

I. Introduction

Ce chapitre est consacré à la recherche dans la banque fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C} de clones dont l'activité enzymatique est modulée suite à la complexation à une molécule d'intérêt. Cette recherche est réalisée en deux étapes. En premier lieu, la banque de mutants est soumise à une sélection pour isoler les clones ayant de l'affinité pour le ligand cible. Ensuite, des expériences de criblage sont réalisées sur la population sélectionnée afin d'identifier les clones dont l'activité est effectivement régulée suite à la complexation du ligand.

1. Choix des ligands

Afin d'évaluer la possibilité de trouver dans cette banque des enzymes possédant une affinité pour des molécules quelconques, différents ligands modèles ont été choisis. Il s'agit d'abord d'un ion métallique, le Ni(II), et ensuite de deux antibiotiques de structure très différente, la kanamycine A et la sulfanilamide.

1.1. Le nickel

Le nickel a été choisi comme ion modèle car la sélection pour affinité avec cet ion métallique est aisée. De plus, comme nous l'avons vu dans l'introduction, la création d'un site de complexation est réalisable par ingénierie dirigée.

Les métaux, comme le nickel, le chrome, l'arsenic, le cadmium, le mercure, etc., sont toxiques pour les humains et les espèces aquatiques. L'impact du nickel et de ses composés a été systématiquement étudié [190]. D'après la réglementation de l'E.P.A. (Environmental Protection Agency), la concentration en nickel dans l'eau doit être inférieure à 0,6 ppm (soit 10 µM) pour pouvoir être consommée sans danger. En outre, des concentrations en Ni(II) dépassant 1 ppm dans l'environnement aquatique peuvent être létales pour plusieurs espèces aquatiques. Il est donc indispensable de disposer de méthodes efficaces pour détecter la présence de nickel. Le nombre de techniques employées pour cette détection est assez important. En effet, les techniques habituelles de laboratoire utilisent la gravimétrie, la spectroscopie d'absorption atomique, la spectrométrie de masse [191, 192], la spectrophotométrie [193], les techniques électro-analytiques [194], l'analyse colorimétrique et l'échange d'ion [195]. Récemment, Ponnuswamy *et al.* ont présenté une nouvelle approche pour la détection du Ni(II) utilisant une technique de réflexion atténuée de rayons infrarouges [196]. La limite de détection de ce capteur

infrarouge pour le nickel est de 1 ppm. Cependant, des études d'interférences ont montré que la présence de Cu(II) diminue la sensibilité du système.

1.2. La kanamycine A et la sulfanilamide

De nombreuses classes d'antibiotiques sont largement utilisées en médecine vétérinaire, pour prévenir ou traiter diverses maladies, mais aussi pour favoriser la croissance des animaux d'élevage. De plus, certains antibiotiques peuvent être ajoutés directement aux aliments, notamment au lait, pour prolonger leur fraîcheur. Cependant, des taux relativement élevés de résidus d'antibiotiques dans la nourriture peuvent causer des réactions allergiques. Le plus inquiétant, c'est que des petites doses d'antibiotiques peuvent, sur de longues périodes de temps, conduire à une résistance qui sera transférée aux bactéries du système digestif humain. Pour minimiser l'exposition humaine aux antibiotiques, des limites maximales de concentration ont été fixées par l'Union Européenne.

La détection des antibiotiques dans la nourriture se fait généralement par des techniques 'bioassay', largement utilisées dans des méthodes de criblage [197, 198]. Mais ces tests d'inhibition bactérienne ne font, en général, pas la distinction entre les différents membres d'une même classe d'antibiotiques. Ils ne fournissent que des mesures semi-quantitatives des résidus testés et donnent parfois des faux positifs [199]. Néanmoins, ces techniques continuent à être utilisées à cause de leur simplicité et de leur faible coût.

1.2.1. La kanamycine A

La kanamycine A fait partie de la classe des aminoglycosides. Il existe trois types de kanamycine, A, B et C, qui se différencient par leurs chaînes latérales (cf. Figure 52).

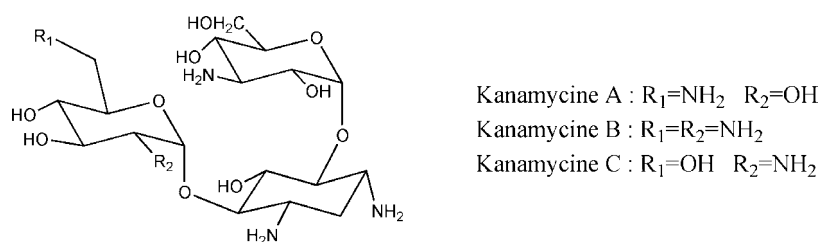


Figure 52 Structure des trois types de kanamycine.

Les aminoglycosides sont actifs contre une large gamme de bactéries Gram-négatives et Gram-positives. Ils exercent leur effet antibactérien en se liant à la sous-unité 30S du ribosome, empêchant de ce fait la synthèse des protéines par la bactérie. Une utilisation abusive de cette classe d'antibiotiques pourrait générer des résidus potentiellement nocifs pour l'appareil auditif

et en raison de leur toxicité rénale. La limite maximale en résidus de kanamycine dans le lait a été fixée à 150 µg/kg (soit 3.10^{-7} M) par l'Union Européenne [200]. Pour la détection des aminoglycosides, trois techniques sont généralement utilisées : les tests de criblage par inhibition microbienne [201], les tests immunologiques [202-204] et les techniques de chromatographie liquide et spectrométrie de masse [205]. La chromatographie liquide est la technique la plus appropriée pour la confirmation de résultats positifs par criblage. Pour un criblage à grande échelle, les méthodes microbiologiques sont préférées à cause de leur facilité, leur faible coût et leur spectre étendu. Cependant, un délai d'au moins six heures est alors nécessaire pour connaître les résultats. Plus rapide pour la détection de ces antibiotiques, l'utilisation de plaques ELISA permet d'obtenir les résultats trois fois plus vite [206]. L'utilisation de cette technique est néanmoins limitée en raison de la nécessité de réaliser les tests en laboratoire. Le test le plus rapide et le plus facile décrit jusqu'à présent est un test par bandelette en une étape qui donne des résultats en 10-15 minutes [207]. Son principe est basé sur un test immunologique compétitif dans lequel des particules d'or sont recouvertes d'anticorps monoclonaux dirigés contre un aminoglycoside. Il a été développé pour le criblage sur le terrain, mais n'est spécifique que pour deux antibiotiques et n'est donc pas applicable à grande échelle.

1.2.2. La sulfanilamide

La sulfanilamide, dont la structure est décrite à la Figure 53, fait partie de la classe des sulfonamides.

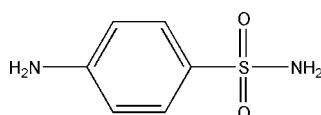


Figure 53 Structure de la sulfanilamide.

La classe des sulfonamides comprend un grand nombre de composés bactéricides synthétiques qui agissent en rivalisant avec l'acide *p*-aminobenzoïque dans la synthèse enzymatique de l'acide dihydrofolique. Ceci mène à une diminution de la disponibilité des folates réduits essentiels dans la synthèse des acides nucléiques. Pas moins de dix sulfonamides sont largement utilisées en médecine vétérinaire. L'analyse de ces composés dans les denrées alimentaires est particulièrement importante en raison de leur caractère potentiellement cancérigène. La limite maximale en résidus de sulfonamide est fixée à 100 µg/kg (soit 6.10^{-7} M) par l'Union Européenne [208]. Pour la détection des sulfonamides dans les tissus comestibles, les méthodes utilisées sont équivalentes à celles pratiquées pour les aminoglycosides : des tests d'inhibition microbienne [209], des tests immunologiques [210, 211], la chromatographie liquide (LC) [212]

et la LC–spectrométrie de masse (LC–MS) [213]. Ces méthodes sont généralement utilisées en laboratoire et les analyses prennent trop de temps pour les besoins de la chaîne alimentaire. Pour la détection des sulfonamides dans les abattoirs, les fluides du corps (bile, urine et sérum sanguin) peuvent servir de marqueurs pour détecter la présence des résidus dans les tissus. Ces fluides pourront alors être analysés directement, sans extraction. Actuellement, la technologie la plus rapide pour les analyses sur le terrain fait appel à l'utilisation du biosenseur optique BIAcore™ [214].

2. Sélection pour affinité

La première étape dans la recherche de clones dont l'activité enzymatique est modulée suite à la complexation à une molécule d'intérêt est la sélection afin d'isoler les clones ayant de l'affinité pour ce ligand.

Cette technique consiste à extraire une sous-population de phages exprimant des mutants dotés d'une propriété particulière à partir d'une banque initiale [48]. En général, le premier tour de sélection est réalisé sur une grande banque initiale (typiquement 10^9 clones, dont chacun est représenté par environ 100 particules), la sous-population sélectionnée ne représentant qu'une toute petite fraction de la population de départ (10^6 particules) mais enrichie en clones possédant la propriété recherchée. Cette sous-population sera alors amplifiée en infectant des cellules bactériennes, de sorte que chaque phage individuel de celle-ci soit représenté par des millions de copies dans le stock amplifié. Cette population amplifiée sera ensuite soumise à des tours de sélection supplémentaires pour augmenter l'enrichissement en clones possédant la caractéristique désirée.

Dans le cas d'une sélection pour affinité, le ligand est fixé à un support solide et le mélange de phages est mis en contact avec le ligand immobilisé. Les phages ayant de l'affinité pour le ligand seront capturés sur la surface ou la matrice et les phages non liés seront quant à eux éliminés par lavage. Finalement, les phages liés seront récupérés par élution grâce à une solution clivant le lien phage-ligand. Les phages élués étant toujours infectieux, ils pourront être amplifiés par infection de cellules bactériennes hôtes et l'éluat amplifié servira à un autre tour de sélection pour affinité. Les phages de l'éluat final seront amplifiés et caractérisés individuellement. Ces différentes étapes de la sélection pour affinité sont schématisées à la Figure 54.

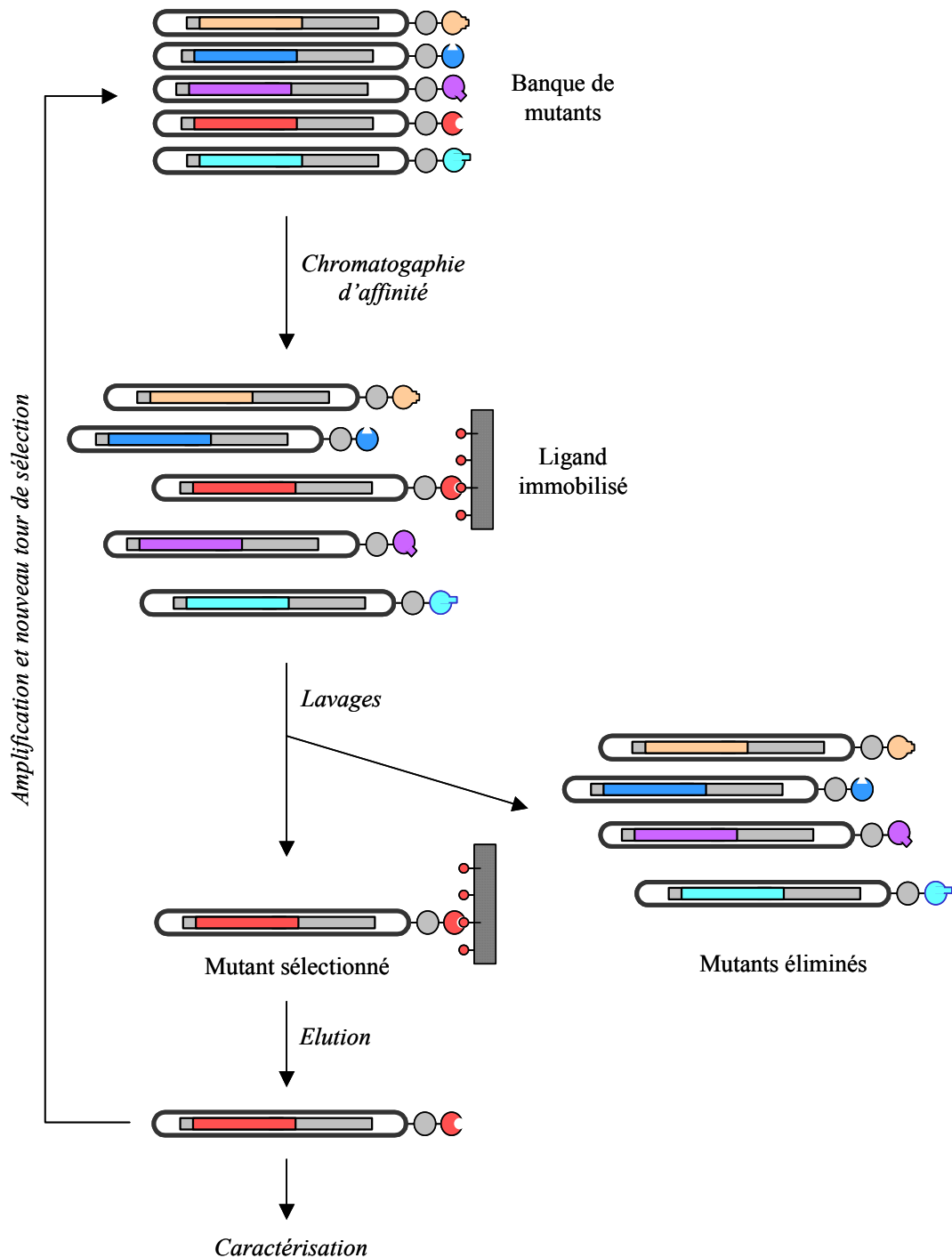


Figure 54 Principe de la sélection pour affinité d'une banque de mutants exprimés en surface de phages.

La sélection est basée sur deux paramètres principaux : la pression et le rendement, qui peuvent être ajustés pour augmenter son efficacité. La pression de sélection représente le degré qui permet aux clones possédant la propriété recherchée d'être favorisés par rapport aux autres. Le rendement représente la fraction de particules possédant cette caractéristique après la sélection. Un haut rendement est très important lors du tout premier tour de sélection, lors duquel sont injectés tous les clones d'une grande banque initiale. Supposons que chaque clone de la banque

ne soit représenté que par 100 particules. Si le rendement en clones les plus intéressants n'est que de 1 %, il y a une forte probabilité pour que ces clones soient perdus. Les clones rescapés du premier tour de sélection sont amplifiés et sont alors représentés par des millions de phages dans les tours suivants. Le rendement peut ensuite être diminué en faveur d'une plus forte pression. Cependant, il y a une limite à la pression car, en pratique, les techniques de sélection ne sont pas parfaites et il reste toujours un bruit de fond inévitable dû aux phages isolés non spécifiquement. Si la pression de sélection est trop forte, le rendement d'un phage sélectionné spécifiquement tombera sous ce bruit de fond et tout le pouvoir de la discrimination en faveur du meilleur clone sera perdu.

