



HAL
open science

Sélection de fragments d'anticorps dirigés contre les microcystines pour la mise au point de tests d'immunodétection

Rita Maalouf

► **To cite this version:**

Rita Maalouf. Sélection de fragments d'anticorps dirigés contre les microcystines pour la mise au point de tests d'immunodétection. Biotechnologies. Université de Technologie de Compiègne, 2018. Français. NNT : 2018COMP2424 . tel-01890191

HAL Id: tel-01890191

<https://theses.hal.science/tel-01890191>

Submitted on 8 Oct 2018

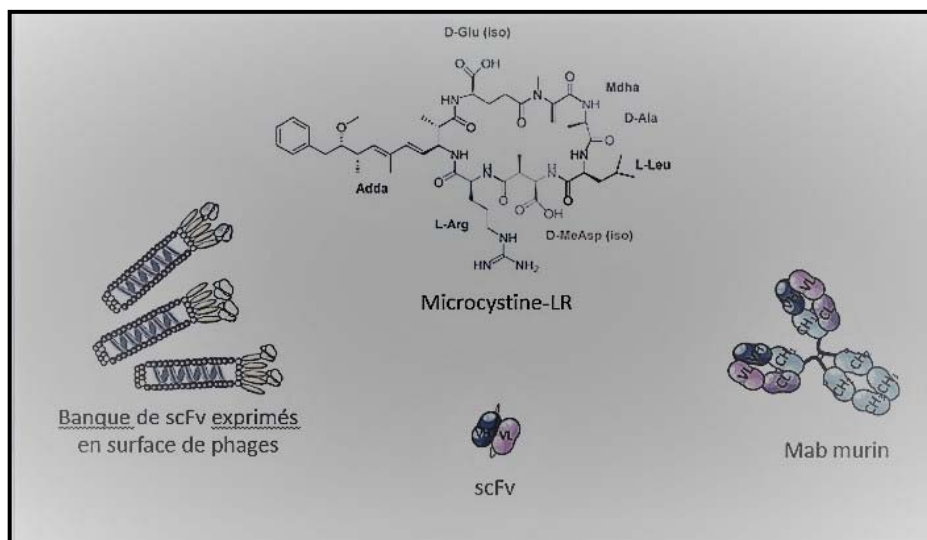
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Par Rita MAALOUF

Sélection de fragments d'anticorps dirigés contre les microcystines pour la mise au point de tests d'immunodétection

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 30 mai 2018

Spécialité : Biotechnologie : Unité de recherche Génie Enzymatique et Cellulaire - GEC (FRE-3580)

D2424



Thèse de Doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne

**Sélection de fragments d'anticorps dirigés
contre les microcystines pour la mise au point
de tests d'immunodétection**

Champ disciplinaire : Biotechnologie

**Thèse présentée par
Rita MAALOUF**

Soutenue le 30 Mai 2018

COMPOSITION DU JURY

Directeurs de thèse :

- Séverine PADIOLLEAU-LEFEVRE (MCU, HDR – UTC)
- Philippe BILLIALD (Professeur, HDR - Université Paris Sud)

Rapporteurs :

- Didier BOQUET (Chercheur, HDR - CEA Saclay)
- Nicolas AUBREY (MCU, HDR - Université de Tours)

Examineurs :

- Alain FRIBOULET (Directeur de Recherches - UTC)
- Catherine QUIBLIER (MCU, HDR – MNHN)

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury Catherine Quiblier et Nicolas Aubrey, d'avoir accepté d'évaluer le présent travail et dont les remarques et commentaires m'ont permis de corriger certaines erreurs et d'améliorer la compréhension de ce mémoire.

Je remercie également Didier Boquet pour l'intérêt porté à ce travail et les échanges enrichissants que nous avons eus au cours de ma thèse.

Je tiens également à remercier Alain Friboulet pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et de m'avoir consacré son temps en examinant le manuscrit.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers Séverine Padiolleau et Philippe Billiald pour m'avoir choisi pour cette thèse.

Merci Philippe pour tes conseils et nos discussions scientifiques. Ta disponibilité et ta capacité à résoudre les problèmes ont quelque chose de fascinant.

Un très grand merci à Séverine, d'avoir dirigé ma thèse avec beaucoup d'efforts et de patience. Ton soutien et ton aide étaient la principale motivation à avancer dans mon travail. Tu m'as toujours inspirée pour aller jusqu'au bout. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris. J'ai eu du bonheur de travailler avec toi.

J'exprime toute ma profonde reconnaissance à Bérangère, ton soutien moral et tes encouragements ont été pour moi d'une grande importance dans le développement de cette recherche. Je te remercie pour tout.

Je remercie toute l'équipe du MNHN, et plus particulièrement Cécile Bernard, Benjamin Marie et Charlotte Duval de m'avoir accueilli plusieurs fois au Muséum et de m'avoir offert leur support et leur aide au cours de cette thèse.

Par ailleurs, je tiens également à adresser mes sincères remerciements à toutes les personnes que j'ai connues et côtoyées dans le cadre de ce projet : Stéphane, Adeline, Melody, Nesrine et Mélissa pour leur soutien mutuel, leurs encouragements, leurs savoirs scientifiques et pour les bons moments qu'on a partagés ensemble.

Un grand merci pour Sophie, ton aide dans mes dernières expérimentations m'a permis de finaliser ma thèse.

Je tiens remercier aussi Nancy, la future docteure, pour son soutien et les échanges amicaux pendant ces trois années.

Sans oublier le plus grand merci à Hassan, avec qui j'ai passé les meilleurs moments au bureau. Je lui exprime ici mes remerciements pour son soutien constant dans les moments les plus difficiles.

Enfin, merci à tous les autres membres de l'UMR 7025 que j'ai côtoyés au cours de ces 3 années, ce fut un réel plaisir de vous avoir rencontrés.

Pour tous mes amis qui m'ont apporté leur soutien moral pendant ces années d'études, j'en remercie sincèrement Mira, Marie, Michelle, Alia, Noujoud, Zaynoun, Bechara et Jean-Baptiste.

J'ai également une pensée pour tous mes proches, famille et ami(e)s Libanais, qui ont fait preuve de beaucoup de patience et m'ont toujours encouragée. J'espère maintenant être plus disponible et leur rendre ce que je leur dois.

Enfin, un très grand MERCI à toute ma famille qui m'a gratifié de son amour et fourni les motivations qui ont permis l'aboutissement de mes études. Je leur adresse toute ma gratitude du fond du cœur.

Enfin, aucun mot ne peut exprimer ma reconnaissance à ma mère, pour les sacrifices qu'elle a faits. Je lui remercie à elle ainsi qu'à ma sœur Jessy et mon frère Michael, pour leurs efforts et leur soutien moral. Je dédie ce travail à vous. Je vous aime !

Abstract

Cyanobacteria are ubiquitous microorganisms that present a worldwide concern to public health authorities because of the toxicity of the cyanotoxins they produce. Some cyanotoxins are hepatotoxins such as microcystins (MCs). At least 200 variants of MCs have been identified till today. In our study, we focus on MC-LR, a monocyclic heptapeptide (cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-erythro- β -methylAsp-L-Arg-ADDA-D-Glu-N-methyldehydro-Ala), since it is the most frequently detected and one of the most toxic.

In our study, we are interested in developing a fast, sensitive and reliable method to detect MCs. The project aims to develop an alternative pollution detection method that would be better suited to field measurements than the physicochemical methods currently available.

The originality of this project lies in the use of two different approaches to select a panel of antibodies suitable for the development of immunodetection tests:

The first one is based on the hybridoma technology for the production of monoclonal antibodies.

The second one is based on phage display technique to select antibody fragments that are specific to MC-LR from a library of approximately 10^9 phages, expressing on the surface scFv fragments (Shahsavarian *et al.*, 2014).

