

Tous les milieux et toutes les solutions sont préparés à partir d'eau eau déminéralisée avec un appareil de filtration Millipore (H₂Oq) et stérilisés en autoclave.

1. Bactéries

1.1. Souches bactériennes utilisées

Les souches suivantes d'*E. coli* ont été utilisées car elles possèdent un épisome F' nécessaire à la prolifération des bactériophages de type M13 ou fd.

TG1 : *supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]*. Cette souche ne modifie ni ne restreint l'ADN transfecté.

XL1-Blue : *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 TN10(*ter*^r)]*. Le plasmide F' de cette souche possède un gène de résistance à la tétracycline.

CJ236 : *dut1 ung1 thi-1 relA1 / pCJ105(*cam*^r F')*. Cette souche sert à préparer l'ADN contenant de l'uracile pour la mutagenèse dirigée. Le gène de résistance au chloramphénicol est porté par le plasmide F' ; la croissance de CJ236 en présence de chloramphénicol sélectionne la rétention du F'.

1.2. Préparation de cellules électro-compétentes

La souche TG1 a été utilisée pour chaque préparation de cellules compétentes. Cette opération consiste à faire subir aux cellules une série de lavages, pour éliminer au maximum la présence de sels. En effet, lors de l'électroporation, les cellules subissent un choc électrique et une concentration en sels trop importante provoquerait un arc électrique qui endommagerait celles-ci. En pratique, une préculture de TG1 est préparée en inoculant les cellules TG1 dans 10 ml de milieu LB (Gibco-BRL) et en les incubant une nuit, à 37°C, sous agitation. Cette préculture est transférée dans 1 l de LB et incubée à 37°C, sous agitation, jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,5 à 0,7. La culture est alors centrifugée à 5.000 rpm, pendant 5 min, à 4°C. Le culot de bactéries est resuspendu dans 1 l d'H₂Oq, puis à nouveau centrifugé et resuspendu successivement (entre chaque centrifugation) dans 500 ml d'H₂Oq, dans 20 ml de glycérol 10 %, et finalement dans 2 ml de glycérol 10 %. L' H₂Oq et le glycérol 10 % utilisés sont stériles et gardés à 4°C. Les cellules sont aliquotées en volume de 100 µl, puis congelées directement dans un mélange carboglace-éthanol et stockées à -80°C.

La compétence des cellules peut être estimée par électroporation avec 2 ng d'un plasmide de référence : le pUC18. Celui-ci confère aux bactéries une résistance à l'ampicilline. Les compétences obtenues varient entre 10^8 et 10^9 transformants par μg de plasmide électroporé.

1.3. Transformation d'ADN par électroporation

Le principe de l'électroporation est de soumettre les bactéries à une décharge électrique en présence d'ADNdb circularisé (plasmide ou phage). Ce choc électrique provoque la formation de pores dans la membrane et dans la paroi bactérienne, ce qui permet à l'ADN d'entrer dans la bactérie.

En pratique, 100 μl de cellules compétentes sont décongelées lentement sur glace en évitant de dépasser les 5°C. Elles sont ensuite mélangées à 100 à 200 ng de l'ADN à transformer dans une cuvette d'électroporation (Eurogentec) pré-refroidie sur glace. Une décharge de 2.500 V est immédiatement appliquée avec le «Cell Ject Basis» (Eurogentec). 1 ml de milieu SOC (pour 200 ml de milieu SOC : 4 g caséine (Gibco-BRL), 1 g extrait de levure (Merck), 100 mg NaCl et 2 ml KCl 250 mM, juste avant emploi : ajout de 2 ml MgCl_2 1 M et 4 ml glucose 1 M) est ajouté immédiatement après le choc électrique et le mélange est incubé pendant 30 min., à 37°C, sous agitation. Ensuite, les cellules sont, soit diluées et étalées sur boîte LB-agar (Gibco-BRL) contenant l'antibiotique approprié, soit mises directement en culture liquide dans le volume adéquat de milieu LB contenant également l'antibiotique.