Différents supports peuvent être utilisés pour l'immobilisation du ligand : tubes en polystyrène [47], membranes de nitrocellulose [215], billes magnétiques [216], gels d'agarose sous forme de billes [102] et même surface de cellules [217]. La cible peut être directement attachée au support par couplage chimique [52, 218] ou par adsorption non covalente sur une surface plastique hydrophobe [47]. Alternativement, le ligand peut être biotinylé. Dans ce cas, la liaison se fait par l'intermédiaire d'une surface recouverte de streptavidine ou d'avidine¹¹ [219]. Quel que soit le support utilisé, il sera mis en présence de BSA ou de protéines de lait afin de bloquer les sites non recouverts par le ligand et limiter de ce fait la sélection de phages non spécifiques.

L'élution peut être réalisée avec des solutions acides [111] ou alcalines [112] ou avec des protéases, comme le facteur Xa [220] ou la trypsine [221] qui permettent le clivage d'un site spécifique introduit entre le peptide étranger et la protéine pIII du phage. Le dithiothréitol peut également être utilisé pour l'élution si la cible liée à la biotine comporte un pont disulfure. Alternativement, l'élution peut être réalisée spécifiquement par compétition avec le ligand soluble, ceci permettant de libérer les phages liés au ligand, sans libérer les phages liés pour une autre raison (par exemple, par interaction avec un contaminant, ou avec la protéine utilisée pour bloquer les sites non spécifiques).

3. Criblage pour la régulation

Lorsque les clones possédant de l'affinité pour la molécule d'intérêt sont isolés, la recherche des mutants dont l'activité est régulée par cette molécule est réalisée simplement, en mesurant l'activité de clones individuels en présence ou non du ligand.

¹¹ La biotine a une très forte affinité pour la streptavidine et l'avidine. La constante de dissociation (K_d) du complexe streptavidine-biotine vaut 4.10^{-14} M et celle du complexe avidine-biotine est encore plus faible : 5.10^{-16} M.

II. Résultats

1. Sélections pour affinité et pour activité

Comme nous l'avons mentionné à la fin du Chapitre 1, la banque finale fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶ n'a pas été sélectionnée pour activité catalytique. Les expériences de sélections pour affinité envers le nickel ou les antibiotiques ont donc été réalisées sur la banque naïve.

1.1. Affinité pour le nickel

1.1.1. Sélection pour affinité

La sélection pour affinité pour le Ni(II) a été réalisée avec les «Ni-NTA Magnetic Agarose Beads» (QIAGEN). Ces billes d'agarose contiennent des particules magnétiques et sont couplées de manière covalente à un groupement liant fortement les métaux : l'acide nitrilotriacétique. Elles sont fournies chargées avec du nickel et sont généralement utilisées pour capturer des protéines contenant une queue constituée de six histidines consécutives. La structure du complexe matrice-histidines est décrite à la Figure 55.

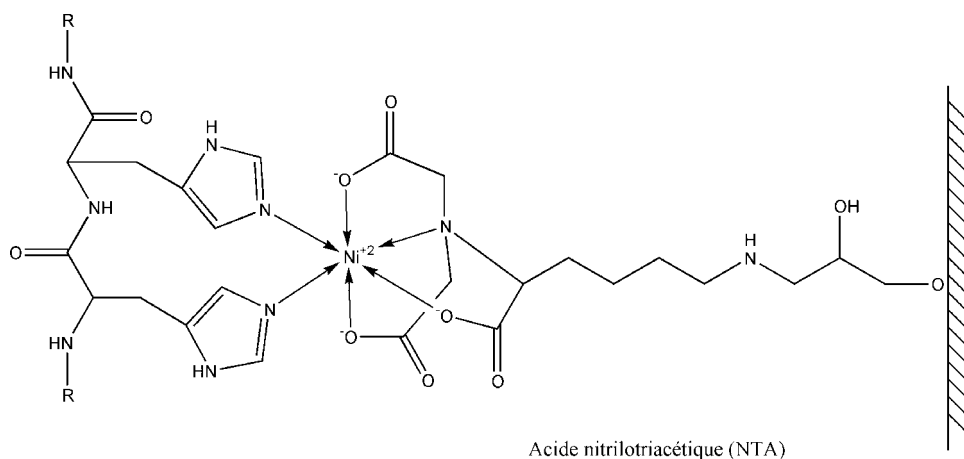


Figure 55 Interaction entre deux histidines d'une protéine (à gauche) et la matrice Ni-NTA (à droite).

Chaque cycle de sélection a été réalisé de la même manière. Dans un premier temps, la population de phages est incubée avec les billes Ni-NTA. Les phages liés de manière non spécifiques ou faiblement liés sont éliminés par lavage avec un tampon à faible concentration (20 mM) en imidazole (cf. Figure 56). Le tampon de lavage contient également du Tween 20, détergent qui empêche les phages de s'agglomérer. Suit une élution par compétition à l'aide d'un tampon à concentration élevée en imidazole (250 mM). Finalement, le rendement est calculé par

titrage des phages engagés dans le processus de sélection et des phages élués. Un autre cycle de sélection est mis en oeuvre après amplification des phages élués.

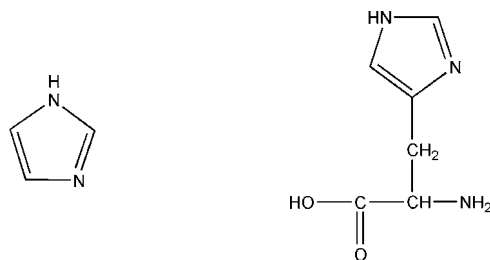


Figure 56 Structures de l'imidazole (à gauche) et de l'histidine (à droite).

Suivant la mesure de la densité optique, la quantité de phages engagés dans chaque tour de sélection est de 5.10^{12} phages. L'infectivité des phages de la banque étant de 0,5 à 3 % (cf. Chapitre 1), la quantité de phages infectieux sera comprise entre $2,5.10^{10}$ et $1,5.10^{11}$ TU¹². Afin d'augmenter progressivement la pression, le nombre de lavages effectués avant l'élution est croissant au fur et à mesure de l'avance dans la sélection.

Cinq tours de sélection ont été réalisés sur le nickel. Les rendements obtenus (rapport phages élués/phages engagés) pour chaque cycle sont repris dans le Tableau 20. Ni-n signifie n^{ième} tour pour affinité pour le nickel.

Tour	Phages engagés	Phages élués	Rendement
Ni-1	$2,6.10^{11}$ TU	$1,3.10^7$ TU	$5,0.10^{-5}$
Ni-2	$3,6.10^{11}$ TU	$1,3.10^7$ TU	$3,6.10^{-5}$
Ni-3	$1,0.10^{11}$ TU	$4,7.10^8$ TU	$4,7.10^{-3}$
Ni-4	$4,9.10^{10}$ TU	$5,4.10^8$ TU	$1,1.10^{-2}$
Ni-5	$5,7.10^{10}$ TU	$1,3.10^9$ TU	$2,3.10^{-2}$

Tableau 20 Rendements des différents tours de sélection sur le nickel. Les titres des phages engagés et élués sont également indiqués.

Nous pouvons constater que le rendement augmente au fur et à mesure des cycles de sélection, ce qui suggère qu'il y a eu enrichissement de la population en phages-enzymes ayant une affinité pour le métal.

Caractérisation de la population sélectionnée Ni-5

Le gène de la β -lactamase de 20 clones issus de la sélection a été amplifié par PCR et les fragments obtenus ont été analysés par migration sur gel d'agarose (cf. Figure 57). Les fragments

¹² TU : 'transforming unit'.

amplifiés possèdent tous la taille attendue ; il n'y a donc pas eu de délétion dans le gène de la β -lactamase pendant la sélection.

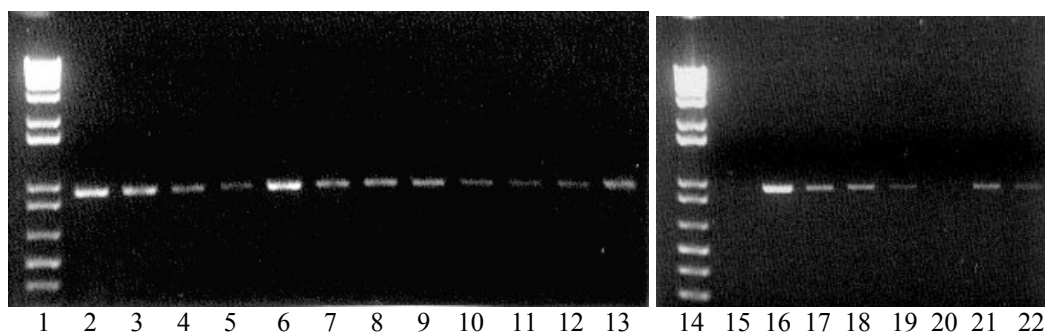


Figure 57 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus par PCR sur 20 clones Ni-5 (puits 2 à 13 et 15 à 22). Les puits 1 et 14 contiennent le marqueur de taille 1kb⁺.

Quinze clones ont ensuite été séquencés (cf. Tableau 21). Chaque clone possède entre trois et six résidus histidine susceptibles de complexer le nickel. Ceux-ci sont surtout présents dans la boucle insérée en position 271. Nous pouvons également constater la présence de nombreux résidus proline. Dans la littérature, des exemples de stabilisation de structure de protéines grâce à l'insertion de résidus proline sont décrits [222] et leur présence ici pourrait peut-être favoriser la rigidification des boucles et/ou l'orientation correcte des histidines. D'autre part, il est étonnant de ne retrouver que des inserts de six acides aminés entre les deux cystéines en position 41-42, alors que la construction des banques comprenait également l'insertion de cinq et sept résidus. Nous pensons que la sélection sur le nickel nous a permis d'enrichir une population en phages ayant de l'affinité pour ce métal. En effet, tous les clones sélectionnés possèdent au moins trois résidus histidines, connus pour complexer le nickel. De plus, le rendement (phages élués/phages engagés) augmente à chaque tour de sélection.

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg	Thr
Ni-5-#5 (x2)	Cys- His -Ala-Ser- His -Leu- Pro -Cys	Ala-Arg- His	Ala- His -Gly-Thr-Asn-Leu
Ni-5-#16	Cys- His -Ala- X - His -Leu- Pro -Cys	Ala-Arg- His	His - His -Thr- His -Ser-Leu
Ni-5-#12	Cys-Leu-Phe- His -Ser- His - Pro -Cys	Gly-Ala-Tyr	His -Gly- His -Ser- His -Asn
Ni-5-#1	Cys-Val-Arg-Ser-Phe-Arg- Pro -Cys	Ala-Glu-Tyr	His -Thr- His - His - His -Thr
Ni-5-#8	Cys-Ser-Thr-Arg-Asp-Val- Pro -Cys	Gly-Met- His	Ser- His - His - His - His -Thr
Ni-5-#3	Cys-Met-Phe- His -Gly- Pro -Ser-Cys	Gly-Ser-Gln	His - His - His - His - His -Thr
Ni-5-#7	nd	Gly- Pro - His	Ser- His - His - His - His -Thr
Ni-5-#14	Cys-Val- His -Phe-Arg-Ser-Asn-Cys	Gly-Gln-Ser	Asn- His - His - His - His -Thr
Ni-5-#2	Cys-Tyr-Ser-Met- Pro -Ser-Thr-Cys	Ser- Pro -Asp	His - His - His - His - Pro -Thr
Ni-5-#11	Cys-Thr- Pro - Pro -Arg-Ser-Ser-Cys	Gly-Gln-Lys	His - His - His - His - Pro -Thr
Ni-5-#15	nd	Gly-Gly- His	His - His -Gly-Tyr- Pro -Thr
Ni-5-#4 (x2)	Cys-Leu-Ala-Ser-Ser-Ser-Leu-Cys	Gly- Pro - His	His - His - His - His -Arg- Pro
Ni-5-#10	Cys-Ala-Ala-Gly-Ile-Asp-Lys-Cys	Ala-Ala-Tyr	His - His - His - His - X -Ala

Tableau 21 Séquences en positions 41-42, 238-241 et 271 de clones Ni-5. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible et nd, non déterminé. Le nombre entre parenthèses indique que la même séquence a été trouvée plusieurs fois.

1.1.2. Sélection *in vivo* pour activité catalytique

Etant donné que la diversité de la population sélectionnée pour affinité pour le nickel était assez élevée, une sélection *in vivo* pour activité catalytique a été réalisée. Différentes dilutions de bactéries infectées par la population Ni-5 ont été étalées sur boîtes de Petri contenant 20 mg/l d'ampicilline. Le comptage des colonies poussant en présence ou non d'ampicilline a permis de déterminer qu'environ 9 % des clones Ni-5 confèrent une résistance à l'ampicilline d'au moins 5 % de celle conférée par le phage-enzyme sauvage.

Des réactions de criblage PCR ont alors été réalisées sur des clones résistants et le gène de la β -lactamase des fragments d'ADN obtenus a été séquencé. Ces séquences sont reprises dans le Tableau 22. Si nous les comparons avec celles obtenues avant la sélection pour activité (cf. Tableau 21), nous pouvons constater que les résidus histidine sont mieux répartis entre les trois boucles. D'autre part, le clone Ni-5-Amp₂₀-#21 ne comporte que deux histidines. Ce clone est le seul à posséder une insertion de sept résidus entre les deux cystéines en position 41-42. Comme c'était le cas pour la banque non sélectionnée pour affinité, nous pouvons à nouveau noter des délétions de la boucle en position 271 après sélection pour activité catalytique (cf. les clones Ni-5-Amp₂₀-#9 et Ni-5-Amp₂₀-#21). Mais le pourcentage de clones contenant l'insert en position 271 est plus élevé que dans la banque fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶ sélectionnée pour activité.