Two monoclonal antibodies were selected using the first approach, and their specificity was evaluated using ELISA technique. Along with three scFvs selected from phage display approach. An additional scFv was added to this list: 3A8, selected from a previous study (McElhiney *et al.*, 2002) and also specific to MC-LR. The scFvs were cloned into an expression vector in order to get each clone in its scFv soluble form. Then, their specificity to MC-LR was evaluated using ELISA technique and Surface plasmon resonance. The results show a potential specificity to MC-LR. Nevertheless, these results are not very reproducible and call into question the refolding protocol used. A thorough work on this protocol optimization would be necessary, in order to find the key parameters that control the loss or gain of their functionality.

Keywords :

Cyanobacteria, Microcystin, Phage display, Single chain fragment variable, ELISA, Surface plasmon resonance.

Résumé

Les cyanobactéries sont des micro-organismes qui préoccupent les autorités de santé publique dans le monde entier, en raison de la toxicité des cyanotoxines qu'elles produisent. Certaines cyanotoxines dont les microcystines (MC) sont des hépatotoxines inhibitrices de protéines phosphatases à sérine/thréonine. Aujourd'hui, plus de 200 variants de MCs ont été identifiés. Il s'agit d'heptapeptides monocycliques synthétisés par voie non-ribosomale dont la MC-LR (cyclo- (D-Ala-L-Leu-D-érythro- β -méthylAsp-L-Arg-ADDA-D-Glu-N-méthyl-hydro-Ala) est le variant le plus étudié en raison de sa fréquence et de sa forte toxicité.

L'objectif de cette étude est le développement d'une méthode d'immunoanalyse rapide, sensible et fiable pour détecter les MCs. Le projet vise donc à développer un outil alternatif de détection de la MC-LR, qui serait mieux adapté aux analyses sur le terrain que les méthodes analytiques, biologiques ou les méthodes d'inhibition d'activité enzymatique actuellement disponibles.

L'originalité de ce projet réside dans l'utilisation de deux approches différentes pour sélectionner de nouveaux anticorps spécifiques de la MC-LR :

La première repose sur l'immunisation d'animaux de laboratoire, la technologie d'hybridation cellulaire et la sélection d'hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux. Si la méthodologie mise en œuvre a effectivement permis d'obtenir des immun-sérums spécifiques, la sélection des hybridomes d'intérêt reste à optimiser.

La seconde stratégie mise en œuvre est basée sur la technologie du phage display pour sélectionner des fragments d'anticorps spécifiques de MC-LR à partir d'une banque de taille d'environ 10^9 phages, exprimant en surface des anticorps sous un format scFv (Shahsavarian *et al.*, 2014). Plusieurs méthodes de criblage ont été développées et trois scFv ont été sélectionnés et étudiés, parallèlement à un quatrième scFv identifié dans une étude précédente (McElhiney *et al.*, 2002), tous spécifiques à la MC-LR. Ces scFv ont été produits sous forme libre, soluble et leur spécificité à la MC-LR a été évaluée par ELISA et résonance plasmonique de surface. Les résultats obtenus montrent que les scFv sélectionnés sont tous capables de reconnaître la MC-LR. Néanmoins, ces résultats sont peu reproductibles et remettent en question le protocole de renaturation utilisé. Un travail de fond sur l'optimisation du protocole de renaturation s'avèrerait nécessaire pour les scFv ici sélectionnés, afin d'identifier les paramètres précis aboutissant à la perte ou au gain de leur fonctionnalité.

Mots clés : Cyanobactéries, Microcystines, Phage display, single chain Fragment variable, ELISA, Résonance Plasmonique de Surface (RPS).

SOMMAIRE

Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction générale.....	17
I- Les cyanobactéries.....	20
I.A- Les cyanotoxines : Structure et toxicité.....	21
I.A-1. Les dermatotoxines.....	21
I.A-2. Les neurotoxines.....	21
I.A-2.a- L'anatoxine-A.....	21
I.A-2.b- L'anatoxine-A (s).....	22
I.A-2.c- Les Saxitoxines.....	22
I.A-3. Les hépatotoxines.....	22
I.A-3.a- Les hépatotoxines alcaloïdiques : la cylindrospermopsine.....	22
I.A-3.b- Les hépatotoxines cycliques : les nodularines et les microcystines.....	23
I.B- Les microcystines.....	24
I.B-1. Structures et propriétés chimiques variables.....	24
I.B-2. Conditions de production.....	25
I.B-3. Mode d'action.....	26
I.C- Les intoxications dues aux microcystines.....	27
I.C-1. Intoxications humaines.....	27
I.C-1.a- Voies de contaminations et effets à court terme chez l'homme.....	27
I.C-1.b- Effets à long terme chez l'homme.....	28
I.C-2. Effets sur les organismes aquatiques.....	28
I.C-3. Effets sur les animaux sauvages et domestiques.....	28
I.D- Les cyanotoxines et les procédures de traitement de l'eau.....	29
I.D-1. Filtration.....	29
I.D-2. Chloration.....	29
I.D-3. La lumière.....	29
I.D-4. Microfiltration membranaires (MF) et ultrafiltration (UF).....	29
I.D-5. Ozonation.....	30
I.D-6. Le charbon actif.....	30
I.E- Méthodes de détection des cyanotoxines.....	30
I.E-1. Méthodes analytiques.....	30
I.E-1.a- Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse.....	30

I.E-1.b- Alternatives	32
I.E-2. Tests <i>in vivo</i>	34
I.E-2.a- Les essais de toxicité sur les souris	34
I.E-2.b- Poissons et amphibiens	35
I.E-2.c- Tests <i>in vivo</i> alternatifs.....	35
I.E-3. Le dosage biochimique : Test d'inhibition de PP1A/PP2A ou PPIA (Protein Phosphatase Inhibition Assay)	35
I.E-3.a- Principe	35
I.E-3.a- Avantages	36
I.E-3.b- Inconvénients	36
I.E-4. Les méthodes immunologiques	37
I.E-4.a- La méthode immuno-enzymatique ELISA	37
I.E-4.b Test sur bandelettes ou Dipstick assay	38
I.E-4.c La Résonance Plasmonique de Surface (SPR)	39
I.E-5. Méthodes alternatives.....	40
I.E-5.a- Les polymères à empreintes moléculaires ou "Molecularly imprinted polymer" (MIP)	40
I.E-5.b- Les aptamères.....	40
I.E-5.c- La PCR quantitative (PCRq)	40
II- Les scFv comme outils de détection.....	45
II.A-Introduction.....	45
II.B- Les anticorps, ou immunoglobulines, principaux acteurs du système immunitaire	45
II.B-1. Structure et caractéristiques	46
II.B-2. Les anticorps monoclonaux	48
II.B-3. Les fragments d'anticorps et le cas du scFv	49
II.C- Le <i>phage display</i> ou présentation de molécules en surface de phages filamenteux	52
II.C-1. Les phages filamenteux	52
II.C-2. Vecteurs phagiques.....	53
II.C-3. L'infection bactérienne	53
II.C-4. Construction de banques de phages d'anticorps	56
II.C-4.a - Principe général	56
II.C-4.b- Cas de la banque utilisée dans le cadre de ce travail	57
II.C-5. Procédure de sélection de scFv spécifiques	58
II.D- Détection de la microcystine LR	59
III- Vers la sélection d'anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR.....	62
III.A- Préparation de la cible	63