2. Phage display

2.1. Amplification et purification des phages

2.1.1. Infection des bactéries

Une culture de bactéries TG1 est préparée en inoculant 50 μl de cellules TG1 à 10 ml de milieu LB et en l'incubant à 37°C, sous agitation, jusqu'à l'obtention d'une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5 à 1. Ensuite, les bactéries sont infectées par les phages lors d'une incubation à 37°C, pendant 30 min., sans agitation. L'incubation sans agitation permet au pilus de la bactérie de se former. C'est en effet par ce pilus que les phages pénètrent dans les cellules. Une incubation supplémentaire de 30 min. est alors effectuée, à 37°C, sous agitation.

2.1.2. Amplification des phages

La culture de TG1 infectée par les phages est transférée dans 250 ml de milieu LB-Tet (milieu LB contenant 7,5 mg/l de tétracycline) pour une incubation sous agitation, soit à 23°C pendant 2 jours, soit à 37°C pendant une nuit.

Lorsque la préparation de phages est utilisée pour les sélections pour affinité, une troisième méthode de culture alternative est mise en oeuvre : après incubation à 23°C ou à 37°C, la culture est centrifugée à 6.000 rpm, pendant 10 min. et le culot de bactéries resuspendu dans 250 ml de milieu LB-Tet frais avant une incubation de 3 à 4 h, à 30°C, sous agitation. Cette culture rapide dans du milieu frais permet de limiter la protéolyse de la protéine de fusion pIII- β -lactamase, le milieu contenant moins de protéases bactériennes.

2.1.3. Purification des phages

La culture est centrifugée à 10.000 rpm, pendant 10 min. à 4°C, pour séparer les bactéries du surnageant qui contient les phages. Pour précipiter ces derniers, 1/5 de volume d'une solution de PEG/NaCl (20 % polyéthylène glycol 6.000 et 2,5 M NaCl) est ajouté au surnageant de culture et le mélange est incubé pendant 1h, à 4°C. Après centrifugation à 10.000 rpm, pendant 10 min., à 4°C, le culot de phages est resuspendu dans 10 ml d'H₂Oq, puis la solution est filtrée sur 0,45 μ m (Millex-HV, Millipore) afin d'éliminer les débris cellulaires ; enfin, une deuxième précipitation est réalisée en ajoutant 1/5 de volume de PEG/NaCl. Le mélange est alors incubé pendant 20 min. à 4°C et est ensuite centrifugé à 10.000 rpm pendant 10 min. à 4°C. Le culot de phages est finalement resuspendu dans 1 ml de TBS (Tris-Buffered Saline : 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5).

2.2. Caractérisation des solutions de phages

2.2.1. Mesure de la concentration des phages

La concentration d'une solution de phages peut être calculée à partir de la densité optique de la solution à 265 nm en tenant compte du coefficient d'absorption molaire [231]. Le coefficient d'absorption du phage fd-bla vaut $8,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Cette valeur a été calculée en multipliant le coefficient d'absorption molaire du phage fd par le rapport des tailles (en nombre de nucléotides) du phage fd-bla et du phage fd.

2.2.2. Titrage d'une solution de phages

Le titrage de la solution de phages est réalisé par l'infection de cellules TG1 avec la solution de phages à différentes dilutions. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte LB-Tet. Après incubation d'une nuit, à 37°C, les colonies sont comptées ce qui permettra de calculer le nombre de TU de la solution de phages. Cette méthode de titrage est également utilisée pour évaluer le nombre de phages entrant et sortant dans les expériences de sélection pour affinité.

2.2.3. Mesure de l'infectivité des phages

L'infectivité des phages est déterminée en faisant le rapport du nombre de TU (transforming unit) d'une solution de phages et de sa concentration.

2.3. Mesure de l'activité catalytique des phage-enzymes

L'activité β -lactamase des phage-enzymes est mesurée, à température ambiante, dans un tampon phosphate 50 mM, à pH 7, en suivant l'hydrolyse du substrat en fonction du temps, soit avec la pénicilline G (Sigma) ($\Delta\epsilon_{232} = -1.042 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [232], soit avec le CENTA (synthétisé au laboratoire, par Michèle Bouchet) ($\Delta\epsilon_{405} = 6.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [233], par spectrométrie à 232 nm ou 405 nm respectivement.