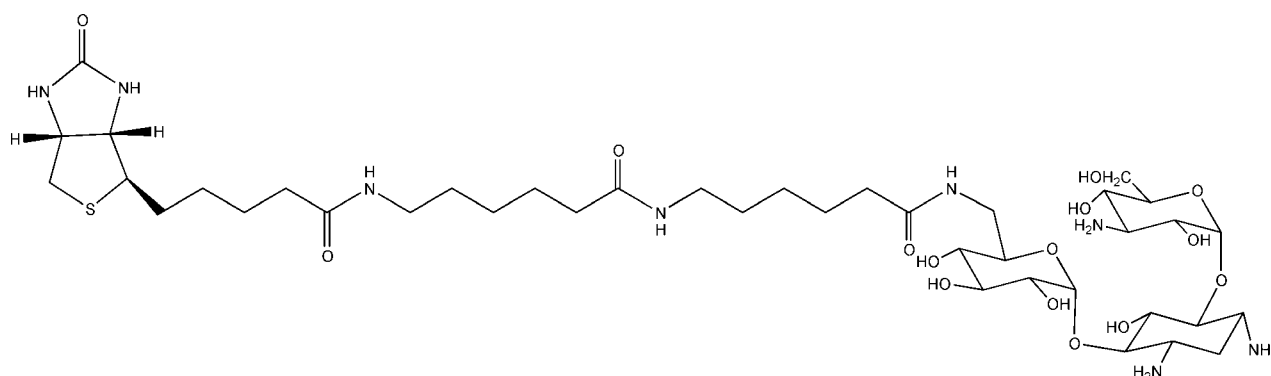
Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg	Thr
Ni-5-Amp ₂₀ -#5 (x6)	Cys- His -Ala-Ser- His -Leu-Pro-Cys	Ala-Arg- His	His - His -Thr- His -Ser-Leu
Ni-5-Amp ₂₀ -#7 (x2)	Cys- His -Ala-Ser- His -Leu-Pro-Cys	Ala-Arg- His	His -Glu-Gly- His -Asn-Leu
Ni-5-Amp ₂₀ -#22	Cys- His -Ala-Ser- His -Leu-Pro-Cys	Ala-Arg- His	Ala- His -Gly-Thr-Asn-Leu
Ni-5-Amp ₂₀ -#11	Cys- His -Tyr-Ser- His - His -Arg-Cys	Gly-Glu- His	Ala- His -Gly-Arg-Asn-Asn
Ni-5-Amp ₂₀ -#13	Cys-Tyr-Arg-Ala-Gln-Leu-Pro-Cys	Gly- His -Arg	His -Gly-Gly- His - His -Gly
Ni-5-Amp ₂₀ -#9	Cys- His - His -Val-Thr-Ala-Gly-Cys	Gly- His - His	Met
Ni-5-Amp ₂₀ -#21	Cys-Ser-Pro-Arg-Gly- His - His -Asp-Cys	Gly-Pro-Arg	Ser

Tableau 22 Séquences en positions 41-42, 238-241 et 271 de clones issus du cinquième tour de sélection pour affinité pour le nickel, sélectionnés pour activité catalytique. Le nombre entre parenthèses indique que la même séquence a été trouvée plusieurs fois.

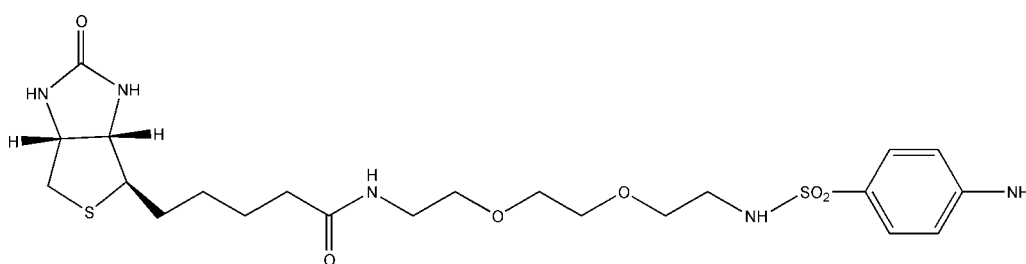
1.2. Affinité pour la kanamycine ou pour la sulfanilamide

Les sélections pour affinité pour les deux antibiotiques, la kanamycine et la sulfanilamide, ont été réalisées en parallèle. Au laboratoire, nous disposons des versions biotinylées de ces molécules :

- Biot-Kana : Biotine-kanamycine :



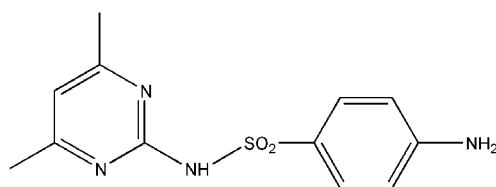
- Biot-Sulf : Biotine-sulfanilamide :



Ces molécules ont été synthétisées par Juan Mareque Faez (Unisensor, Liège).

1.2.1. Première tentative de sélection : Sulf₁ et Kana₁

Plusieurs cycles de sélection ont été réalisés de la façon suivante. Dans un premier temps, des billes magnétiques recouvertes de streptavidine ont été saturées avec le ligand biotinylé (Biot-Kana ou Biot-Sulf). Ensuite, la population de phages a été incubée avec les billes marquées. Les phages liés de manière non spécifique ont été éliminés par lavage et l'élution des phages spécifiques a été réalisée par compétition avec la kanamycine pour la sélection sur Biot-Kana et avec la sulfaméthazine (cf. Figure 58) pour la sélection sur Biot-Sulf. L'éluat a alors été dialysé pour éliminer le ligand soluble qui empêcherait la croissance des bactéries après infection.

**Figure 58** Structure de la sulfaméthazine.

Six cycles de sélection ont été réalisés sur la kanamycine et cinq sur la sulfanilamide. Les rendements obtenus pour chaque cycle sont repris dans le Tableau 23 pour la sélection sur la kanamycine et dans le Tableau 24 pour la sulfanilamide. Kana₁-n et Sulf₁-n signifie n^{ième} tour pour la première tentative de sélection sur la kanamycine ou sur la sulfanilamide, respectivement.

Tour	Phages engagés	Phages élués	Rendement
Kana ₁ -1	2,9.10 ¹⁰ TU	6,7.10 ⁶ TU	2,3.10 ⁻⁴
Kana ₁ -2	2,0.10 ¹¹ TU	1,2.10 ⁷ TU	6,0.10 ⁻⁵
Kana ₁ -3	3,1.10 ¹¹ TU	7,5.10 ⁷ TU	2,4.10 ⁻⁴
Kana ₁ -4	6,1.10 ¹⁰ TU	3,5.10 ⁷ TU	5,7.10 ⁻⁴
Kana ₁ -5	1,3.10 ¹¹ TU	1,4.10 ⁸ TU	1,1.10 ⁻³
Kana ₁ -6	4,3.10 ¹⁰ TU	~5.10 ⁹ TU	~10 ⁻¹

Tableau 23 Rendements des différents tours de sélection sur la kanamycine.
Les titres des phages engagés et élués sont également indiqués.

Tour	Phages engagés	Phages élués	Rendement
Sulf ₁ -1	2,9.10 ¹⁰ TU	5,5.10 ⁷ TU	1,9.10 ⁻³
Sulf ₁ -2	1,3.10 ¹¹ TU	1,2.10 ⁷ TU	9,2.10 ⁻⁵
Sulf ₁ -3	3,7.10 ¹¹ TU	1,8.10 ⁸ TU	4,9.10 ⁻⁴
Sulf ₁ -4	3,4.10 ¹¹ TU	3,5.10 ⁷ TU	1,0.10 ⁻⁴
Sulf ₁ -5	2,5.10 ¹¹ TU	1,7.10 ⁸ TU	6,8.10 ⁻³

Tableau 24 Rendements des différents tours de sélection sur la sulfanilamide.

Les rendements augmentent au fur et à mesure de la sélection, ce qui indique qu'une sélection s'est produite. Le rendement élevé obtenu pour le premier tour de sélection s'explique par le fait qu'un seul lavage est effectué, ce qui est insuffisant pour éliminer les phages non spécifiques.

Caractérisation des populations sélectionnées Kana₁-6 et Sulf₁-5

L'ADN de dix clones issus des deux sélections a été amplifié par PCR et les fragments obtenus ont été analysés sur gel d'agarose (cf. Figure 59 pour les clones Kana₁-6 et Figure 60 pour les clones Sulf₁-5). Le gène de la β -lactamase possède la taille attendue dans les 10 clones Kana₁-6 et dans 9 clones Sulf₁-5. Cependant, le deuxième clone sélectionné sur la sulfanilamide migre

légèrement plus bas que les autres ; une petite délétion dans le gène de la β -lactamase a donc dû se produire pendant la sélection.

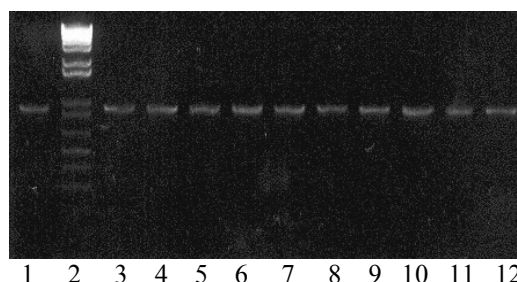


Figure 59 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus par PCR sur le phage fd-*blaA* sauvage (puits 1) et sur dix clones Kana₁-6 (puits 3 à 12). Le puits 2 contient le marqueur de taille 1kb⁺.

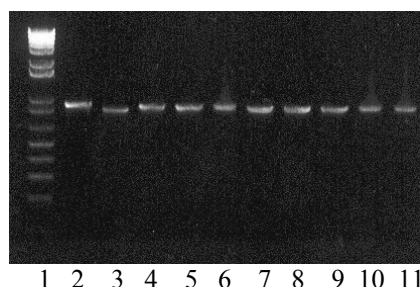


Figure 60 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus par PCR sur dix clones Sulf₁-5 (puits 2 à 11). Le puits 1 contient le marqueur de taille 1kb⁺.

Ces clones ont ensuite été séquencés ; les résultats obtenus sont repris dans le Tableau 25 pour les clones Kana₁-6 et dans le Tableau 26 pour les clones Sulf₁-5. Comme attendu, le clone Sulf₁-5-#2 montre une délétion de 16 résidus. Nous pouvons également remarquer qu'une séquence est retrouvée plusieurs fois, ce qui signifie qu'une sélection a bien eu lieu. Cependant, cette séquence est la même pour les deux sélections, ce qui suggère que ce clone (Kana₁-6-#2 et Sulf₁-5-#3) n'a pas été sélectionné pour affinité pour le ligand mais pour un autre intervenant de la sélection.

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)	Autres mutations
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg	Thr	
Kana₁-6-#2 (x5) Kana ₁ -6-#10	Cys-Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Gly-Ser-Cys Cys-Thr-Pro-Trp-Thr-Ser-Ala-Pro-Cys	Gly-Arg-Arg Gly-Arg-Arg	Val Val	Ala₈₆Thr, Gln₂₆₉Lys, Met₂₇₂Leu Gln ₂₆₉ Lys, Met ₂₇₂ Leu

Tableau 25 Séquences en positions 41-42, 238-241 et 271 de Kana₁-6. Le nombre entre parenthèses indique que la même séquence a été trouvée plusieurs fois.

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)	Autres mutations
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg	Thr	
Sulf ₁ -5-#1	Cys- X - X - X -Arg- X -Gly-Gly-Cys	Gly-Arg-Ser	Gln-Gly-Ser-Thr-Ser-Thr	Ala ₈₆ Thr
Sulf ₁ -5-#2	Cys-Gly-Gln-Ser-Arg-Asn-Glu-Gly-Cys	Ala-Lys-Arg	Délétion des résidus 256 à 271	
Sulf₁-5-#3 (x5)	Cys-Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Gly-Ser-Cys	Gly-Arg-Arg	Val	Ala₈₆Thr, Gln₂₆₉Lys, Met₂₇₂Leu
Sulf ₁ -5-#5	Cys-Arg-Tyr-Ala-Lys-Arg-Thr-Cys	Gly-Lys-Lys	Arg-Asn-Arg-Pro-Gly-Tyr	Gln ₂₆₉ Lys
Sulf ₁ -5-#9	Cys-Ala-Pro-His-Met-Pro- X -Cys	Ser-Thr-Asn	Ala-Thr-Thr- X -Pro-Ser	
Sulf ₁ -5-#10	Cys-Met-Phe-Arg-Pro-Ser-Ser-Ala-Cys	Ala-Lys-Asp	Val-Glu-Arg-Tyr-Pro-Thr	

Tableau 26 Séquences en positions 41-42, 238-241 et 271 de clones Sulf₁-5. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible.

Afin de déterminer si la population sélectionnée est bien enrichie en clones ayant de l'affinité pour la cible et de faciliter la caractérisation simultanée des multiples clones, des tests ELISA ont été réalisés.

Seule la population de phages issue de la sélection pour la kanamycine a été testée par ELISA. En pratique, la kanamycine biotinylée est fixée dans les puits d'une plaque ELISA recouverte de streptavidine. La cible ainsi immobilisée est ensuite mise au contact des phages à tester. Les phages non liés sont éliminés par lavage et les phages fixés sont détectés grâce à un anticorps de souris dirigé contre la protéine pVIII conjuguée à une peroxydase. Les phages ayant de l'affinité pour le ligand sont retenus sur la plaque et un signal est détecté.

L'expérience a été réalisée sur les phages de la banque non sélectionnée, sur la population de phages issue de la sélection sur la kanamycine et sur deux clones isolés dans cette population. Le phage ne comportant aucune protéine de fusion, fd-dog, a servi de contrôle négatif. Différentes quantités de phages (10^{10} , 10^{11} ou 10^{12} phages par puits) ont également été testées. Le graphique de la Figure 61 montre l'absorbance mesurée après 100 min. Aucun accrochage spécifique n'a été détecté.