III.A-1. Validation de la qualité de la MC-LR	63
III.A-2. Conjugaison de la MC-LR aux protéines porteuses ou <i>carrier proteins</i>	64
III.A-3. Conjugaison de la MC-LR à l'Ovalbumine (OVA)	65
III.A-4. Vérification de la conjugaison.....	65
III.A-4.a- Vérification du couplage par ELISA.....	66
III.A-4.b- Vérification du couplage par SDS-PAGE.....	66
III.A-4.c- Vérification du couplage par Western Blot.....	67
III.A-5. Conjugaison de la MC-LR à la KLH (<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>).....	68
III.A-6. Vérification de la conjugaison.....	68
III.A-6.a- Vérification du couplage par ELISA.....	68
III.A-6.b- Vérification du couplage par Western Blot.....	69
III.B- Préparation d'anticorps monoclonaux par la technologie des hybridomes	70
III.C- Sélection par Phage Display de scFv dirigés contre la MC-LR	71
III.C-1. 1 ^{ère} stratégie de sélection	71
III.C-2. 2 ^{ème} stratégie de sélection	72
III.C-3. Evaluation des enrichissements par Phage-ELISA	75
III.C-4. Détermination des clones reconnaissant la microcistine MC-LR en surface de phages..	76
Vers la caractérisation des fragments d'anticorps sélectionnés contre la MC-LR.....	78
III.D- Séquençages et modélisation structurale.....	79
III.D-1. Résultats de séquençage des clones sélectionnés lors de cette étude.	79
III.D-2. Résultats de séquençage du clone 3A8.....	86
III.D-3. Détermination des sous-groupes de gènes de l'ensemble des scFv.....	88
III.D-4. Alignement des séquences	89
III.E- Clonage et Production des scFv sous forme soluble.....	91
III.E-1. Clonage.....	91
III.E-2. Production des scFv	92
III.E-2.a- Expression par voie cytoplasmique	92
III.E-2.b- Purification	92
III.E-2.c Renaturation des scFv purifiés.....	93
III.F. Caractérisation biochimique et validation de la fonctionnalité.....	95
III.F-3. Confirmation de la capacité de reconnaissance par ELISA sandwich direct	95
III.F-1. Western Blot	97
III.F-2. - Etude des interactions protéiques par SPR.	97
III.F-2.a- Choix du format de capture	97
III.F-2.b- Immobilisation du ligand sur la sensor chip.....	99
III.F-2.c- Notion de régénération.....	100

III.F-2.d- Résultats de SPR sur les anticorps commerciaux et les scFv sélectionnés.....	101
Analyse des anticorps commerciaux AD4G2 et MC10E7	101
Analyse des scFv sélectionnés.....	103
III.F-4. Confirmation de reconnaissance par ELISA compétitif	104
IV- Discussion, Perspectives & Conclusion.....	108
IV.A- Bilan des résultats.....	109
IV.A-1. Sélection d'Anticorps ou de fragments d'Anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR	109
IV.A-1.a- Sélection d'anticorps par la technologie des hybridomes	111
IV.A-1.b- Sélection des fragments d'anticorps sous forme de scFv par la technologie du phage display	111
IV.A-2. Validation de la fonctionnalité des scFv	114
IV.A-3. Modélisation et docking moléculaires	116
IV.B- Perspectives.....	118
IV.C- Conclusion.....	120
Bibliographie	121
Annexes.....	135

Liste des figures

Figure I- 1: A- Distribution des Cyanobacteries à travers le monde.....	20
Figure I- 2: Structure des microcystines et de ses variants.	25
Figure I- 3: Mode d'action des Microcystines..	26
Figure I- 4: Principe des tests ELISA commerciaux utilisés pour la détection de MC.....	38
Figure I- 5: Principe du test sur bandelettes pour la détection de la MC-LR.....	38
Figure I- 6: Principe de la technologie BIAcore®.....	39
Figure II- 1: Structure des immunoglobulines G.....	47
Figure II- 2: Organisation des segments de gènes codant pour les chaînes lourdes et légères.	48
Figure II- 3: Principe de la production des anticorps monoclonaux chez la souris par la technologie des hybridomes.....	49
Figure II- 4: Représentation des différents formats d'anticorps.	50
Figure II- 5: Présentation du bactériophage M13..	53
Figure II- 6: Infection d'une bactérie E.coli par un bactériophage filamenteux (M13) observée par microscopie électronique.....	54
Figure II- 7: Représentation schématique du processus d'infection d'une bactérie E. coli par une particule virale filamenteuse M13.....	55
Figure II- 8: Principe général de construction de la banque de scFv en surface de phages.	56
Figure II- 9: Stratégie des 2 PCR successives effectuées pour l'amplification des V _L et V _H lors de la construction des banques en surface de phages.....	58
Figure II- 10: Principe de sélection par Phage Display.	59
Figure III- 1: Analyse de la qualité de la Microcystine-LR commerciale.....	64
Figure III- 2: Réaction de conjugaison par l'intermédiaire de l'EDC.	65
Figure III- 3: Sites de liaison respectifs sur la MC-LR et l'ovalbumine.	65
Figure III- 4: Test ELISA vérifiant le couplage de la MC-LR à l'ovalbumine.	66
Figure III- 5: Vérification du couplage de la MC à l'OVA par électrophorèse SDS PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie.....	67
Figure III- 6: Analyse par Western Blot du couplage de la MC-LR à l'ovalbumine..	68
Figure III- 7: Représentation d'une sous-unité de KLH et tests de vérification de son couplage à la MC-LR.	69
Figure III- 8: Test ELISA de reconnaissance de l'OVA-MC par les anticorps issus de la technologie des hybridomes.....	70
Figure III- 9: Principe des tours de sélection positive et négative effectués lors de la 1 ^{ère} stratégie de sélection.....	71
Figure III- 10: Enrichissement de la banque en phages porteurs de scFv spécifiques de l'OVA-MC après chaque tour de sélection, en appliquant la 1 ^{ère} stratégie de sélection.	72

Figure III- 11: Principe des tours de sélection positive et négative effectués lors de la 2 ^{ème} stratégie de sélection.....	73
Figure III- 12: Enrichissement de la banque en phages porteurs de scFv spécifiques de la MC après chaque tour de sélection, en appliquant la 2 ^{ème} stratégie de sélection.	74
Figure III- 13: Formats et résultats des phage-ELISA appliqués aux populations phagiques enrichies en cours de sélection.....	75
Figure III- 14: Format du phage ELISA appliqué sur les phages isolés et amplifiés.	77
Figure III- 15: Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOMa.....	81
Figure III- 16: Colliers de perles des domaines variables du clone SOMa.	82
Figure III- 17: Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOKMc3.....	83
Figure III- 18: Colliers de perles des domaines variables du clone SOKMc3.....	84
Figure III- 19: Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOKMc5..	85
Figure III- 20: Colliers de perles des domaines variables du clone SOKMc5.....	86
Figure III- 21: Séquences nucléotidique et protéique du scFv 3A8.....	87
Figure III- 22: Colliers de perles des domaines variables du clone 3A8.....	88
Figure III- 23: Alignement nucléotidique et protéique des 4 séquences de la région variable de la chaîne légère (VL).	89
Figure III- 24: Alignement nucléotidique et protéique des 4 séquences de la région variable de la chaîne lourde (VH).....	90
Figure III- 25: SDS PAGE du bilan de purification du scFv SOKMc5 révélé au bleu de Coomassie.....	93
Figure III- 26: Balayage spectral du scFv 3A8 avant et après centrifugation.	95
Figure III- 27: Évaluation de la reconnaissance de l'OVA-MC par les différents scFv par ELISA sandwich direct.....	96
Figure III- 28 : Résultat du test ELISA de reconnaissance de l'OVA-MC par l'IgG MC10E7	96
Figure III- 29: Format de révélation du Western Blot effectué pour la validation de la fonctionnalité des scFv sélectionnés contre la MC-LR.	97
Figure III- 30: Surface d'une sensor chip CM5.....	98
Figure III- 31: Format de capture choisi.....	99
Figure III- 32: Interaction entre la MC-LR et les anticorps commerciaux AD4G2 (A) et MC10E7 (B).	102
Figure III- 33: Analyse et paramètres d'affinité du 3A8 pour la MC-LR.....	103
Figure III- 34: Principe de l'ELISA compétitif effectué pour la confirmation de la spécificité de reconnaissance de la MC-LR par les scFv.	105
Figure III- 35: Spécificité de la reconnaissance de la MC-LR par les scFv SOMa (A) et SOKMc3 (B) par ELISA compétitif..	106
Figure III- 36: Détection par ELISA compétitif de la MC-LR à partir d'un extrait brut, contenant entre autres de la MC-LR libre, prélevé sur le terrain,.....	107

