Technoscope* 182 (1998).
- Hiroshi, Y. Bacterial biofilms and infectious diseases. *Glycotechnologie*. 8: 409-417 (1996)
- Hunke S, Betton JM. Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 50(5):1579-89 (2003).
- Hugo, N., Lafont, V., Beukes, M. & Altschuh, D. Functional aspects of co-variant surface charges in an antibody fragment. *Protein Science* 11, 2697-2705 (2002).
- Karlheinz P., M. Justin Graeber, BS; Sergey Kipriyanov, PhD; Monika Zewe-Welschhof, PhD; Marschall S. Runge, MD, PhD; Wolfgang Kübler, MD; Melvyn Little, PhD; Christoph Bode, MD. Construction and Functional Evaluation of a Single-Chain Antibody Fusion Protein With Fibrin Targeting and Thrombin Inhibition After activation by Factor Xa. *Journal American College Cardiol.*;33:2A. (1999)
- Larsen, B., Vreeland, V. and Laetsch, W.M. Assay-dependent specificity of a monoclonal antibody with alginate. *Carbohydr. Res.* 143, 221-227.
- LI, Y. Y. Q. Ding, P. C. K. Cheung, P. O. Ang, Jr, and V. E. C. Characterization of water-soluble polysaccharides (alginates) from subtropical brown seaweed Ooi, Department of Biology & Food and Nutritional Sciences Program, The Chinese Univ. of Hong Kong, (1999) (<http://ift.confex.com/ift/99annual/techprogram/abstracts/3633.htm>)
- Lei Zheng, U. B. e. J.-L. R. Production of a Functional Catalytic Antibody ScFv-NusA Fusion Protein in Bacterial Cytoplasm. *Journal of Biochemistry* 133, 577-581 (2003).
- Li Gan, X. L. X., Jing Li, Hai Y. Liu, Zhen Q. Zhang, Jin Quian, Jian Ding, Mei Y Geng. Characterization of conformational epitope of alginate-derived polymannuronates by surface plasmon resonance. *Biochimie* (2005) à paraître.
- Liners, F, Letesson, J-J, Didembourg, C., Van Cutsem, P. Monoclonal Antibodies against Pectin. *Plant Physiology*. 91 1419-1424 (1989).
- Liners, F., Bert W., Van Cutsem P. Production and characterization of a phage-display recombinant antibody against carrageenans. Evidence for the recognition of a secondary structure of carrageenan chains present in red algae tissues. *Glycobiology*, *in press* (2005)
- Llorca, O., Martin-Benito, J., Gomez-Puertas, P., Ritco-Vonsovici, M., Willison, K. R., Carrascosa, J. L. & Valpuesta, J. M. Analysis of the interaction between the eukaryotic chaperonin CCT and its substrates actin and tubulin. *Journal of Structural Biology* 135, 205-218 (2001).

- Martineau, P. & Betton, J. M. In vitro folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected in vivo for high expression levels in *Escherichia coli* cytoplasm. *Journal of Molecular Biology* 292, 921-929 (1999).
- Marzari, R., Sblattero, D., Florian, F., Tongiorgi, E., Not, T., Tommasini, A., Ventura, A. & Bradbury, A. Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *Journal of Immunology* 166, 4170-4176 (2001).
- McHugh, J. (<http://www.fao.org/docrep/X5822E/x5822e04.htm#chapter%20%20%20%20production,%20properties%20and%20uses%20of%20alginates>)
- Nelson et Kretcher (<http://www.refer.mg/cours/wcl/wbalg/pages/p13.htm>)
- Oganesyan, N. On-column Chemical Refolding of Proteins. *PharmaGenomics* (2004).
<http://www.pharmagenomicsonline.com/pharmagenomics/article/articleDetail.jsp?id=119059>
- Plückthun, A. The hierarchy of mutations influencing the folding of antibody domains in *Escherichia coli*. *Protein Engineering Design & Selection* 12, 605-611 (1999).
- Plückthun, A. Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. *Protein Engineering* 10, 959-966 (1997).