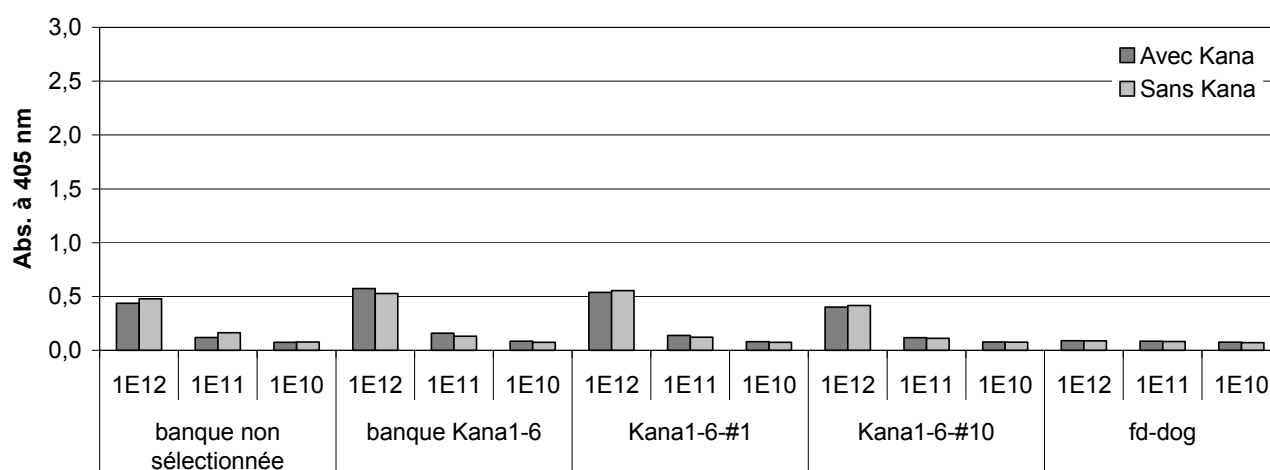


Figure 61 Test ELISA visant à caractériser la spécificité de la population et de clones individuels Kana₁₋₆. Différentes quantités de phages ont été testées (10^{10} , 10^{11} ou 10^{12} phages par puits) et deux tests ont été réalisés à chaque fois : fixation en présence ou non de kanamycine immobilisée.

Cette expérience n'a pas pu être réalisée sur la population de phages issue de la sélection sur la sulfanilamide car nous ne disposons plus de la molécule biotinylée.

Ces résultats confirment donc le fait que les phages n'ont pas été sélectionnés pour leur affinité pour la kanamycine. Une explication possible est que cette population a été sélectionnée pour affinité envers la protéine utilisée lors du blocage des sites non spécifiques, qui est la BSA. Un

test ELISA a donc été réalisé en utilisant la BSA comme ligand. Comme le montre les résultats obtenus (cf. Figure 62), aucun signal n'est détecté.

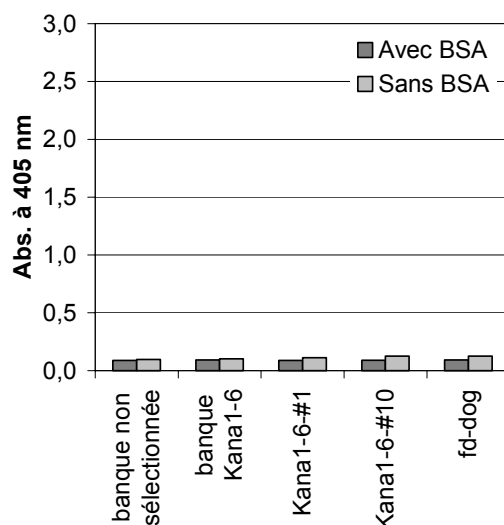


Figure 62 ELISA contrôle sur la BSA de la population et de clones individuels Kana₁-6. Deux tests ont été réalisés : fixation en présence ou non de BSA immobilisée.

Donc, la population de phages n'a pas été sélectionnée pour affinité pour la BSA. Une autre hypothèse possible suggérerait que les phages auraient pu être sélectionnés pour affinité pour le support utilisé.

1.2.2. Deuxième tentative de sélection sur la kanamycine : Kana₂

Alternance de support et d'agent bloquant

Nous avons donc décidé de recommencer la sélection sur la kanamycine, en alternant les supports utilisés pour l'immobilisation de la cible. Deux types de billes ont été utilisées : les billes magnétiques recouvertes de streptavidine et des billes d'agarose couplée à l'avidine. De même, la gélatine et les protéines de lait ont été utilisées en alternance, pour le blocage des sites non spécifiques. Par rapport aux expériences précédentes, nous avons diminué la quantité de support à chaque tour de sélection.

Six tours de sélection ont à nouveau été effectués. Comme le montre le Tableau 27, les rendements obtenus n'augmentent pas au cours de la sélection et restent au niveau du bruit de fond.

Tour	Phages engagés	Phages élués	Rendement
Kana₂-1	2,1.10 ¹¹ TU	2,2.10 ⁷ TU	1,0.10⁻⁴
Kana₂-2	2,0.10 ¹¹ TU	6,1.10 ⁶ TU	3,1.10⁻⁵
Kana₂-3	8,3.10 ¹¹ TU	4,5.10 ⁶ TU Trypsine : 1,6.10 ⁷ TU	5,4.10⁻⁶ Trypsine : 1,9.10⁻⁵
Kana₂-4	7,0.10 ¹⁰ TU	1,0.10 ⁵ TU	1,4.10⁻⁶
Kana₂-5	1,5.10 ¹¹ TU	2,4.10 ⁶ TU	1,6.10⁻⁵
Kana₂-6	3,1.10 ¹¹ TU	1,8.10 ⁶ TU	5,8.10⁻⁶

Tableau 27 Rendements des différents cycles de la deuxième tentative de sélection sur la kanamycine.

Le fait d'alterner le support et l'agent bloquant nous a donc permis d'éviter la sélection non spécifique observée dans la première tentative de sélection. Malheureusement, aucun enrichissement ne semble se produire ici.

Lors du troisième tour, l'élution a été réalisée en parallèle avec la trypsine, qui clive le lien entre la β -lactamase et la protéine pIII du phage. La quantité de phages élués est environ deux fois plus importante par rapport à l'élution compétitive.

Caractérisation de la population sélectionnée Kana₂-6

Les gènes de la β -lactamase de 34 clones ont été amplifiés par PCR et les fragments obtenus posés sur gel d'agarose. Comme le montre la Figure 63, les fragments possèdent la taille attendue, sauf le clone Kana₂-6-#29, dont la migration légèrement plus basse indiquerait une délétion.

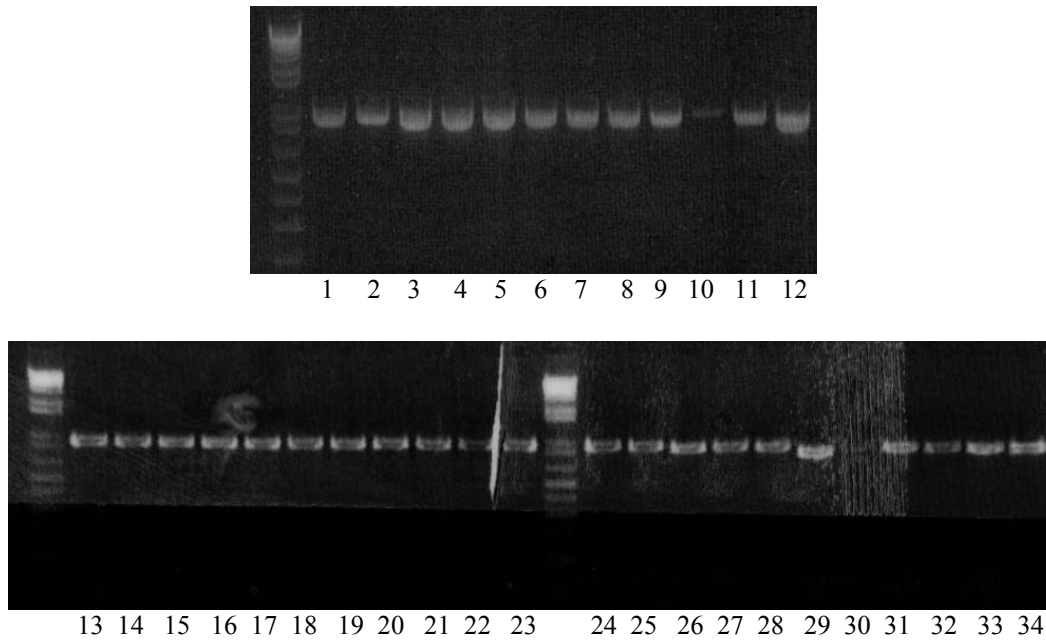


Figure 63 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus par PCR sur 34 clones Kana₂-6 (puits 1 à 34). Les puits non numérotés contiennent le marqueur de taille 1kb⁺.

Ces clones ont ensuite été séquencés. Comme le montre le Tableau 28, les mêmes séquences sont retrouvées plusieurs fois. De plus, les clones Kana₂-6-#4 et Kana₂-6-#16 présentent une grande similitude de séquence au niveau des boucles 1 et 3. Il est étonnant de retrouver une si faible diversité. En effet, ceci indique qu'une sélection a dû se produire malgré l'absence d'augmentation des rendements de sélection. Le clone Kana₂-6-#29 montre une délétion de 17 résidus, comme nous nous y attendions.

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)	Autres mutations
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg	Thr	
Kana ₂ -6-#1 (x22)	Cys-Glu-Arg-Glu-Lys-Asn-Val-Ser-Cys	Gly-Ser-Arg	Ala-Arg-Arg-Thr-Ile-Thr	Gln ₂₆₉ Lys Gln ₂₆₉ -Ala→Arg-Lys
Kana ₂ -6-#4	nd	<u>Gly-Lys-Lys</u>	<u>Glu-Gly-Pro-Thr-Phe-Thr</u>	
Kana ₂ -6-#16 (x5)	nd	<u>Gly-Lys-Lys</u>	<u>Glu-Gly-Pro-Thr-Ser-Thr</u>	
Kana ₂ -6-#8 (x3)	nd	Gly-Pro-Lys	Gln-Asn-Val-Pro-Thr	
Kana ₂ -6-#21	nd	Gly-Pro-Asp	Gln-Asp-Ala-Pro-Met-Pro	
Kana ₂ -6-#26	Cys-Arg-Thr-Ser-His-Arg-Pro-Cys	Gly-Arg-Arg	Lys	
Kana ₂ -6-#29	nd	Ala-Lys-Arg	Deletion: aa 254 à 271 → Arg	

Tableau 28 Séquences en positions 41-42, 238-241 et 271 de clones Kana₂-6. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible et nd, non déterminé. Le nombre entre parenthèses indique que la même séquence a été trouvée plusieurs fois.

L'affinité de la population sélectionnée pour la kanamycine a ensuite été évaluée par test ELISA. Aucun accrochage spécifique n'a été détecté (cf. Figure 64).

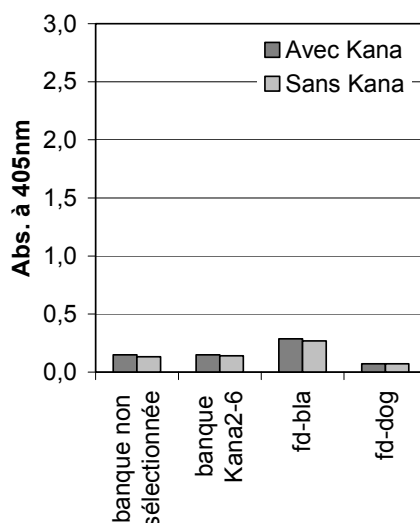


Figure 64 Test ELISA visant à caractériser la spécificité de la population de phages Kana₂-6. Deux tests ont été réalisés : fixation en présence ou non de kanamycine immobilisée.

1.2.3. Troisième tentative de sélection sur la kanamycine : Kana₃

Elution à la trypsine

Suite aux résultats obtenus lors de l'élution à la trypsine pendant le troisième tour de la sélection précédente (cf. Tableau 27, page 123), une nouvelle tentative de sélection sur la kanamycine a été réalisée en utilisant cette méthode d'élution à chaque tour. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 29. A nouveau, aucune augmentation de rendement n'est observée. Donc l'absence d'augmentation de rendement au cours de la sélection ne dépend pas de la méthode d'élution.

Tour	Phages engagés	Phages élués	Rendement
Kana₃-1	7,8.10 ¹⁰ TU	1,6.10 ⁷ TU	2,1.10⁻⁴
Kana₃-2	1,2.10 ¹¹ TU	2,5.10 ⁷ TU	2,1.10⁻⁴
Kana₃-3	2,9.10 ¹¹ TU	7,5.10 ⁵ TU	2,6.10⁻⁶
Kana₃-4	1,3.10 ¹¹ TU	2,5.10 ⁶ TU	1,9.10⁻⁵
Kana₃-5	2,6.10 ¹¹ TU	5,8.10 ⁶ TU	2,2.10⁻⁵
Kana₃-6	2,6.10 ¹¹ TU	4,1.10 ⁶ TU	1,6.10⁻⁵

Tableau 29 Rendements des différents tours de sélection sur la kanamycine, avec élution à la trypsine.

Caractérisation de la population sélectionnée Kana₃-6

Des réactions de criblage PCR ont été effectuées sur 36 clones et les fragments d'ADN obtenus posés sur gel d'agarose (cf. Figure 65). Aucun clone ne montre de délétion.

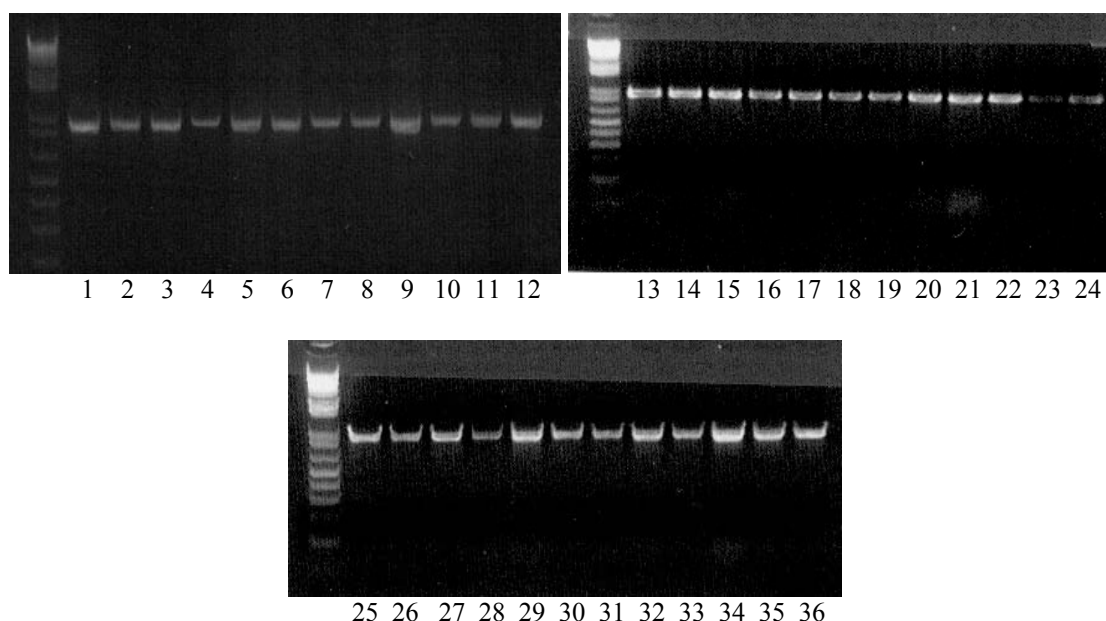


Figure 65 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus par PCR sur 36 clones Kana₃-6 (puits 1 à 36). Les puits non numérotés contiennent le marqueur de taille 1kb⁺.