Figure IV- 1: Modélisation 3D du scFv 3A8.....	116
Figure IV- 2: Modélisation 3D du scFv 3A8 avec superposition avec la MC-LR.....	117
Figure IV- 3: Représentation du docking moléculaire, effectué entre le scFv 3A8 et la MC-LR,.....	117
Figure IV- 4: Représentation du docking moléculaire, effectué entre le scFv 3A8 et la MC-LR,.....	118

Liste des tableaux

Tableau I- 1: Structure et effet toxique des cyanotoxines.....	23
Tableau I- 2: Variants des principales microcystines.....	25
Tableau I- 3: Applications de la spectrométrie de masse pour la détection de microcystines.....	31
Tableau I- 4: Applications alternatives d'HPLC	32
Tableau I- 5: Principales méthodes utilisées pour la détection des MC	42
Tableau II- 1 : Principales caractéristiques et propriétés des différentes classes des immunoglobulines	46
Tableau II- 2: Comparaison entre la technologie des hybridomes et la sélection d'anticorps par phage display.	51
Tableau II- 3 : Anticorps commerciaux contre la microcystine-LR.	60
Tableau II- 4: scFv reconnaissant la MC-LR.	61
Tableau III- 1 : Conditions des procédures des 2 stratégies de sélection.	74
Tableau III- 2: Sous-groupe de gènes exprimés par les scFv inclus dans cette étude et pourcentages d'identité entre les séquences des scFv sélectionnés et les lignées germinales les plus proches.	88
Tableau III- 3: Taux d'identité entre les séquences nucléotidiques et protéiques des scFv étudiés....	90
Tableau III- 4: Taux de mutations au niveau du framework et des CDR pour les 4 scFv.....	91
Tableau III- 5: Protocole de Renaturation suivi pour les scFv sélectionnés.....	94
Tableau III- 6: Bilan de la quantité des scFv récupérée après la purification et après renaturation....	92
Tableau III- 7: Masses moléculaires et points isoélectriques théoriques des 4 scFv calculés grâce à l'outil ProtParam, disponible sur Expasy.	100
Tableau III- 8: Résultats de l'analyse par SPR menée sur les anticorps commerciaux vis-à-vis de la MC-LR, déterminés par le logiciel BIAevaluation en appliquant le modèle « Steady State Affinity ».	102
Tableau III- 9: paramètres obtenus grâce au modèle « Steady State Affinity ».	103
Tableau IV- 1: Caractéristiques des voies d'expression périplasmique et cytoplasmique.....	113
Tableau IV- 2: Caractéristiques de l'AD4G2 et des différents formats de 3A8.....	115

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Ag : Antigène

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP: Adenosine triphosphate

BCA: Bicinchoninic acid

BSA : Bovine serum albumin

CAP : Charbon actif en poudre

CDR: Complementarity Determining Region

CE: Capillary Electrophoresis

CHC : Carcinome hépatocellulaire

Da : Dalton

DL50 : Dose létale médiane

DTX : Dinophysin toxin

EAE : Encéphalomyélite A=auto-immune expérimentale

EDC : 1-Ethyl- 3-(3-Diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride.

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbant Assay

ESI: Electrospray ionisation

Fab: Fragments of antigen-binding

FAB/MS: Fast Atom Bombardment/Mass spectrometry

FR: Frameworks

HPLC: High performance liquid chromatography

HRP: *Horseradish peroxidase*

IC50: Dose inhibitrice médiane

Ig: Immunoglobulines

IMGT: International immunogenetics

IPTG: Isopropyl β -D-1- thiogalactopyranoside

KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin

OVA-MC : Ovalbumine couplée à la microcystine

LC: Liquid Chromatography
LC-CE: Liquid Chromatography-Capillary electrophoresis
LPS : Lipopolysaccharides
MC : Microcystines
MF : Microfiltration membranaire
MIP: Molecularly imprinted polymer
MM: Molecular mass
NGS: *Next Generation Sequencing*
NHS: N-hydroxysuccinimide
Ni-NTA: Nickel-nitriloacetic acid
OATP: Organic anion transporter polypeptide
OMS : Organisation mondiale de la santé
OVA : Ovalbumine
PCRq : Quantitative polymerase chain reaction
PDA: *Photodiode array detector*
PEG: Polyethylene glycol
pI : Point isoélectrique
PP : Phosphatase protein
PPIA: Protein phosphatase inhibition assay
scAb: Single chain antibody
ScFv : Single chain variable fragment
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SM : spectrométrie de masse
SOE-PCR : Single overlap extension polymerase chain reaction
SOKM : Sélection contre l'OVA et la KLH conjuguées à la MC
SOM : Sélection contre l'OVA-MC
SPR : Surface plasmon resonance
ssDNA : single stranded desoxyribonucleic acid
TLC : chromatographie à couche mince
UF : Ultrafiltration
UV : Ultraviolet

Introduction générale

Introduction générale

Les cyanobactéries sont des micro-organismes procaryotes qui, sous l'influence de multiples facteurs environnementaux, prolifèrent dans les milieux aquatiques et produisent des cyanotoxines. Ces toxines peuvent avoir un impact négatif sur les écosystèmes aquatiques, et par leur densité créer un déséquilibre de la chaîne trophique. Chez les animaux supérieurs et les humains, le contact avec des eaux contaminées peut causer des irritations cutanées alors que leur ingestion peut affecter sérieusement les systèmes nerveux, digestif et hépatique.

Les microcystines (MC) sont des cyanotoxines hépatotoxiques, dont il existe au moins 200 variants. Cette étude se focalise sur la MC-LR, un heptapeptide monocyclique (cyclo (D-Ala-L-Leu-D-érythro- β -methylAsp-L-Arg-ADDA-D-Glu-N-méthyldehydro-Ala), en raison non seulement de sa fréquence, mais aussi de sa forte toxicité (Catherine *et al.*, 2017).

L'intoxication humaine la plus grave causée par les MCs à ce jour a été rapportée au Brésil, en 1996. Soixante-seize patients insuffisants rénaux dialysés avec de l'eau contaminée par des MC sont décédés (Jochimsen *et al.*, 1998). La toxicité chronique des MCs pourrait également être importante mais reste mal évaluée. Enfin, les MC ont été suspectées d'induire un risque de cancer du foie accru dans des populations chinoises consommant régulièrement de l'eau contaminée (Svircev *et al.*, 2009). Dans ce contexte, l'OMS préconise une valeur limite de MC-LR dans l'eau de boisson de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Pour ces raisons, il est aujourd'hui nécessaire de développer une méthode de détection des MCs rapide, sensible et fiable. Les analyses actuelles reposent sur des techniques analytiques (HPLC, spectrométrie de masse), biologiques ou enzymatiques. Les premières sont très sensibles mais exigent un personnel hautement qualifié et un matériel coûteux. Les méthodes biologiques qui font appel à des essais sur animaux sont peu reproductibles et critiquables d'un point de vue éthique. Enfin, les tests biochimiques d'inhibition d'activité enzymatique (PP2A) manquent de spécificité, sont sensibles à la présence d'autres inhibiteurs de l'enzyme et ne conduisent pas à une identification précise de la MC incriminée. Dans ce contexte, il convient de concevoir des approches innovantes pour détecter les MCs et évaluer les risques pour la santé humaine ou animale (Salmaso *et al.*, 2017).