2.4. Western Blot

Cette technique permet de visualiser la protéine de fusion pIII- β -lactamase. Dans un premier temps, les protéines du manteau phagique sont libérées par dénaturation. Elles sont ensuite séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant. La révélation de la pIII et de la protéine de fusion est réalisée par ajout d'un anticorps anti-pIII. En pratique, les échantillons (15 μl), contenant environ 10^{12} phages, sont dénaturés par ajout de 5 μl de tampon de charge (50 mM Tris HCl (pH 6,8), 10 % glycérol, 2 % SDS, 5 % β -mercaptoéthanol, 0,1 % bleu de bromophénol) et incubés pendant 10 min. dans un bain d'eau bouillante. Après addition de bleu de bromophénol, les échantillons et le marqueur de poids moléculaire (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad) sont posés sur le gel polyacrylamide 12 %. Celui-ci est composé de deux parties : un gel de concentration des échantillons (4 % (w/v) acrylamide, 0,13 % (w/v) bisacrylamide, 125 mM Tris HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) persulfate d'ammonium, 0,01 % (v/v) TEMED) et, en dessous, un gel de séparation (12 % (w/v) acrylamide, 0,4 % (w/v) bisacrylamide, 375 mM Tris (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) persulfate d'ammonium, 0,04 % (v/v) TEMED). L'électrophorèse est réalisée dans un

tampon Tris–glycine (25 mM Tris, 250 mM glycine (pH 8,3), 0,1 % (w/v) SDS) à 200 V et 40 mA. Lorsque la séparation des protéines est effective, le gel est incubé 10 min. dans le tampon de transfert (39 mM glycine, 48 mM Tris, 0,037 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) méthanol). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (Bio-Rad), dans le tampon de transfert, à 4°C, à 100 V et 250 mA, durant 8 heures.

La révélation est finalement réalisée. La membrane est d'abord bloquée par deux incubations successives de 30 min. dans du TBS contenant 5 % w/v de protéines de lait (Blotting grade non fat dry milk, Bio-Rad) et lavée 10 min. dans du T-TBS (TBS contenant 0,1 % (v/v) de Tween 20 (Polyoxyéthylènesorbitan monolaurate, Sigma)). Elle est ensuite incubée 1 à 2 heures dans une solution de T-TBS contenant 1 % de protéines de lait et l'anticorps anti-pIII de souris (Eurogentec) dilué 1.000 fois. Après trois lavages de 5 min. au T-TBS, la membrane est incubée 1 à 2 heures dans une solution de T-TBS contenant 1 % de protéines de lait et l'anticorps 'anti-souris' couplé à la phosphatase alcaline (GAM-AP, Bio-Rad) dilué 3.000 fois. Trois lavages au T-TBS sont à nouveau effectués, ainsi que deux lavages de 5 min. avec une solution de TBS. Finalement, la révélation est réalisée par étalement sur la membrane de 1 ml de substrat chémiluminescent de la phosphatase alcaline (Bio-Rad) et son exposition sur une plaque photographique.

3. Préparation de l'ADN des phages

3.1. Préparation de l'ADNsb

L'ADNsb est extrait des phages grâce au «QIAprep M13 Kit» (QIAGEN).

3.2. Préparation d'ADNdb

Les méthodes de préparation de l'ADNdb à partir d'une culture de bactéries sont basées sur la lyse alcaline des cellules, suivie de la purification de l'ADN.

3.2.1. Technique de purification par gradient de concentration de chlorure de césium

(a) Lyse des bactéries et récupération de l'ADNdb

Un litre de culture de phages est centrifugé à 6.000 rpm, pendant 10 min., à 4°C. Le culot de bactéries est resuspendu dans 400 ml de STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8). Une nouvelle centrifugation est effectuée et le culot est resuspendu dans 20 ml de solution CHIRON I (50 mM glucose, 25 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, pH 8). Les bactéries sont ensuite lysées par ajout de 2 ml de lysozyme (solution à 10 mg/l) et de 40 ml de solution CHIRON II

(200 mM NaOH, 1 % SDS). Le mélange est finalement neutralisé par l'ajout de 30 ml de solution CHIRON III (3 M acétate de potassium, 2 M acide acétique) à 4°C, suivi d'une incubation à 4°C pendant 10 min. Une centrifugation à 14.000 rpm, durant 45 min, à 4°C permet de séparer les débris cellulaires du surnageant qui contient l'ADN des phages. Cet ADN est précipité par ajout de 60 ml d'isopropanol au surnageant et centrifugation à 14.000 rpm, pendant 15 min, à température ambiante. Le précipité d'ADN est resuspendu dans 9 ml de TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8).