Ces fragments ont ensuite été séquencés (cf. Tableau 30). La variabilité des clones sélectionnés est plus élevée par rapport à la sélection Kana₂. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'élution à la trypsine n'est pas spécifique, contrairement à l'élution par compétition avec le ligand soluble. Dans ce cas-ci, les phages liés de manière non spécifique sont également élués. Cependant, nous pouvons constater que les séquences obtenues ici ne sont pas très différentes les unes des autres : les clones Kana₃-6-#5, Kana₃-6-#8 et Kana₃-6-#11 sont pratiquement identiques. De plus, certains triplets se retrouvent dans plusieurs séquences. Quand au clone Kana₃-6-#6, il possède la même séquence dans la boucle 2 que le clone retrouvé 22 fois à l'issue de la sélection Kana₂ (cf. Tableau 28, page 125).

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)	Autres mutations
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg	Thr	
Kana ₃ -6-#2	Cys-Leu-Leu-Pro-Arg-Ser-Glu-Cys	Gly-Ala-Arg	Ser-Lys-Leu-Glu-Val-Thr	Gln ₂₆₉ →Arg Gln ₂₆₉ →Arg
Kana ₃ -6-#3	Cys-Ser-Val-Arg-Leu-His-Arg-Thr-Cys	Gly-Gly-Arg	Gly-Ser-Ala-Glu-Ile-Ala	
Kana ₃ -6-#4	Cys-Ala-Arg-Val-Thr-Arg-Ser-Cys	Gly-Asn-Gly	Thr-Ala-Glu-Lys-Val-Ser	
Kana ₃ -6-#26	nd	Gly-Gln-Arg	Ala-Val- <u>Lys-Asp-Val</u> -Ser	
Kana ₃ -6-#31	nd	Gly-Lys-Gln	Glu-Tyr- <u>Lys-Asp-Val</u> -Gly	
Kana ₃ -6-#14	nd	Gly-Arg-Ser	Arg-Glu-Tyr-Val-Ala-Thr	
Kana ₃ -6-#33	nd	Ala-Gln-Arg	Arg-Glu-Tyr- His-Lys-Ser	
Kana ₃ -6-#5 (x4)	Cys- <u>Phe-Ser-Ile-Pro-Asp</u> -Arg-Cys	Gly-Gln-Thr	<u>Glu-Gly-Leu-His-Lys-Ser</u>	
Kana ₃ -6-#8	Cys- <u>Phe-Ser-Ile-Pro-Asp</u> -Thr-Cys	Gly-Gln-Pro	<u>Glu-Gly-Leu-His</u> - X -Ser	
Kana ₃ -6-#11	Cys- <u>Phe-Ser-Asn-Pro-Asp</u> - X -Cys	Gly-Gln- X	<u>Glu- X -Leu-His-Met</u> -Ser	
Kana ₃ -6-#6	Cys-Glu-Arg-Glu-Lys-Asn-Val-Ser-Cys	Gly-Ser-Arg	Thr-Arg-Ile-Tyr-Ala-Pro	
Kana ₃ -6-#10	Cys-Ala-Gly-Gly-Ser-Ala-Gly-Val-Cys	Ala-Arg-His	Gln-Trp-Glu-Gly-His-Ser	
Kana ₃ -6-#12	Cys-Leu-Ser-Ser-Pro-Arg-Ser-Cys	Ala-Asn-Ser	Lys-Ser-Ala-Ala-Pro-Thr	
Kana ₃ -6-#13	nd	Gly-Ser-Arg	Gln-Gln-His-Tyr-Ala-Gly	
Kana ₃ -6-#15 (x4)	nd	Gly-Pro-Gln	Arg-Ala-Thr-Glu-Ser-Ser	
Kana ₃ -6-#18	nd	Gly-His-Glu	Asn-Lys-Arg-Pro-Ala-Thr	
Kana ₃ -6-#21	nd	Gly-Ala-Leu	Val-Ser-Leu-Arg-Ala-Ser	
Kana ₃ -6-#22	nd	Gly-Glu-Met	Glu-Gly-Pro-Gly-Ala-Ser	
Kana ₃ -6-#36	nd	Gly-Pro-Arg	Glu-Asn-Ser-Trp-Ala-Ser	
Kana ₃ -6-#23	nd	Gly-Ser-Arg	Glu- X -Arg-Gly-Val-Ser	
Kana ₃ -6-#32	nd	Ala-Ser-Asn	Arg-His-Ala-Arg-Val-Ser	
Kana ₃ -6-#17	nd	Gly-Asn-Gln	Asn-Asp-Glu-Pro-Val-Ser	
Kana ₃ -6-#24 (x2)	nd	Gly-Pro-Met	Asp-Thr-Gly-Tyr-Ile-Pro	Gln ₂₆₉ →Lys
Kana ₃ -6-#25	nd	Ala-Pro-Gln	Thr-Asn-Val-Gly-Ala-Thr	
Kana ₃ -6-#28	nd	Gly-Ala-Leu	Gly-Lys-Leu-Asp-Pro-Gly	
Kana ₃ -6-#29	nd	Gly-Lys-Ser	Lys-Glu-Gln-Phe-Ala-Pro	

Tableau 30 Séquences en positions 41-42, 238-241 et 271 de clones Kana₃-6. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible et nd, non déterminé. Le nombre entre parenthèses indique que la même séquence a été trouvée plusieurs fois.

Un test ELISA sur la kanamycine a également été effectué sur la population de phages sélectionnés et aucun accrochage spécifique n'a été détecté (cf. Figure 66).

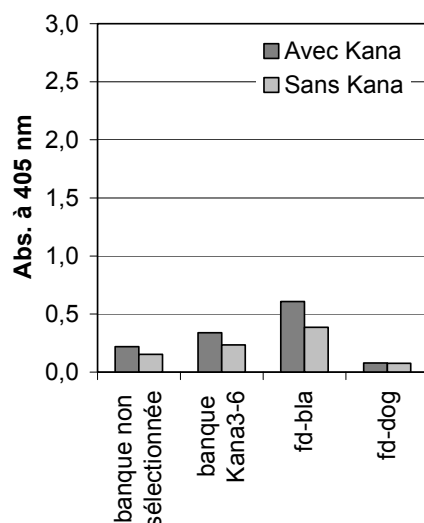


Figure 66 Test ELISA visant à caractériser la spécificité de la population de phages Kana₃-6. Deux tests ont été réalisés : fixation en présence ou non de kanamycine immobilisée.

Donc, pour résumer, l'absence d'augmentation de rendement au cours des sélections Kana₂ et Kana₃ et l'absence de signal ELISA des populations sélectionnées nous font penser qu'aucune sélection n'a eu lieu. Ceci peut être simplement dû au fait qu'aucun phage-enzyme de la banque ne possède d'affinité pour la kanamycine. Néanmoins, il est étonnant de constater que la diversité de la banque a fortement diminué au cours de la sélection Kana₂. Une autre hypothèse est donc possible : les phages sélectionnés ont effectivement de l'affinité pour le ligand, mais cette affinité est trop faible pour être détectée par test ELISA. Le fait que le rendement n'augmente pas peut alors s'expliquer par le fait que la quantité de phages sélectionnés reste au niveau du bruit de fond.

2. Criblage pour régulation

2.1. Régulation par le nickel

2.1.1. Effet du nickel sur l'activité de clones isolés

(a) Effet sur l'activité envers la pénicilline G

L'activité catalytique (cf. Annexe 1, page 177) de plusieurs clones, issus de la sélection pour affinité pour le nickel, a été mesurée en présence ou non d'acétate de nickel à une concentration de 1 mM. Comme le montrent les résultats obtenus (cf. Tableau 31), la présence de nickel peut générer une augmentation ou une diminution de l'activité enzymatique, en fonction du clone testé. Pour certains clones, l'expérience a été réalisée plusieurs fois afin de vérifier la reproductibilité des résultats. Celle-ci est confirmée pour l'ensemble des mesures effectuées pour chaque mutant, à l'exception de celles obtenues pour le clone Ni-5-Amp₂₀-#9.

Clone	k _{obs}	k _{obs} avec 1 mM Ni(II)	Effet 1 mM Ni(II) sur le k _{obs}
Ni-5-#10	0,74 s ⁻¹	0,33 s ⁻¹	0,4 X
Ni-5-#11	6,9 s ⁻¹	2,5 s ⁻¹	0,4 X
Ni-5-#4	187 s ⁻¹	94 s ⁻¹	0,5 X
Ni-5-#14	1,8 s ⁻¹	0,9 s ⁻¹	0,5 X
Ni-5-#12	155 s ⁻¹	83 s ⁻¹	0,54 X
	159 s ⁻¹	85 s ⁻¹	0,53 X
Ni-5-Amp ₂₀ -#5	1.099 s ⁻¹	948 s ⁻¹	0,86 X
	1.017 s ⁻¹	889 s ⁻¹	0,87 X
	964 s ⁻¹	802 s ⁻¹	0,83 X
Ni-5-#7	1,5 s ⁻¹	1,3 s ⁻¹	0,9 X
Ni-5-Amp ₂₀ -#9	35,7 s ⁻¹	37,5 s ⁻¹	1,05 X
	57,2 s ⁻¹	52,8 s ⁻¹	0,92 X
	49,0 s ⁻¹	72,5 s ⁻¹	1,48 X
Ni-5-Amp ₂₀ -#13	29,1 s ⁻¹	35,7 s ⁻¹	1,23 X
	27,1 s ⁻¹	32,6 s ⁻¹	1,20 X
	26,8 s ⁻¹	33,0 s ⁻¹	1,23 X
	34 s ⁻¹	40 s ⁻¹	1,18 X
Ni-5-#5	29,6 s ⁻¹	39,0 s ⁻¹	1,32 X
	27,5 s ⁻¹	38,3 s ⁻¹	1,39 X
	24,1 s ⁻¹	33,3 s ⁻¹	1,38 X

Clone	k_{obs}	k_{obs} avec 1 mM Ni(II)	Effet 1 mM Ni(II) sur le k_{obs}
Ni-5-Amp ₂₀ -#7	28 s ⁻¹	45 s ⁻¹	1,61 X
	31,5 s ⁻¹	47,8 s ⁻¹	1,52 X
	30,2 s ⁻¹	44,7 s ⁻¹	1,48 X
	28 s ⁻¹	41 s ⁻¹	1,46 X
Ni-5-Amp ₂₀ -#11	36,8 s ⁻¹	56,1 s ⁻¹	1,52 X
	33,2 s ⁻¹	55,4 s ⁻¹	1,67 X
	33 s ⁻¹	49 s ⁻¹	1,48 X

Tableau 31 Effet du nickel sur l'activité catalytique de phages-enzymes issus de la sélection sur le nickel, sélectionnés ou non pour activité catalytique.

Nous avons également calculé le K_M de trois clones en présence ou non de nickel. Les Figures 67, 68 et 69 montrent l'évolution de l'activité des clones Ni-5-#5, Ni-5-#12 et Ni-5-Amp-#5 respectivement en fonction de la concentration en substrat, en présence ou non de nickel.

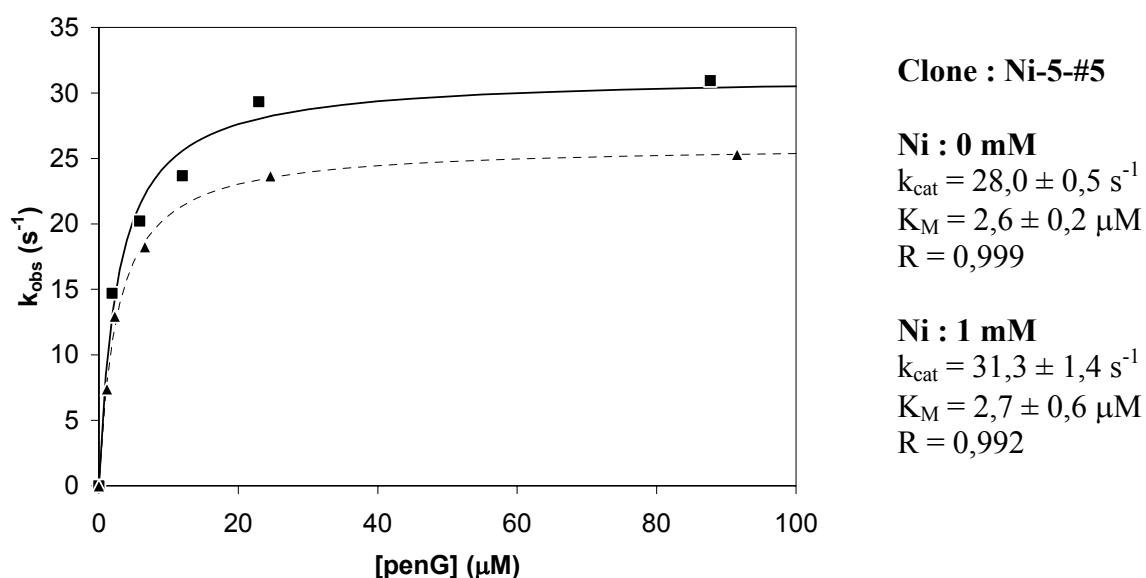


Figure 67 Graphique de l'activité du clone Ni-5-#5 en fonction de la concentration en pénicilline G, en présence (—■—) ou non (--▲--) de nickel 1 mM. Les valeurs de k_{cat} et K_M trouvées par 'curve fitting' sont également indiquées. Les erreurs sont calculées sur base du 'curve fitting'.