Dans ce contexte, les méthodes immunochimiques et l'utilisation d'anticorps pourraient s'avérer mieux adaptées. A ce titre, deux anticorps monoclonaux anti-MC ont été commercialisés. Il s'agit d'anticorps murins : l'AD4G2, capable de reconnaître toutes les MCs sans discrimination, et l'anticorps MC10E7, plus sélectif, qui reconnaît les MCs contenant une arginine en position 4. L'absence de caractérisation fine de ces anticorps, en particulier de leur séquence en acides aminés, est une limitation importante à l'interprétation des analyses et à l'ingénierie de formes mutées aux propriétés améliorées en termes de spécificité et d'affinité améliorées (Bradbury and Pluckthun, 2015).

L'objectif de cette étude était donc de produire de nouveaux anticorps de séquence connue contre la microcystine afin de développer des tests d'immunodétection robustes, sensibles et rapides. Pour cela, nous avons retenu deux approches complémentaires.

La première a consisté à produire des anticorps entiers par la technologie des hybridomes après immunisation des souris par la MC-LR et fusionnement de leurs cellules spléniques avec des cellules myéломateuses.

La seconde vise à sélectionner des fragments d'anticorps spécifiques de la MC-LR par la technologie du phage display. Nous disposons au laboratoire d'une banque de phages présentant en surface des anticorps sous un format scFv. Cette banque, produite lors de travaux précédents, a une taille supérieure à 10^9 entités et sa fonctionnalité a été démontrée (Shahsavarian *et al.*, 2014).

Ce mémoire présente, au chapitre 1, une présentation des cyanobactéries et des cyanotoxines ainsi que les méthodes disponibles pour leur détection. Le second chapitre décrit les technologies utilisées pour la production de nouveaux anticorps contre la MC-LR. Le troisième chapitre aborde une analyse plus fine des propriétés des anticorps ou des fragments d'anticorps sélectionnés à partir de ces deux approches. Enfin, un dernier chapitre permet de discuter l'ensemble des résultats en proposant une perspective aux travaux menés.

I

Les cyanobactéries

- A- Les cyanotoxines : Structure et toxicité
- B- Les microcystines
- C- Les intoxications dues aux microcystines
- D- Les cyanotoxines et les procédures de traitement de l'eau
- E- Méthodes de détection des cyanotoxines

I- Les cyanobactéries

Depuis leur découverte, les cyanobactéries ont fait l'objet de nombreuses recherches (Staley *et al.*, 1989). Apparues il y a environ 2.5-3.5 milliards d'années, ces organismes ont la capacité à synthétiser leur propre matière organique à partir de la lumière et du dioxyde de carbone (photosynthèse). Ce sont des bactéries à Gram négatif possédant une taille variable allant de 1 μm (les picocyanobactéries) à plusieurs mm et pouvant se retrouver sous forme unicellulaire, filamenteuse ou en colonie.

Les cyanobactéries colonisent une très grande diversité d'écosystèmes (Figure I-A) et sont capables de s'adapter à des conditions de survie très extrêmes. Ceci est principalement dû à leur grande capacité d'adaptation.

Comme toutes les bactéries, les cyanobactéries ne possèdent pas d'organite intracellulaire, ni de noyau et sont capables de stocker leurs nutriments dans le cytoplasme (Figure I-B). A titre d'exemple, elles peuvent stocker le phosphore sous forme de granules intracellulaires de polyphosphate lorsque celui-ci se trouve en excès. De plus, certaines cyanobactéries ont la capacité de fixer le diazote atmosphérique (N_2). Enfin, de nombreuses espèces de cyanobactéries possèdent des vésicules à gaz. Ce sont des inclusions cylindriques cytoplasmiques remplies de gaz qui permettent la régulation de la flottaison par ajustement de leur position verticale dans la colonne d'eau. Cette régulation dépend de différents stimuli environnementaux comme les conditions de lumière, le taux de croissance et la température.

Toutes ces propriétés permettent aux cyanobactéries de s'adapter à des environnements aussi bien pauvres que riches en nutriments (Paerl, 2014).

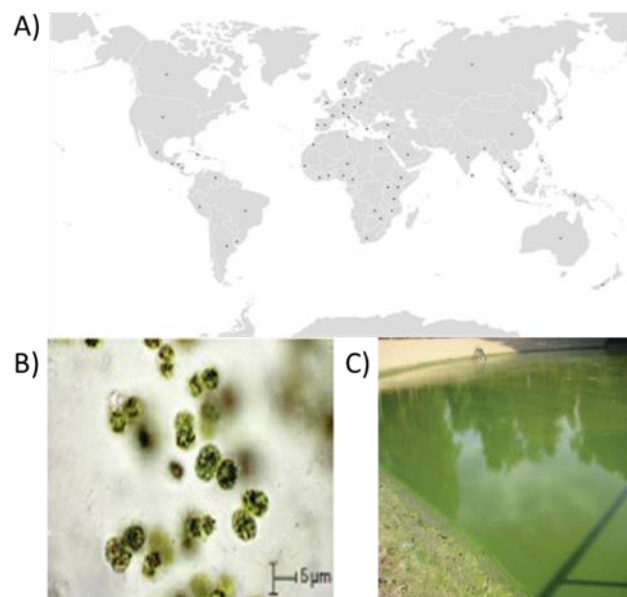


Figure I- 1: A- Distribution des Cyanobacteries à travers le monde (Source ; Buratti *et al.*, 2017). B) *Microcystis*, C. Bernard, MNHN –source : Meriluoto *et al.*, 2017. C) Cyanobactéries produisant des efflorescences ou "fleurs d'eau" de cyanotoxines, B. Marie, MNHN. Source : Meriluoto *et al.*, 2017.

D'un point de vue environnemental, le réchauffement climatique et les activités humaines constituent des facteurs favorables au développement des cyanobactéries. En effet, les activités industrielles, agricoles et domestiques induisent une production excessive de nutriments tels que les nitrates et les phosphates. Ces éléments nutritifs favorisent la prolifération d'algues et de cyanobactéries dans les lacs, les rivières et les plans d'eaux à usages récréatifs (Paerl and Paul, 2012).

Les cyanobactéries peuvent constituer un danger, à la fois pour notre santé et notre environnement. En effet, leur prolifération se manifeste sous forme d'efflorescences ou « fleurs d'eau » (Figure I-C), où certaines espèces se développent de façon massive. Il en résulte une désoxygénation importante du milieu liée à la dégradation par les bactéries et une diminution de la disponibilité en lumière dans le milieu, effet néfaste pour les éventuelles autres espèces de phytoplancton. Ceci entraîne en outre une réduction de la disponibilité du CO₂ et une élévation du pH pouvant mener à la mort d'autres organismes comme les poissons.

En plus de leur effet néfaste sur l'écosystème aquatique, certaines espèces de cyanobactéries synthétisent des toxines, nommées communément les cyanotoxines, qui contaminent l'eau et qui sont responsables des risques sanitaires pour l'homme et les organismes exposés (Havens, 2008).