(b) Purification de l'ADN par gradient de concentration de chlorure de césium

Aux 9 ml de solution d'ADN, 9,9 g de CsCl et 290 µl de bromure d'éthidium (solution à 10 mg/ml) sont ajoutés. Le mélange est ensuite centrifugé à 55.000 rpm, pendant 40 h, à température ambiante, pour permettre au gradient de concentration de se former. L'ADN se concentre en une bande aisément repérable grâce à la coloration due au bromure d'éthidium. Cette bande est récupérée et le bromure d'éthidium éliminé par 6 extractions avec une solution d'isopropanol saturée en H₂O et CsCl et par une dialyse de l'ADN contre du TE, pendant une nuit.

3.2.2. Préparation d'ADNdb par kits commerciaux

Quatre kits ont été utilisés pour isoler et purifier l'ADNdb des phages : le «QIAGEN MaxiPrep» (QIAGEN) pour la préparation d'ADN en grande quantité ; le «Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit» (Bio-Rad), le «High Pure Plasmid Isolation Kit» (Roche) et le «QIAGEN MiniPrep» (QIAGEN) pour la préparation en petite quantité. Ils ont été utilisés suivant les instructions fournies par le fabricant.

4. Manipulations de l'ADNdb

4.1. Oligonucléotides

Tous les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés par Eurogentec.

Phosphorylation des oligonucléotides

Dans certains cas, les oligonucléotides doivent être phosphorylés pour permettre la ligation. En pratique, le mélange de 6,7 µM d'oligonucléotide avec 1 mM ATP, 1 µl de T4 Polynucleotide Kinase (New England BioLabs) dans un volume final de 30 µl de tampon (70 mM Tris HCl

(pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothréitol) est incubé à 37°C, pendant 1 h. Si nécessaire, la kinase est inactivée par incubation du mélange à 70°C, pendant 15 min.

4.2. Ligations

En général, les ligations ont été réalisées en tenant compte d'un rapport molaire insert/vecteur de 5, avec une unité de T4 DNA ligase (Roche) pour un volume final de 20 µl et 1 mM d'ATP, dans le tampon fourni avec la ligase (66 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7,5). Le mélange subit alors une incubation, soit à 16°C pendant une nuit, soit à 23°C pendant 2 h. Si c'est nécessaire, la ligase est ensuite inactivée par incubation du mélange à 65°C, pendant 15 min.

4.3. Restrictions

Toutes les enzymes de restriction proviennent de chez Roche et ont été utilisées suivant les instructions et avec les tampons fournis par le fabricant.

4.4. Purification de fragments d'ADNdb

4.4.1. Purification par extraction au phénol ou 'clean-up'

Cette étape permet d'éliminer les enzymes et les sels d'une solution d'ADN. Dans un premier temps, la solution d'ADN subit une extraction avec un mélange phénol/CHCl₃/alcool isoamylique (rapport en volume 25/24/1). Ensuite, deux lavages avec un mélange CHCl₃/alcool isoamylique (rapport en volume 24/1) sont réalisés pour éliminer toute trace de phénol. L'ADN est alors précipité par ajout de 1/10 de volume d'acétate de sodium 5 M et de 2,5 volumes d'éthanol. Ce mélange est incubé à 4°C pendant 30 min. et centrifugé à 14.000 rpm pendant 30 min. à 4°C. Le précipité d'ADN est ensuite lavé à l'éthanol 70 % et séché. Finalement, l'ADN est dissous dans le volume approprié de TE.

4.4.2. Purification par kits commerciaux

Trois kits ont été utilisés pour la purification de fragments d'ADNdb : le «Wizard PCR Preps DNA Purification System» (Promega) pour les bandes d'ADN isolées par migration sur gel d'agarose à bas point de fusion, le «High Pure PCR Purification Kit» (Roche) pour les fragments obtenus par PCR ou les mélanges de restriction et les colonnes «Chroma Spin» (Clontech) pour les mélanges de restriction. Le mode de purification se base sur les instructions fournies par les fabricants.