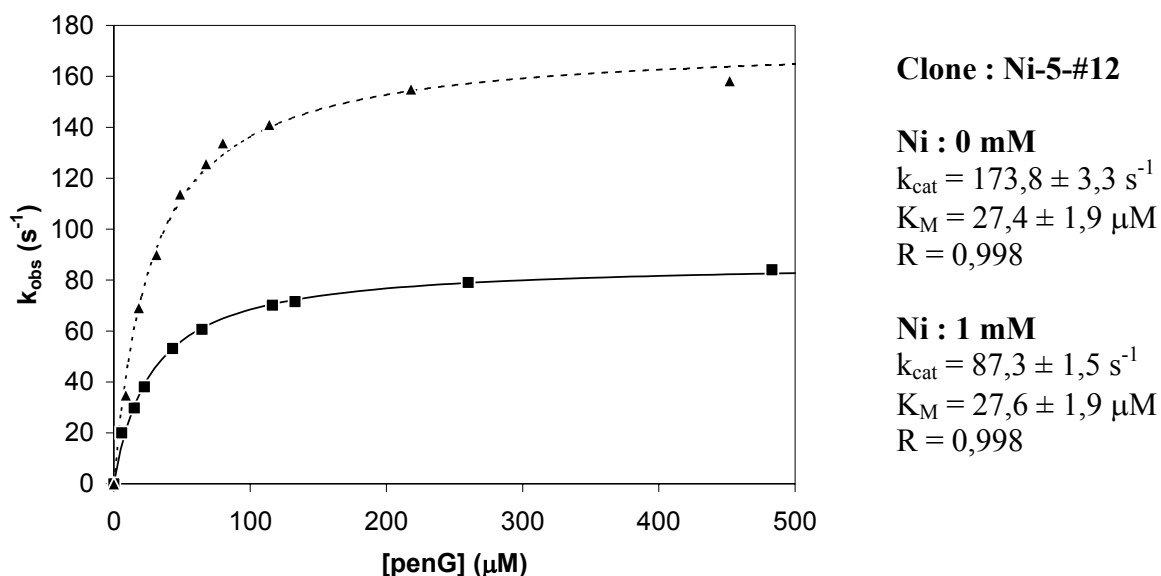


Figure 68 Graphique de l'activité du clone Ni-5-#12 en fonction de la concentration en pénicilline G, en présence (—■—) ou non (--▲--) de nickel 1 mM.

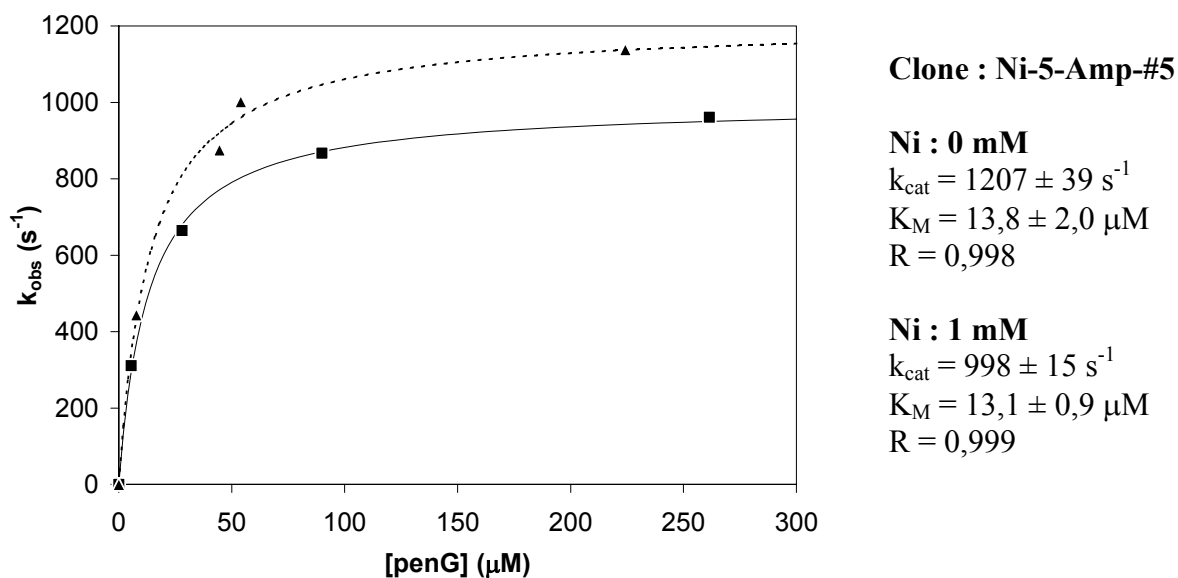


Figure 69 Graphique de l'activité du clone Ni-5-Amp-#5 en fonction de la concentration en pénicilline G, en présence (—■—) ou non (--▲--) de nickel 1 mM.

Comme le montre le Tableau 32, résumant les valeurs obtenues, le K_M ne semble pas être affecté par la présence du ligand. Cependant, ces valeurs étant assez faibles, elles sont difficiles à mesurer avec précision.

Clone	K_M	K_M avec 1 mM Ni(II)	Effet 1 mM Ni(II) sur le K_M
Ni-5-#5	$2,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$	$2,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$	1,04 X
Ni-5-#12	$27,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$	$27,6 \pm 1,9 \mu\text{M}$	1,01 X
Ni-5-Amp ₂₀ -#5	$13,8 \pm 2,0 \mu\text{M}$	$13,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$	0,95 X

Tableau 32 Effet du nickel sur le K_M de phages-enzymes issus de la sélection sur le nickel.

(b) Effet sur l'activité envers le CENTA

L'effet du nickel sur l'activité catalytique envers un autre substrat de la β -lactamase a également été testé. L'activité de différents clones Ni-5 non-sélectionnés pour activité catalytique (cf. Tableau 21, page 114) sur le CENTA (cf. Figure 70) a été mesurée en présence ou non de nickel.

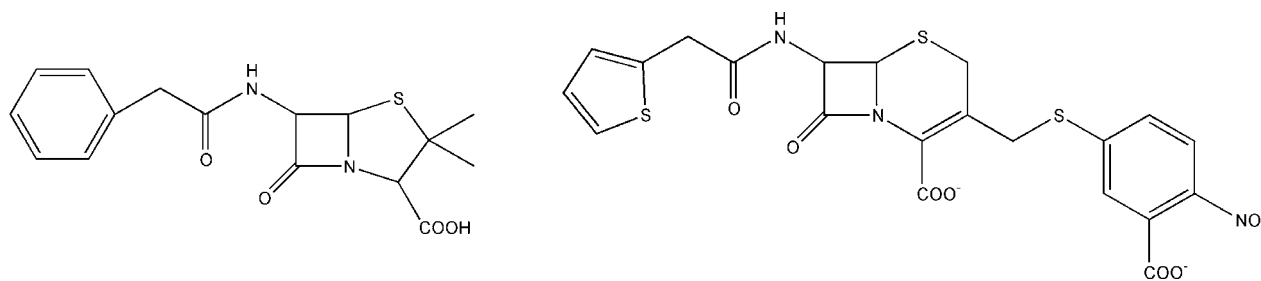


Figure 70 Structures de la pénicilline G (à gauche) et du CENTA (à droite).

Les activités obtenues sur le CENTA (cf. Tableau 33) sont plus faibles par rapport à l'activité sur la pénicilline G. Cependant, des activités plus faibles peuvent être mesurées (cf. clone Ni-5-#1), car le $\Delta\epsilon$ est plus élevé pour le CENTA. L'effet du nickel sur le clone Ni-5-#3 est identique quel que soit le substrat utilisé. En ce qui concerne le clone Ni-5-#2, l'effet du nickel semble plus important si l'activité est mesurée sur le CENTA. Par contre, l'effet du nickel sur l'activité du clone Ni-5-#5 est inversé en fonction du substrat utilisé : une forte augmentation de l'activité par le nickel est mesurée sur la pénicilline G et une faible inactivation sur le CENTA.

Substrat :	Pénicilline G			CENTA		
Clone	k_{obs}	k_{obs} avec 0,1 mM Ni(II)	Effet 0,1 mM Ni(II) sur le k_{obs}	k_{obs}	k_{obs} avec 0,1 mM Ni(II)	Effet 0,1 mM Ni(II) sur le k_{obs}
Ni-5-#1	Activité non mesurable			$1,1 \text{ s}^{-1}$	$0,76 \text{ s}^{-1}$	0,7 X
Ni-5-#2	$8,5 \text{ s}^{-1}$	$3,5 \text{ s}^{-1}$	0,4 X	$2,6 \text{ s}^{-1}$	$0,6 \text{ s}^{-1}$	0,2 X
Ni-5-#3	$7,7 \text{ s}^{-1}$	$4,6 \text{ s}^{-1}$	0,6 X	$1,3 \text{ s}^{-1}$	$0,8 \text{ s}^{-1}$	0,6 X
Ni-5-#5	25 s^{-1}	40 s^{-1}	1,6 X	14 s^{-1}	12 s^{-1}	0,9 X

Tableau 33 Effet du nickel sur l'activité envers le CENTA de clones Ni-5.

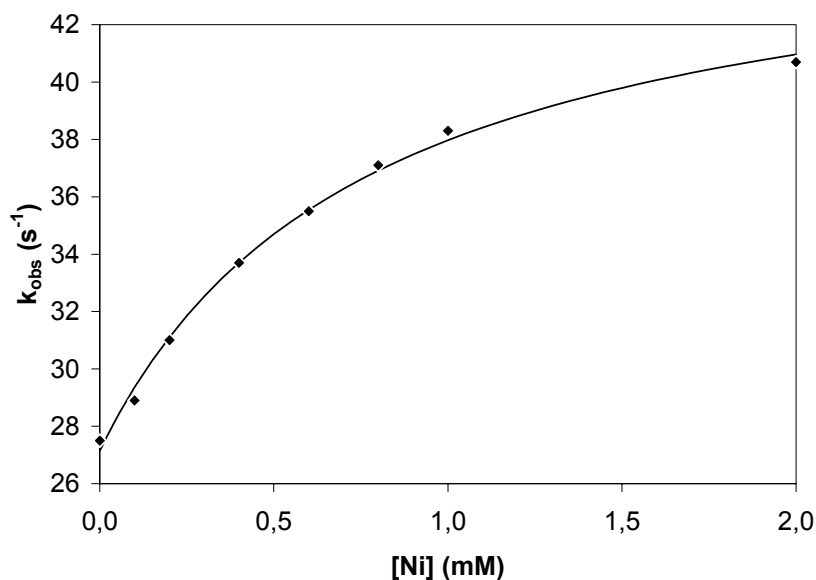
Etant donné que les activités sur le CENTA sont plus faibles, les expériences suivantes ont été réalisées sur la pénicilline G.

2.1.2. Calcul de constantes de dissociation

Pour calculer la constante de dissociation (K_d) du complexe nickel–enzyme, les constantes de vitesse ont été mesurées à différentes concentrations en acétate de nickel. Nous avons pu en tirer le graphique de la vitesse observée (k_{obs}), en fonction de la concentration en nickel ($[Ni]$). La courbe correspondant aux points expérimentaux a été calculée grâce à la formule (cf. Annexe 2, page 178) :

$$k_{obs} = k_E \cdot \frac{K_d}{K_d + [L]} + k_{E \cdot L} \cdot \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

L'expérience a été réalisée pour six clones et les courbes obtenues sont reprises à la Figure 71.



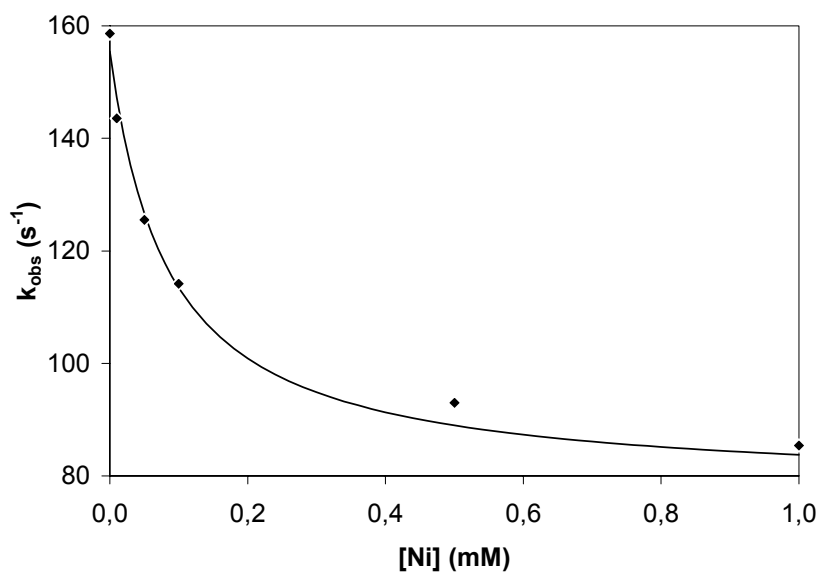
Clone : Ni-5-#5

$$k_E = 27,1 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{E \cdot Ni} = 46,2 \pm 1,0 \text{ s}^{-1}$$