I.A- Les cyanotoxines : Structure et toxicité

Dans le milieu aquatique, une part importante des cyanotoxines est libérée au cours de la lyse cellulaire. Ces toxines possèdent plusieurs mécanismes de toxicité et ciblent diverses cellules et organes. Elles sont classées en trois catégories, que ce soit selon (i) leur mode d'action, les dermatotoxines, neurotoxines et hépatotoxines n'induisant pas les mêmes mécanismes ou selon (ii) leur structure chimique (peptides cycliques, alcaloïdes et les lipopolysaccharides (LPS)) (Metcalf and Codd 2012). Pour évaluer les risques spécifiques de ces toxines, il est nécessaire de comprendre leurs propriétés chimiques et physiques (Tableau I-1).

I.A-1. Les dermatotoxines

Les cyanobactéries marines benthiques tropicales et subtropicales telles que *Oscillatoria*, *Lyngbya* et *Schizothrix*, produisent des dermatotoxines comme les aplysiatoxines, les debromoaplysiatoxines et les lyngbyatoxines. L'effet toxique principal et commun à ces trois dermatotoxines est la dermatite. De plus, les aplysiatoxines et les debromoaplysiatoxines sont également des promoteurs puissants de tumeurs et des activateurs de la protéine kinase C. Les lyngbyatoxines-A quant à elles causent également une inflammation gastro-intestinale ou buccale (Sivonen and Jones, 1999).

I.A-2. Les neurotoxines

Les neurotoxines sont parmi les cyanotoxines les plus toxiques. Elles sont produites par les genres *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc* et *Oscillatoria*. Les neurotoxines interviennent au niveau du système nerveux central en provoquant plusieurs types de paralysies pouvant entraîner la mort en 2 à 30 minutes (Salmaso *et al.*, 2017). A ce jour, trois familles de neurotoxines ont été identifiées :

I.A-2.a- L'anatoxine-A

Elle a été décrite en 1992 par Edwards et collaborateurs lors d'un empoisonnement fatal de chiens, en Ecosse, après consommation d'*Oscillatoria* benthiques. Ce genre comprend deux toxines alcaloïdes de faible masse moléculaire : l'anatoxine-A (MM= 165 Da), et son homologue, l'homoanatoxine-A (MM = 179 Da), toutes deux produites par *Anabaena flos-aquae* et *Anabaena oscillatoria*.

La structure et l'action de l'anatoxine-A est similaire à celles de l'acétylcholine. A l'état normal, l'acétylcholine est libérée par les neurones et se lie à son récepteur au niveau des cellules musculaires. Cette liaison déclenche l'ouverture de canaux ioniques et l'activation des cellules musculaires. L'acétylcholine est alors dégradée par l'acétylcholinestérase, les canaux ioniques se ferment puis les muscles se reposent. L'anatoxine-A provoque le même effet que l'acétylcholine mais après s'être liée au récepteur, elle n'est pas dégradée par l'acétylcholinestérase. De ce fait, les cellules musculaires restent

toujours stimulées jusqu'à épuisement, puis cessent de fonctionner, justifiant une paralysie des muscles respiratoires, une suffocation, et enfin le décès de l'individu (Mankiewicz *et al.*, 2003).

I.A-2.b- L'anatoxine-A (s)

Elle a été décrite par Mahmood et Carmichael en 1987, après avoir causé la mort de bétails en Amérique du Nord. De structure différente de celle de l'anatoxine-A, son nom en est proche car l'une comme l'autre possèdent des symptômes d'empoisonnement similaires telles qu'une salivation et une lacrymation excessives, une perte de la coordination fine des mouvements (ataxie) et enfin une diarrhée. L'anatoxine-A(s) agit comme un ligand dirigé contre la cholinestérase en se liant à cette enzyme. Ceci entraîne la phosphorylation de l'enzyme qui ne peut plus dégrader l'acétylcholine. Il en résulte alors une stimulation continue des cellules musculaires comme dans le cas de l'anatoxine-A. Enfin, sa masse moléculaire est de 252 Da et sa DL₅₀ est de 20 µg.kg⁻¹ (dosée par injection intrapéritonéale chez la souris) (Carmichael and Falconer, 1993).

I.A-2.c- La Saxitoxine

Elle a été identifiée la première fois en 1982 par Ikawa et collaborateurs, puis signalée en Australie en 1994, à la suite d'une prolifération massive d'*Anabaena* sous forme d'efflorescences sur plus de 1000 km le long de la rivière Darling en 1990/91. Cette floraison a causé la mort de bovins et d'ovins. Cette famille rassemble deux cyanotoxines : les saxitoxines et les néosaxitoxines. Ces deux dernières sont responsables d'intoxications alimentaires après consommation de fruits de mer. Les symptômes de toxicité ne ressemblaient ni à l'anatoxine-A, ni à l'anatoxine-A (s). En effet cette famille agit en bloquant les canaux sodiques et donc la dépolarisation axonale. Il en résulte une inhibition de la transmission des impulsions nerveuses et la mort par arrêt respiratoire chez l'animal (Chevalier *et al.*, 2001).

I.A-3. Les hépatotoxines

Les hépatotoxines représentent la catégorie la plus couramment étudiée des cyanotoxines. Dans cette catégorie on distingue :

- Les toxines alcaloïdes et principalement la cylindrospermopsine,
- Les toxines peptidiques cycliques décrites comme étant produites par les genres *Microcystis* et *Nodularia*. Les toxines peptidiques cycliques regroupent les heptapeptides, nommés microcystines, et les pentapeptides, nommés nodularines. Leurs noms dérivent en effet du genre bactérien à partir duquel elles ont été isolées : *Microcystis* pour les microcystines, *Nodularia* pour les nodularines (Salmaso *et al.*, 2017).

I.A-3.a- Les hépatotoxines alcaloïdiques : la cylindrospermopsine

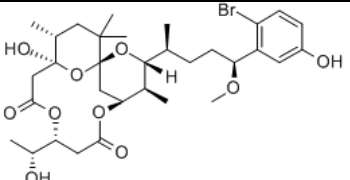
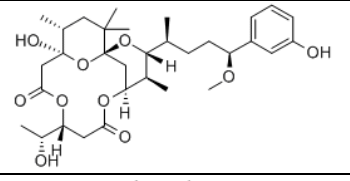
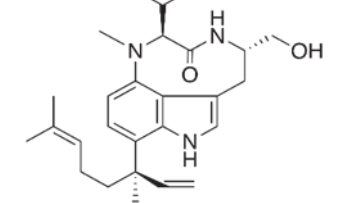
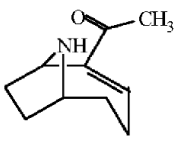
La cylindrospermopsine est un alcaloïde tricyclique possédant une unité guanidine. Sa masse moléculaire est de 415 Da. Elle a été isolée et caractérisée à partir des genres *Cylindrospermopsis raciborskii* en Australie et *Umezaka natans* au Japon. Elle est observée le plus souvent dans les zones subtropicales et tropicales (Sivonen and Jones, 1999). La cylindrospermopsine est une cytotoxine qui inhibe la synthèse protéique. Les premiers symptômes cliniques d'intoxication se manifestent sous forme d'une insuffisance rénale et hépatique. Par voie orale, la cylindrospermopsine attaque les cellules dans lesquelles elle pénètre et cause des lésions au niveau de l'intestin, du foie, des reins et des vaisseaux sanguins conduisant, respectivement, à une gastro-entérite, une hépatite, un dysfonctionnement rénal et à une hémorragie hépatique (Carmichael *et al.*, 2001).