4.5. Analyse par électrophorèse

L'électrophorèse permet de séparer des fragments d'ADN selon leur taille et d'estimer la quantité d'ADN par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire. Les gels de polyacrylamide sont plus efficaces pour la séparation des petits fragments (entre 5 et 500 bp) et ont un pouvoir de résolution élevé. Les gels d'agarose ont un pouvoir de résolution moindre, mais ils permettent de séparer des fragments de 200 bp à environ 50 kb.

En pratique, après ajout de bleu de bromophénol, les échantillons et le marqueur de taille (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) sont posés sur le gel. La migration est ensuite réalisée et l'ADN est finalement visualisé par exposition du gel aux UV.

4.5.1. Gel de polyacrylamide

Le gel est composé de 8 % (w/v) de polyacrylamide, 0,08 % (w/v) de persulfate d'ammonium et 0,08 % (w/v) de TEMED, dans un tampon TAE (tris acétate : 40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA). L'électrophorèse est ensuite réalisée dans du TAE, à 200 V et 60 mA. Pour permettre la visualisation des bandes, le gel est incubé pendant 10 min. dans du tampon TAE contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium.

4.5.2. Gel d'agarose

Le gel est composé de 1 ou 2 % (w/v) d'agarose (Eurogentec) dans un tampon TAE contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est faite dans du TAE contenant également du bromure d'éthidium, à 120 V et 70 mA. La séparation de grands fragments d'ADN (vecteur ou vecteur restreint) se fait sur gel à 1 % tandis qu'un gel à 2 % est utilisé pour la séparation de fragments compris entre 100 bp et 2 kb.

4.6. Criblage PCR

Oligonucléotides (cf. Annexe 4, page 181) :

AB349 : 5'-ATG-CTG-TCT-TTC-GCT-GCT-GAG-3'	à la fin du gène VIII, qui précède le gène III
fdP3S : 5'-TAT-TCG-CAA-TTC-CTT-TAG-TTG-T-3'	dans la partie de gène III qui encode le peptide signal de la pIII
AB348 : 5'-TTC-TGT-ATG-AGG-TTT-TGC-TAA-3'	dans la partie de gène III qui encode la pIII mature

Les réactions de criblage PCR sont effectuées directement sur une colonie bactérienne infectée par le phage à analyser. Le gène de la β-lactamase du phage est amplifié avec 0,4 unités de polymérase Taq (Roche), 0,4 mM d'un mélange des quatre dNTP, 0,4 µM de l'amorce AB349

ou fdP3S, 0,4 μ M de l'amorce AB348, le tout dans 20 μ l de tampon fourni avec la Taq (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM $MgCl_2$, pH 8,3). Les conditions de PCR comprennent un cycle de 10 min. de dénaturation à 94°C, suivi de 30 cycles comportant chacun 1 min. de dénaturation à 94°C, 1 min. d'appariement à 54°C et 1 min. d'élongation à 74°C, pour finir par un cycle de 10 min. d'élongation à 74°C.

Le mélange de PCR est ensuite posé sur gel d'agarose afin d'estimer la taille du fragment obtenu. Pour le phage fd-bla sauvage, le fragment amplifié a une taille de 1.133 bp avec les amorces AB349 et AB348, ou 896 bp avec les amorces fdP3S et AB348. Il peut également être séquencé, après purification par 'clean-up' ou avec le «High Pure PCR Product Purification Kit» (Roche).

4.7. Séquençage

Les amorces utilisées pour le séquençage sont les mêmes que celles ayant servi pour les criblages PCR.

Les séquençages ADN ont été effectués par Bénédicte Purnelle (Unité FYSA, UCL). Les kits utilisés sont le «DYEnamic ET Terminator cycle Sequencing Kit» (Amersham Pharmacia) et le «ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit» (Applied Biosystems). Ils sont basés sur la méthode classique de terminaison de chaîne par didésoxynucléotides [234], avec des terminateurs marqués par des fluorophores afin de permettre la détection automatique. Le séquenceur utilisé est le «ABI PRISM 377 DNA sequencer» (Applied Biosystems).