$$K_d = 0,76 \pm 0,10 \text{ mM}$$

$$R = 0,998$$



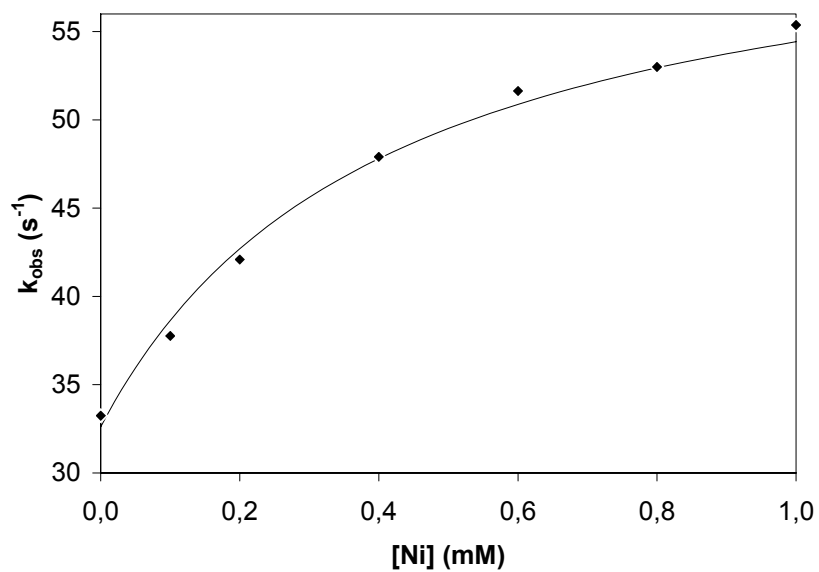
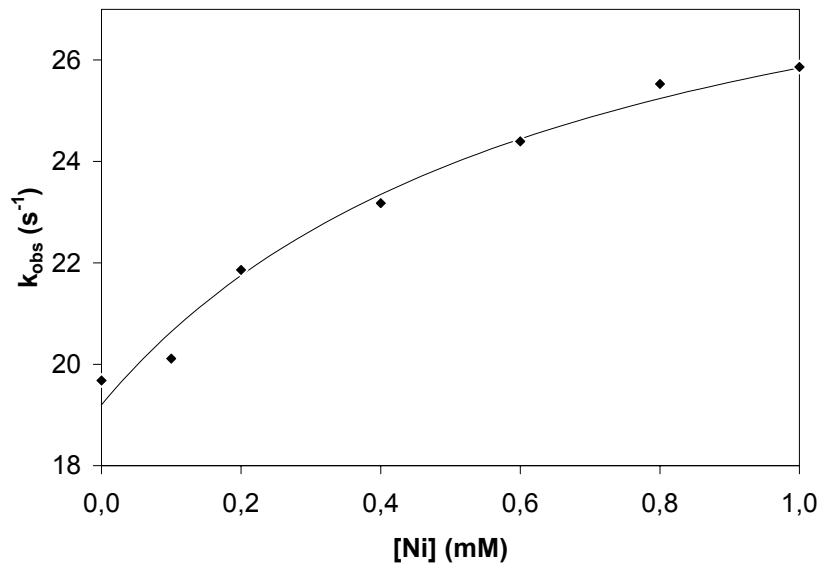
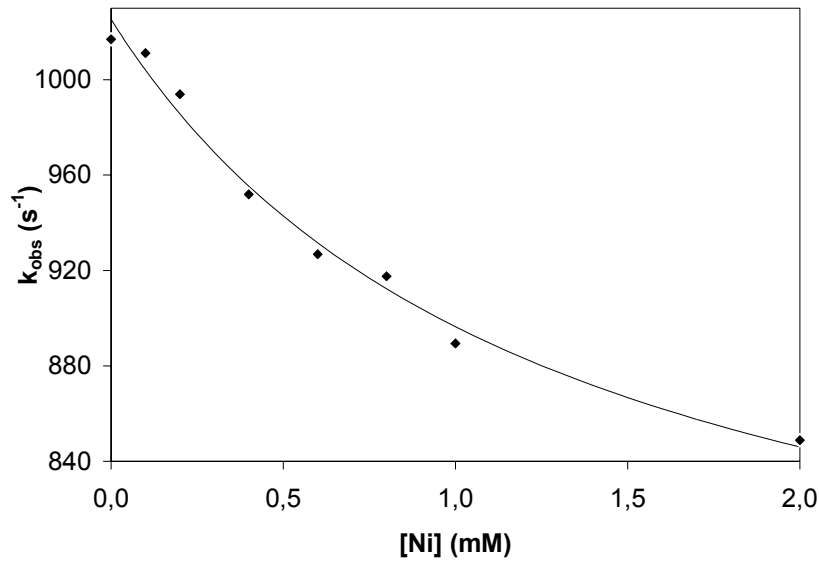
Clone : Ni-5-#12

$$k_E = 156,2 \pm 2,5 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{E \cdot Ni} = 82,4 \pm 2,9 \text{ s}^{-1}$$

$$K_d = 0,070 \pm 0,013 \text{ mM}$$

$$R = 0,996$$



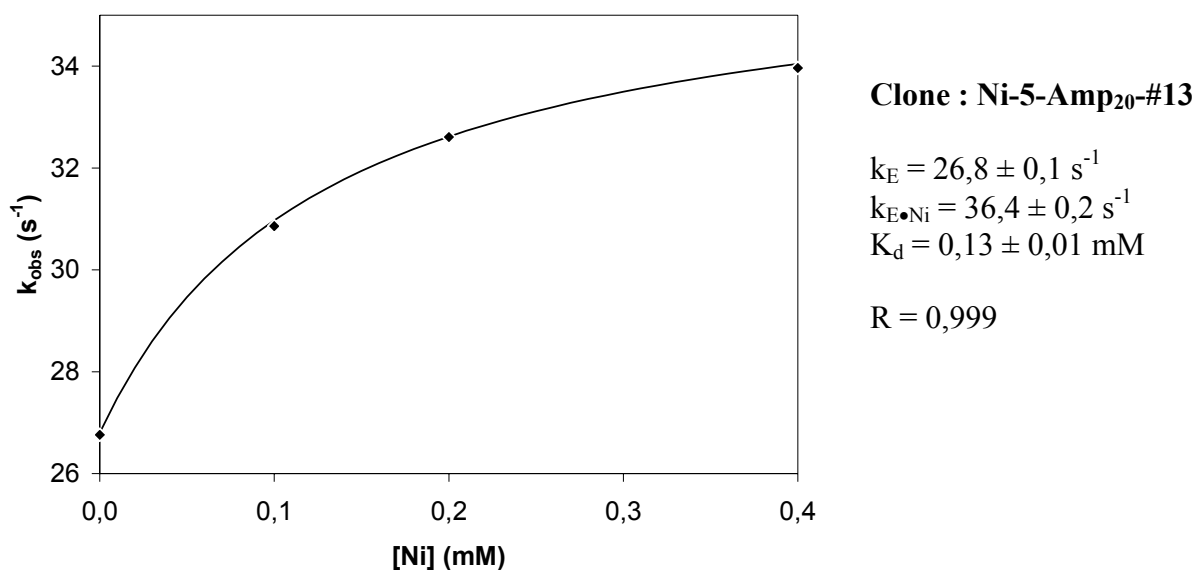


Figure 71 Graphiques de l'activité catalytique en fonction de la concentration en nickel pour six clones issus de la sélection pour affinité pour le nickel. Les valeurs de k_E , $k_{E \cdot Ni}$ et K_d trouvées par 'curve fitting' sont également indiquées.

Le Tableau 34 résume les valeurs de k_E , $k_{E \cdot Ni}$ et K_d obtenues. La meilleure affinité pour le nickel est observée pour le clone Ni-5-#12 qui a une constante de dissociation de $7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Les autres valeurs de K_d varient entre 10^{-4} M et 10^{-3} M . Le clone Ni-5-Amp₂₀-#11 voit son activité catalytique doublée lorsqu'il est complexé au nickel. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre la séquence des différents clones et la modulation de l'activité due au nickel. En effet, les clones Ni-5-#5 et Ni-5-Amp₂₀-#7 sont activés, tandis que le clone Ni-5-Amp₂₀-#5 est inhibé en présence de nickel. Or ces trois mutants possèdent les mêmes séquences au niveau des boucles 1 et 3. Le nombre de résidus histidine ne semble pas non plus influencer l'affinité pour le nickel : le clone Ni-5-#12, qui contient cinq histidines, a une affinité 18 fois plus élevée pour le nickel par rapport au clone Ni-5-Amp₂₀-#5, qui porte six histidines.

Clone	k_E	$k_{E \bullet Ni}$	Effet du Ni(II) sur l'activité	K_d	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)
Ni-5-#5	$27,1 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$	$46,2 \pm 1,0 \text{ s}^{-1}$	+ 70 %	$0,76 \pm 0,10 \text{ mM}$	C-H-A-S-H-L-P-C	A-R-H	A-H-G-T-N-L
Ni-5-Amp ₂₀ -#7	$19,5 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$	$32,9 \pm 3,2 \text{ s}^{-1}$	+ 69 %	$1,04 \pm 0,46 \text{ mM}$	C-H-A-S-H-L-P-C	A-R-H	H-E-G-H-N-L
Ni-5-Amp ₂₀ -#5	$1.025 \pm 6 \text{ s}^{-1}$	$731 \pm 38 \text{ s}^{-1}$	- 29 %	$1,28 \pm 0,34 \text{ mM}$	C-H-A-S-H-L-P-C	A-R-H	H-H-T-H-S-L
Ni-5-Amp ₂₀ -#11	$32,9 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$	$67,7 \pm 2,0 \text{ s}^{-1}$	+ 106 %	$0,55 \pm 0,08 \text{ mM}$	C-H-Y-S-H-H-R-C	G-E-H	A-H-G-R-N-N
Ni-5-#12	$156,2 \pm 2,5 \text{ s}^{-1}$	$82,4 \pm 2,9 \text{ s}^{-1}$	- 47 %	$0,070 \pm 0,013 \text{ mM}$	C-L-F-H-S-H-P-C	G-A-Y	H-G-H-S-H-N
Ni-5-Amp ₂₀ -#13	$26,8 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$	$36,4 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$	+ 36 %	$0,13 \pm 0,01 \text{ mM}$	C-Y-R-A-Q-L-P-C	G-H-R	H-G-G-H-H-G

Tableau 34 Bilan des valeurs de k_E , $k_{E \bullet Ni}$ et K_d obtenues pour quelques clones issus de la sélection sur le nickel. La séquence de ces clones est également indiquée.

2.1.3. Contrôles

(a) Effet du nickel sur l'activité du phage sauvage et de la banque naïve

L'influence du nickel sur l'activité catalytique du phage-enzyme sauvage fd-bla₄ et sur la banque fd-bla₄-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶ non sélectionnée a été testée : l'activité a été mesurée, en présence ou non de Ni(II), à une concentration de 10⁻⁴ M. Le nickel n'a aucun effet sur l'activité du phage sauvage et de la banque naïve.

(b) Complexation du nickel par l'EDTA

Pour vérifier si le nickel n'était pas déjà complexé à la β -lactamase lors de la préparation des phages, des cinétiques ont été réalisées en présence ou non d'EDTA¹³ à une concentration de 10⁻² M. Aucune différence significative de l'activité catalytique des clones Ni-5-Amp₂₀-#5, #7, #9 et #11 n'a été détectée.

2.2. Régulation par la kanamycine ou la sulfanilamide

2.2.1. Influence du ligand sur l'activité catalytique de clones Sulf₁-5 et Kana₁-6

Malgré les résultats négatifs obtenus dans les tests ELISA, l'activité catalytique de quelques clones issus des sélections Sulf₁-5 et Kana₁-6 a été mesurée en présence ou non du ligand. Comme le montre le Tableau 35, aucun effet significatif de la cible sur l'activité n'a pu être mis en évidence. L'activité des clones Sulf₁-5-#1 et Sulf₁-5-#2 est trop faible pour pouvoir être détectée.

Clone	k _{obs}	k _{obs} avec 10 ⁻³ M Kana	Effet 10 ⁻³ M Kana sur le k _{obs}
Kana ₁ -6-#1	835 s ⁻¹	795 s ⁻¹	0,95 X

Clone	k _{obs}	k _{obs} avec 10 ⁻⁴ M Sulf	Effet 10 ⁻⁴ M Sulf sur le k _{obs}
Sulf ₁ -5-#1	Activité non mesurable		
Sulf ₁ -5-#2	Activité non mesurable		
Sulf ₁ -5-#3	470 s ⁻¹	460 s ⁻¹	0,98 X
Sulf ₁ -5-#4	765 s ⁻¹	775 s ⁻¹	1,01 X
Sulf ₁ -5-#5	835 s ⁻¹	795 s ⁻¹	1,05 X

Tableau 35 Effet du ligand sur l'activité de phages-enzymes issus des sélections sur la kanamycine et sur la sulfanilamide.

¹³ L'EDTA complexe les métaux avec une très forte affinité.

2.2.2. Influence du ligand sur l'activité catalytique de clones Kana₂-6

La même expérience a été réalisée par Stéphane Messe, dans le cadre d'un travail de mémoire, sur des clones issus de la sélection sur la kanamycine, avec alternance de support et d'agent bloquant. Un clone montre une augmentation de l'activité (de 44 %) en présence de kanamycine et la constante de dissociation de ce clone est de 0,66 mM.

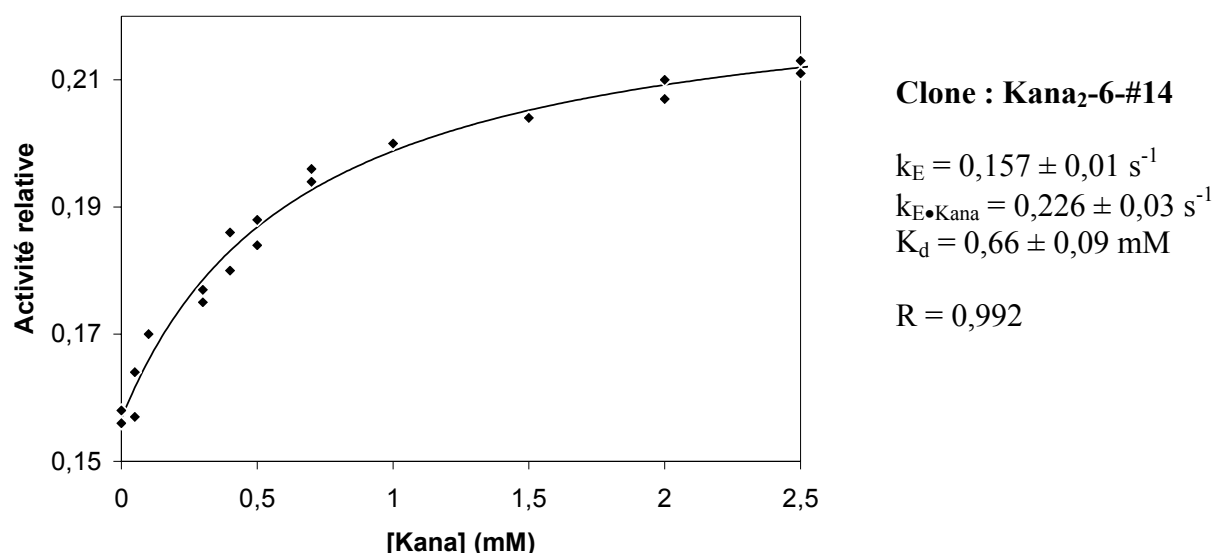


Figure 72 Graphique de l'activité relative en fonction de la concentration en kanamycine pour le clone Kana₂-6-#14. Les valeurs de k_E , $k_{E \cdot \text{Ni}}$ et K_d trouvées par 'curve fitting' sont également indiquées.

La séquence de ce clone est indiquée dans le Tableau 36.

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 269-271 (L ₃)
fd-blaA	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg	Gln-Ala-Thr
Kana ₂ -6-#26	Cys-Arg-Thr-Ser-His-Arg-Pro-Cys	Gly-Arg-Arg	Arg-Lys-Lys

Tableau 36 Séquence du clone Kana₂-6-#26.