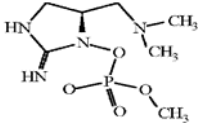
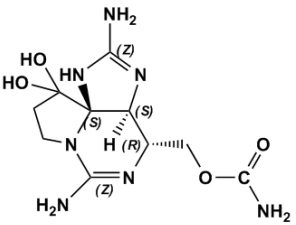
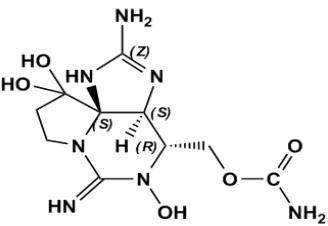
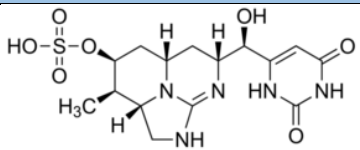
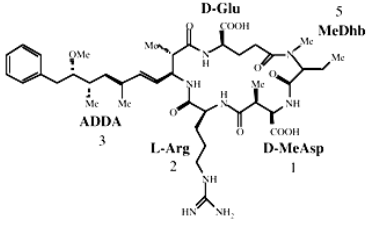
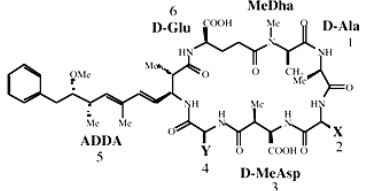
1.A-3.b- Les hépatotoxines cycliques : les nodularines et les microcystines

La première structure chimique des cyanotoxines cycliques a été identifiée en 1980. Il s'agit de l'heptapeptide cyclique Cyclo- (D-alanine¹-X²-D-MeAsp³-Y⁴-ADDA⁵-D-glutamate⁶-Mdha⁷) formé de 7 acides aminés (structure détaillée dans le chapitre suivant I.B-1). Dans cette formule, X et Y sont des acides aminés variables, D-MeAsp³ représente l'acide D-érythro-β-méthylaspartique et Mdha⁷ correspond à la N-méthyl-déhydroalanine. Plus tard, une deuxième hépatotoxine a été identifiée. Cette dernière possède le même mode d'action mais sa structure chimique est composée de 5 acides aminés au lieu de 7. Ce pentapeptide fut nommé Nodularine puisqu'il est produit par *Nodularia spumigena*. La structure chimique de la nodularine est le cyclo- (D-MeAsp¹- L-arginine²-ADDA³-D-glutamate⁴-Mdhb⁵), dans lequel Mdhb est l'acide 2- (méthylamino) -2- déshydrobutyrique.

Les nodularines et les microcystines possèdent un motif hydrophobe en commun qui est l'ADDA (2S, 3S, 8S, 9S-3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-Acide 10-phényl-déca-4,6-diénoïque). L'ADDA est indispensable à leur activité biologique, et une modification de ce motif réduit leur toxicité. Comme les autres cyanotoxines, les hépatotoxines peuvent être absorbées par voie orale, par inhalation ou par voie cutanée. Leurs effets dépendent en grande partie de deux facteurs : la voie d'adsorption et la perméabilité des cellules exposées à la toxine (Mankiewicz *et al.*, 2003).

Tableau I- 1: Structure et effet toxique des cyanotoxines.

Toxines	Structure	Organes cibles	Effet toxique
Dermatotoxines			
Aplysiatoxines		La peau	Promoteurs puissants de tumeurs et des activateurs de la protéine kinase C
Debromoaplysiatoxines		La peau	
Lyngbyatoxines			Inflammation gastro-intestinale ou buccale
Neurotoxines		Système neuromusculaire	Paralysie du muscle squelettique et respiratoire
Anatoxine-A		Synapse du nerf	Blocage de la dépolarisation post-synaptique

Anatoxine-A (s)		Synapse du nerf	Blocage de l'acétylcholinestérase
Saxitoxine		Axones nerveux	Blocage des canaux de sodium
Néosaxitoxine		Axones nerveux	
Hépatotoxines		Foie	Nécrose des hépatocytes et hémorragie
Cylindrospermopsine		Foie, reins, intestin	Inhibition de la synthèse protéique
Nodularine		Foie	Inhibition de l'activité des protéines phosphatases et hémorragie du foie
Microcystines			

Inspiré de Mankiewicz et al., 2003.

ADDA : 2*S*, 3*S*, 8*S*, 9*S*-3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-Acide 10-phényl-déca-4,6-diénoïque, D-MeAsp : acide D-érythro- β -méthylaspartique, Mdha : N-méthyl-déhydroalanine, Mdhb : acide 2- (méthylamino) -2- déshydrobutyrique. X et Y correspondent à des acides aminés variables.

I.B- Les microcystines

I.B-1. Structures et propriétés chimiques variables

Les microcystines (MC) sont des heptapeptides cycliques et leur masse moléculaire varie de 500 à 4000 Da.

Les microcystines contiennent sept acides aminés organisés sous forme cyclique (figure I-2). La structure générale est : cyclo- (D-alanine-X-D-MeAsp-Y-ADDA-D-glutamate-Mdha). Comme évoqué préalablement, X et Y sont des L-acides aminés variables, D-MeAsp est l'acide D-érythro-b-méthylaspartique, et Mdha est la N-méthyl-déhydroalanine.

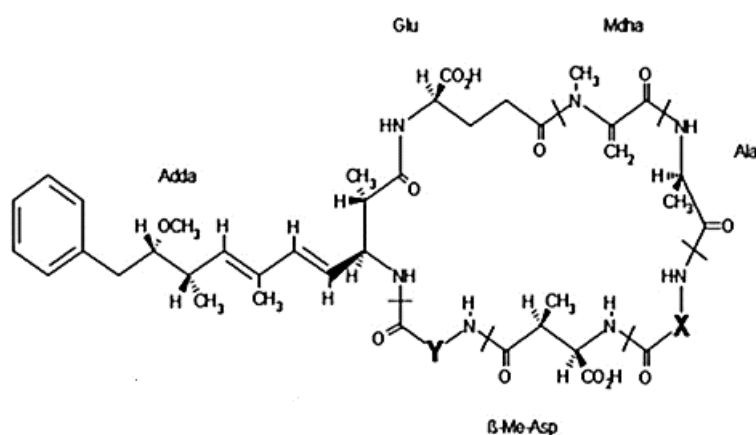


Figure I- 2: Structure des microcystines et de ses variants. Source : Singh *et al.*, 2012.

La première microcystine identifiée historiquement est en fait responsable de la majorité des cas d'empoisonnement (Catherine *et al.*, 2017). Il s'agit de la microcystine-LR (MC-LR). Cette dernière possède une leucine en position X et une arginine en position Y (Figure I-2). A ce jour, 200 variants ont été identifiés (Carmichael *et al.*, 2001) (Tableau I-2).

Tableau I- 2: Variants des principales microcystines.

Microcystines	X	Y	Poids moléculaire (Da)
LA	Leucine (L)	Alanine (A)	910.06
YR	Tyrosine (Y)	Arginine (R)	1045.19
RR	Arginine (R)	Arginine (R)	1038.20
LR	Leucine (L)	Arginine (R)	995.17
AR	Alanine (A)	Arginine (R)	952.40
VF	Valine (V)	Phénylalanine (F)	971.50
LY	Leucine (L)	Tyrosine (Y)	1001.50
LW	Leucine (L)	Tryptophane (W)	1024.50
LF	Leucine (L)	Phénylalanine (F)	985.50

Source : Bateman *et al.*, 1995.

La plupart des MCs contiennent de l'acide b-méthylaspartique, de l'acide glutamique, de l'alanine et de la méthylamine. Cette dernière est attachée à l'acide glutamique. Il est à noter que dans certaines MCs, la Mdha est remplacée par la L-Sérine et la D-Ala par la D-sérine. Certains variants non toxiques ont été identifiés, tel que le composé contenant le 6Zstereoisomère d'ADDA (Van Appeldoorn *et al.*, 2007).