- Pung, Y. F., Wong, P. T. H., Kumar, P. P., Hodgson, W. C. & Kini, R. M. Ohanin, a novel protein from king cobra venom, induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice. *Journal of Biological Chemistry*, M <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/anticuerpos.htm#Anticuerpos> (2003)
- Rippmann, J. F., Klein, M., Hoischen, C., Brocks, B., Rettig, W. J., Gumpert, J., Pfizenmaier, K., Mattes, R. & Moosmayer, D. Prokaryotic expression of single-chain variable-fragment (scFv) antibodies: Secretion in L-form cells of *Proteus mirabilis* leads to active product and overcomes the limitations of periplasmic expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4862-4869 (1998).
- Robert, R., Noubhani, A. M., Jacobin, M. J., Santarelli, X. & Clofent-Sanchez, G. Improvement in production and purification bioprocesses of bacterially expressed anti-alphaII-beta3 human single-chain Fv antibodies. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 818, 43-51 (2005).
- Sano, Y. Antiviral activity of alginate against infection by tobacco mosaic virus. *Carbohydrate polymers* 38, 183-186 (1998)
- Schumman, W. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology* 27, 442-453 (2004).
- Shi, X. Z., Karkut, T., Chamankhah, M., Alting-Mees, M., Hemmingsen, S. M. & Hegedus, D. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 28, 321-330 (2003).
- Shinn, Annie H., Pharm.D., Timothy J. Smith, Ph.D.
(<http://or-live.mediwire.com/main/Default.aspx?P=Content&ArticleID=76591>) (2003)
- Sidhu, S. S. Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering* 18, 57-63 (2001).
- Sinacola, J. High Pressure Treatment to Reverse and prevent Single-chain Antibody Aggregation.
http://www.che.udel.edu/research_groups/robinson/scfvresearch.html (2001).
- Steinbüchel, A., De Baets, S., Van Damme, E.J. (eds), *Biopolymers 6: Polysaccharides II: Alginates from Algae* (2002)
- Tan, P. H., Sandmaier, B. M. & Stayton, P. S. Contributions of a highly conserved VHNL hydrogen

- bonding interaction to scFv folding stability and refolding efficiency. *Biophysical Journal* 75, 1473-1482 (1998).
- Thies, M. J. W., Mayer, J., Augustine, J. G., Frederick, C. A., Lilie, H. & Buchner, J. Folding and association of the antibody domain C(H)3: Prolyl isomerization precedes dimerization. *Journal of Molecular Biology* 293, 67-79 (1999).
- Usov, A. I., Smirnova, G. P., Kamenarska, Z., Dimitrova-Konaklieva, S., Stefanov, K. L. & Popov, S. S. Polar constituents of brown seaweed *Colpomenia peregrina* (Sauv.) Hamel from the Black Sea. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 30, 161-167 (2004).
<http://www.ingentaconnect.com/content/maik/rubi/2004/00000030/00000002/00487587>.
- Xu, Z., Horwich, A.L. & Sigler, P.B. 3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals the asymmetric folding conformation of a type II chaperonin. *Nature* 388 :741 (1997)
- Vreeland, V. Localization of a cell wall polysaccharide in a brown alga with labeled antibody. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. , (1969).
- Vreeland, V. Immunocytochemical localization of the extracellular polysaccharide alginic acid in the brown seaweed, *Fucus distichus*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 5. 358-367 (1971).
- Vreeland, V. Monoclonal antibodies as molecular probes for cell wall antigens of the brown alga, *Fucus*. *Planta*.162:506-517 (1984).
- Vreeland, V. Comparison of protoplast wall regeneration and native wall deposition in zygotes of *Fucus distichus* by cell wall labeling with monoclonal antibodies. *Plant Physiology Biochemistry*; 26 (5), 653-659 (1988).
- Wall, J. G. & Pluckthun, A. The hierarchy of mutations influencing the folding of antibody domains in *Escherichia coli*. *Protein Engineering* 12, 605-611 (1999).
- Willats, W. G. T. Making and using antibody probes to study plant cell walls. *Plant Physiology Biochemistry* 38, 25-36 (2000).
- Willats, W. G.T. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 50, 837-54 (2002).
- Zahn, G, Skerra, A. And Höhne, W. Investigation of a tetracycline-regulated phage display system. *Protein Engineering* 12, 1031-1034 (1999)
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J. L. Production of a functional catalytic antibody ScFv-NusA fusion protein in bacterial cytoplasm. *Journal of Biochemistry* 133, 577-581 (2003).