III. Conclusions

Grâce à une sélection pour affinité, nous avons isolé les clones de la banque fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶ possédant une affinité pour le nickel. L'influence du nickel sur l'activité enzymatique a ensuite été déterminée pour quelques clones. Tous les clones testés montrent, soit une activation, soit une inhibition suite à la complexation de l'ion métallique. La meilleure activation a été obtenue pour le clone Ni-5-Amp₂₀-#11, qui voit son activité doublée lorsqu'il est complexé au nickel, tandis que la meilleure inhibition a été obtenue pour le clone Ni-5-#2 avec une diminution de 77 % de l'activité envers le CENTA. Les constantes de dissociation de quelques complexes clone-Ni ont ensuite été calculées en mesurant l'activité catalytique en présence de différentes concentrations en nickel. La meilleure affinité a été obtenue pour le clone Ni-5-#12 qui a une constante de dissociation de 7.10^{-5} M. Les autres valeurs de K_d varient entre 10^{-4} M et 10^{-3} M. Les séquences montrent que tous les clones sélectionnés sur le nickel possèdent au minimum deux résidus histidine, qui permettent la complexation de l'ion métallique.

En ce qui concerne les sélections sur les molécules organiques (la kanamycine ou la sulfanilamide), un protocole particulier semble nécessaire pour éviter de sélectionner les clones non spécifiques. Les différents tours de sélection sur la kanamycine ont donc été effectués en alternant le support utilisé pour la fixation du ligand, ainsi que l'agent permettant le blocage des sites non spécifiques. En utilisant cette méthode de sélection pour affinité pour la kanamycine, aucune augmentation de rendement n'a été observée au fur et à mesure de la sélection. De plus, les clones issus de cette sélection ne fournissent aucun signal lors des tests ELISA. Notons que l'ELISA est une expérience similaire à la capture d'affinité effectuée lors des sélections. Il n'est donc pas surprenant qu'aucun signal ne soit détecté. Cependant, l'analyse des séquences de clones issus de cette sélection montre qu'il peut y avoir sélection même si aucun enrichissement n'est observé dans le rapport des phages élus sur les phages engagés. De plus, le criblage d'activité (pour régulation), nous a permis de mettre en évidence un clone qui voit son activité enzymatique augmentée de 44 % en présence du ligand. La constante de dissociation de ce clone a été estimée à $6,6.10^{-4}$ M. Cette faible affinité expliquerait les faibles rendements de la sélection et l'absence de signal lors des tests ELISA.

Nous avons montré que la complexation du ligand affecte essentiellement le k_{cat} et non le K_M . Le fait qu'il n'y ait pas de modulation du K_M indiquerait que ni l'affinité de l'enzyme pour le substrat (K_S), ni le rapport entre les constantes de vitesse d'acylation et de désacylation (k_3/k_2) ne sont affectés par cette complexation. Une autre explication possible serait que si le K_S est

modifié, le rapport k_3/k_2 est affecté de manière compensatoire. L'effet de la complexation sur le k_{cat} peut s'interpréter, dans le cadre de la théorie du complexe activé, comme une modification de l'affinité relative de l'enzyme pour l'état de transition par rapport au substrat. Cet effet pourrait résulter de modifications mineures de la structure de l'enzyme lors de la complexation du ligand.

Comme nous l'avons vu précédemment (cf. Reconnaissance moléculaire, page 13), la constante de dissociation moyenne d'un anticorps ou d'un récepteur pour une petite molécule est comprise entre 10^{-6} et 10^{-10} M. L'affinité obtenue dans notre cas est donc très faible par rapport à ce que nous pouvions espérer. Elle est également plus faible que les affinités observées dans d'autres exemples d'ingénierie de site de complexation pour de petites molécules [13, 129, 134]. Mais, contrairement à ces exemples, nous ne disposons pas de cavité de départ, ce qui constitue une difficulté nouvelle. Cette affinité devrait pouvoir être augmentée de plusieurs ordres de grandeur par maturation d'affinité. Cette méthode consiste à soumettre tout le gène de la β -lactamase chimérique à une PCR mutagénisante, la banque générée étant ensuite soumise à une nouvelle sélection pour affinité. De multiples cycles de mutation et sélection peuvent être réalisés afin de produire des clones ayant une meilleure affinité pour la cible.

IV. Matériels et méthodes

1. Sélections *in vitro* pour affinité

Les sélections ont été réalisées sur la banque finale fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶ non sélectionnée pour activité catalytique. Les différents tours de sélection ont été effectués avec des phages fraîchement préparés (le jour même) afin de limiter la protéolyse de la protéine de fusion. Le tampon employé pour les dilutions des solutions de phages est le TBS (Tris-Buffered Saline : 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5). Pendant les expériences de sélection, des tubes siliconés de 1,5 ml (Sigma) ont été utilisés afin de minimiser l'adsorption des phages sur les parois. Les incubations ont été réalisées à température ambiante, sur une roue (6,5 rpm) permettant une agitation douce. Lorsque les sélections sont effectuées en présence de billes magnétiques, un portoir aimanté permet la séparation des billes et du tampon. En cas d'utilisation de billes d'agarose, celles-ci sont culotées par centrifugation à 6.000 rpm, pendant 2 min.

1.1. Sélection sur la kanamycine et la sulfanilamide

1.1.1. Première tentative de sélection : Sulf_i et Kana_i

Les sélections sur la kanamycine et sur la sulfanilamide ont été réalisées en parallèle. Dans un premier temps, 20 µl (1 mg) de billes magnétiques recouvertes de streptavidine (Dynabeads M-270, Dynal) sont lavées trois fois avec 1 ml de TBS. Elles sont ensuite incubées avec 1 ml de M-TBS (TBS contenant 2 % (w/v) de protéines de lait (Blotting grade non fat dry milk, Bio-Rad), pendant une heure, sur roue. Cette étape permet de bloquer les sites non spécifiques. Le marquage est ensuite réalisé avec 5.10⁻⁵ M de ligand biotinylé (Biot-Kana ou Biot-Sulf). Cette concentration en marqueur permet la saturation des sites streptavidine par le marqueur biotinylé. Ce marquage est réalisé dans 1 ml de TBS contenant 0,1 % de protéines de lait, par incubation pendant une heure. Les billes sont ensuite lavées trois fois avec 1 ml de TBS. Les phages sont ajoutés à raison de 5.10¹² phages (quantité calculée à partir de la densité optique¹⁴) par sélection dans 1 ml de TBS contenant 1 % (w/v) de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma). L'incubation des phages avec les billes marquées se fait pendant trois heures. Les billes sont ensuite lavées avec 1 ml de T-TBS (TBS contenant 0,1 % (v/v) de Tween 20 (Polyoxyéthylènesorbitan

¹⁴ Le coefficient d'extinction molaire de fd-bla à 265 nm vaut 8,4.10⁷ M⁻¹cm⁻¹.

monolaurate, Sigma)) pour éliminer les phages qui ne sont pas accrochés spécifiquement. Le nombre de lavages dépend du tour de sélection (cf. Tableau 37).

Tour	Nombre de lavages
1	1
2	2
3	2
4	3
5	5
6	5

Tableau 37 Nombre de lavages après incubation des phages, en fonction du tour de sélection.

L'élution est réalisée par compétition avec la kanamycine (Invitrogen) si la sélection est réalisée sur Biot-Kana et avec la sulfaméthazine (Acros Organics) si la sélection est réalisée sur Biot-Sulf.

En pratique, les billes sont incubées avec 10^{-4} M de ligand non biotinylé, dans 400 μ l de TBS, pendant 10 min. 100 μ l de BSA 5% sont ensuite ajoutés à l'éluat et le mélange est transféré dans une cassette à dialyse (Slide-A-Lyser Dialysis Cassette 10.000 MWCO, Pierce). Une dialyse est réalisée contre 2 litres de TBS pendant une nuit, à 4°C. Ceci permet d'éliminer le ligand utilisé pour l'élution qui inhiberait la croissance des bactéries après infection par l'éluat.

Six tours de sélection ont été effectués sur la kanamycine et cinq tours sur la sulfanilamide.

1.1.2. Deuxième tentative de sélection sur la kanamycine : Kana₂

Alternance de support et d'agent bloquant

La deuxième tentative de sélection pour la kanamycine a été réalisée en alternant les supports servant à l'immobilisation de la kanamycine biotinylée. Deux types de billes ont été utilisés : les billes magnétiques recouvertes de streptavidine et des billes d'agarose couplée à l'avidine (Sigma). Pour bloquer les sites non spécifiques, deux tampons ont été employés en alternance : le M-TBS ou le G-TBS (TBS contenant 1 % (w/v) de gélatine (EIA Grade Reagent Gelatin, Bio-Rad)). La quantité de support a été réduite à chaque tour de sélection. Les conditions sont reprises dans le Tableau 38.

Tour	Support	Agent bloquant	Nombre de lavages
Kana₂-1	100 µl billes magnétiques	Lait	1
Kana₂-2	50 µl avidine-agarose	Gélatine	3
Kana₂-3	30 µl billes magnétiques	Lait	4
Kana₂-4	20 µl avidine-agarose	Gélatine	5
Kana₂-5	20 µl billes magnétiques	Lait	5
Kana₂-6	20 µl avidine-agarose	Gélatine	5

Tableau 38 Conditions pour chaque cycle de sélection sur la kanamycine.

A part ces modifications, le protocole de sélection est le même que précédemment. Six tours ont été réalisés sur la kanamycine.

1.1.3. Troisième tentative de sélection sur la kanamycine : Kana₃

Elution à la trypsine

Une dernière tentative de sélection a été effectuée sur la kanamycine en utilisant la trypsine (Sigma) pour éluer les phages accrochés. En pratique, 500 µl d'une solution 2.10^{-7} M en trypsine (dans du tampon TBS) sont ajoutés aux billes et une incubation de 20 min. est réalisée. L'éluat obtenu est repris comme tel (sans dialyse) pour l'infection des bactéries.

1.2. Sélection sur le nickel

La sélection pour affinité pour le nickel a été réalisée avec les «Ni-NTA Magnetic Agarose Beads» (QIAgen). Les billes sont lavées trois fois avec un tampon de lavage (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0,1% Tween 20, pH 7,8), puis incubées avec 5.10^{12} phages dans 1 ml du même tampon, pendant 2 heures. Les phages non spécifiques sont ensuite éliminés par lavages et enfin, l'élution est réalisée par incubation des billes dans 1 ml de tampon d'élution (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 0,1% Tween 20, pH 7,8), pendant une minute.

Les cinq tours de sélection ont été effectués de la même manière, la seule différence étant le nombre de lavages servant à éliminer les phages non spécifiques (cf. Tableau 39).

Tour	Nombre de lavages
Ni-1	1
Ni-2	3
Ni-3	4
Ni-4	5
Ni-5	5

Tableau 39 Nombre de lavages après incubation des phages en fonction du tour de sélection.

1.3. Calcul du rendement des tours de sélection

Le rendement est calculé en faisant le rapport du titre de phages élués sur le titre de phages engagés. Les titres sont calculés de la façon suivante : des cellules TG1 en phase exponentielle de croissance sont infectées par différentes dilutions de phages (avant et après sélection). Après incubation pendant 30 min. à 37°C, les bactéries sont étalées sur boîtes LB-Tet (LB-agar contenant 7,5 mg/l de tétracycline), puis mises à croître pendant une nuit à 37°C. Enfin, les colonies sont comptées.

1.4. Amplification des phages élués

Les phages élués sont amplifiés par infection de 25 ml d'une culture de cellules TG1. Les cellules infectées sont transférées dans 250 ml de LB-Tet et incubées pendant une nuit, à 37°C, sous agitation. Après centrifugation, le culot de bactéries est resuspendu dans 250 ml de milieu LB-Tet frais et une culture rapide est réalisée par incubation pendant 3 à 4 h, à 30°C, sous agitation. Les phages sont ensuite purifiés à partir du surnageant de culture (cf. Partie expérimentale générale, page 157).

2. Caractérisation des phages sélectionnés

2.1. Tests ELISA

Le tampon de dilution et de lavage utilisé au cours des tests ELISA est le tampon T-PBS (PBS (Phosphate-Buffered Saline : 1,37 M NaCl, 26,8 mM KCl, 42,9 mM Na₂HPO₄, 14,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4) contenant 0,1 % v/v de Tween 20). Les incubations sont faites à température ambiante, sur plaque agitante.

2.1.1. ELISA sur la kanamycine biotinylée

Une plaque ELISA recouverte de streptavidine (StreptaWell, Roche) est bloquée avec 200 µl/puits de tampon M-PBS (PBS contenant 2 % w/v de protéine de lait) pendant une heure. Pour l'immobilisation, 200 µl/puits d'une solution $5 \cdot 10^{-5}$ M de kanamycine biotinylée sont ajoutés. Après une heure d'incubation, trois lavages sont réalisés. Les phages sont ensuite ajoutés, à raison de 10^{12} phages/puits et incubés pendant une heure. Dans le cas du test sur Kana_I-6, des concentrations plus faibles (10^{10} et 10^{11} phages/puits) ont également été testées. Après trois lavages, la fixation des phages ayant une affinité vis-à-vis de la molécule biotinylée est révélée par l'addition de 100 µl/puits d'une solution contenant l'anticorps anti-M13 gp8 de souris conjugué à la peroxydase (HRP/anti-M13, Amersham). Après lavage, la révélation est effectuée par ajout de 100 µl/puits du substrat de la peroxydase, préparé en dissolvant 2 mg d'ABTS (acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique, Aldrich) dans 10 ml d'acide citrique 50 mM pH 4 et 0,05 % de peroxyde d'hydrogène. L'absorbance est lue à 405 nm.

2.1.2. ELISA sur la BSA

Une plaque ELISA adsorbante (NUNC) est préparée avec 100 µl/puits d'une solution à 10 µg/ml de BSA, dans du tampon PBS. Après une nuit d'incubation sans agitation, les puits sont lavés, puis bloqués avec 200 µl de M-PBS. Après lavage, les phages sont ajoutés à raison de 10^{11} phages/puits, le reste de la procédure étant identique à celui de l'ELISA avec la kanamycine.

2.2. Criblage PCR et séquençage

Le gène de la β-lactamase de clones isolés est amplifié par criblage PCR et séquencé. Ces protocoles sont décrits dans la Partie expérimentale générale, page 162.

3. Criblage pour régulation

L'activité catalytique de clones issus des différentes sélections a été mesurée en présence ou non du ligand soluble. Dans le cas du nickel, une solution d'acétate de nickel a été utilisée.

4. Sélection *in vivo* pour activité catalytique

Les phages issus de la sélection pour affinité pour le nickel ont subi une sélection afin de ne garder que les clones conférant une résistance bactérienne à l'ampicilline d'au moins 5 % de celle conférée par le phage sauvage. Cette sélection a été réalisée en étalant les cellules

bactériennes infectées par la population Ni-5 sur boîtes LB-Tet contenant 20 mg/ml d'ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37°C, quelques colonies isolées sont mises en culture pour permettre l'amplification des phages.