Les microcystines sont solubles dans l'eau, le méthanol et l'éthanol. Elles sont stables dans l'extrait brut pendant moins d'une semaine. Pour une période plus longue, elles doivent être filtrées ou gardées dans de l'eau désionisée. Elles résistent à l'hydrolyse chimique ou à l'oxydation à un pH proche de 7. Les microcystines sont résistantes à plusieurs heures d'ébullition et aux pH extrêmes (Hitzfeld *et al.*, 2000).

I.B-2. Conditions de production

Les microcystines sont produites principalement par les cyanobactéries vivant dans les eaux douces. Le taux de production des microcystines varie non seulement d'une espèce à une autre, mais aussi au sein

de la même espèce, selon que cette dernière se trouve dans des conditions favorables de survie ou non. De plus, des facteurs environnementaux entrent en jeu, tels que l'intensité lumineuse, les variations de température et de pH, et la concentration en phosphore et en azote (Mur *et al.*, 1999).

I.B-3. Mode d'action

La plupart des variants de microcystines sont hydrophiles. Ils ont donc besoin d'un transporteur membranaire dépendant de l'ATP pour pouvoir pénétrer dans les cellules. Un transporteur d'anion organique, appartenant à la famille des OATP (Organic Anion Transporter Polypeptide) a été identifié comme support des microcystines en 2005 par Fischer et collaborateurs. Par conséquent, la toxicité des microcystines est limitée aux cellules exprimant ce transporteur d'anions organique tels que les hépatocytes (Menezes *et al.*, 2013).

Chez les mammifères, après ingestion par voie orale, les MCs gagnent la circulation sanguine après absorption par les cellules tapissant l'iléon de l'intestin grêle. Ensuite, elles s'accumulent dans les hépatocytes grâce au système de transport actif de l'acide biliaire présent sur la membrane de ce type cellulaire. Il est à noter que les microcystines les plus hydrophobes peuvent traverser les membranes par d'autres mécanismes comme la diffusion (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

Une fois dans les hépatocytes, les MCs agissent comme inhibiteurs puissants des protéines phosphatases serine/thréonine 1 et 2A (PP1 et PP2A). L'inhibition de PP1 et PP2A conduit à une hyperphosphorylation des protéines cytosquelettiques, entraînant une déformation des hépatocytes (Figure I-3). Une hépatomégalie survient en raison d'une hémorragie massive centralisée, qui est précédée d'un arrondissement des hépatocytes et d'une vaste dissociation et perturbation de l'épithélium sinusoidal.

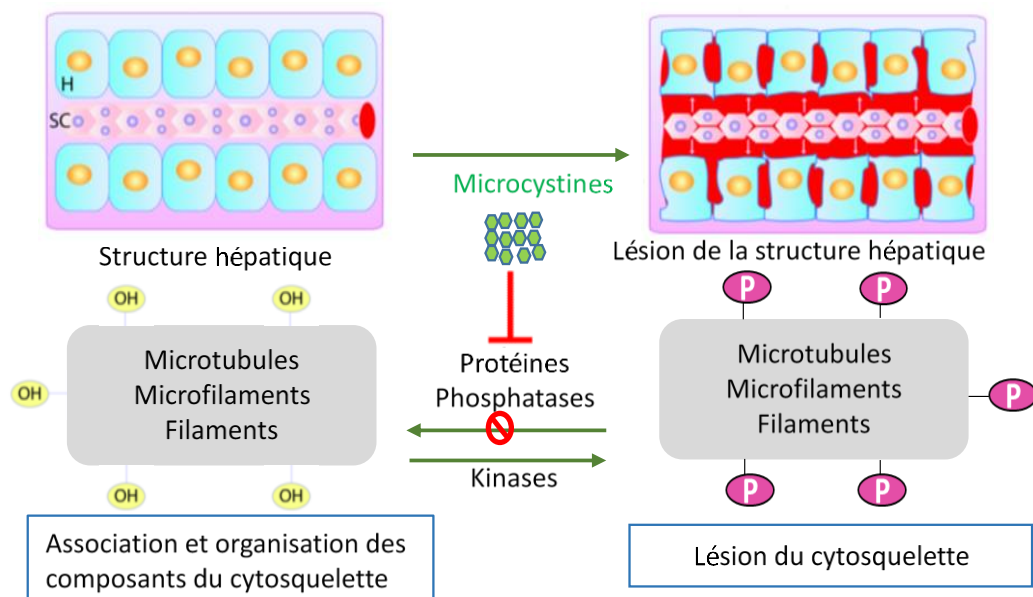


Figure I-3: Mode d'action des Microcystines. H – hépatocyte ; SC – Capillaire sinusoidal ; MC – microcystines ; OH – groupement hydroxyle ; P – groupement phosphate. Inspiré de Menezes *et al.*, 2013.

Certains produits chimiques ont été utilisés expérimentalement pour prévenir l'hépatotoxicité de la microcystine chez les animaux de laboratoire.

Il s'agit notamment de la cyclosporine A, la rifampicine et la silymarine. Ces antagonistes sont plus efficaces lorsqu'ils sont administrés de manière préventive ou en association avec la toxine (Rao *et al.*, 2002).

Les inhibiteurs d'enzymes PP sont considérés comme étant également des promoteurs de type ester non phosphoriques de tumeurs. Les PP jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. L'inhibition de ces PP entraîne la perte de l'équilibre et l'augmentation de la phosphorylation des protéines cibles telles que les protéines suppresseurs de tumeur. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle majeure qui peut entraîner une activation excessive de la prolifération et de la transformation des cellules, et par la suite contribuer à l'apparition de tumeurs. L'inhibition de PP2A par les MCs peut être réversible, *in vitro*, en présence d'un anticorps polyclonal contre les MCs, comme l'ont montré Lin et Chu dans leur étude effectuée en 1994 (Lin and Chu, 1994). De tels anticorps peuvent protéger également *in vivo* contre la toxicité des MCs, lorsqu'ils sont administrés avant que les MCs atteignent leur organe cible. Ces observations proviennent de l'équipe d'Ueno au Japon qui a co-administré par voie intrapéritonéale à la souris la MC-LR et l'anticorps (Nagata *et al.*, 1995).

I.C- Les intoxications dues aux microcystines

I.C-1. Intoxications humaines

L'homme est exposé aux cyanobactéries et à leurs toxines par consommation de l'eau potable, les activités récréatives ou l'ingestion de comprimés de cyanobactéries à usage alimentaire issus de cultures en masse parfois réalisées à ciel ouvert.

I.C-1.a- Voies de contaminations et effets à court terme chez l'homme

Les deux intoxications les plus graves causées par les cyanobactéries ont eu lieu au Brésil. La première s'est déroulée en 1996. Une épidémie hépatique aiguë au sein d'un centre d'hémodialyse à Caruaru a touché 116 patients sur 131, souffrant de troubles visuels, de nausées et de vomissements suite à une hémodialyse avec de l'eau contaminée. Par la suite, 100 patients ont développé une insuffisance hépatique aiguë, dont 76 sont décédés. Dans ce cas en particulier, les patients ont été exposés par voie intraveineuse aux microcystines, en particulier aux MC-YR, -LR et -AR, à une concentration approximativement égale à 19,5 µg de microcystine par litre de sang (Azevedo *et al.*, 2002). La seconde intoxication est la conséquence d'une prolifération importante d'*Anabaena* et de *Microcystis* au barrage d'Itaparica dans l'état de Bahia. Elle a été responsable de 2000 cas de gastro-entérite provoquant 88 décès, principalement des enfants (Rao *et al.*, 2002).

- Quelques autres cas : ingestion, inhalation ou contact cutané

Une étude épidémiologique impliquant 852 participants, a été effectuée sur les effets toxiques des cyanobactéries après contact avec de l'eau contaminée à usage récréatif. Les résultats ont montré de possibles diarrhées, vomissements, symptômes de rhumes, éruptions cutanées, ulcères de la bouche, fièvres ou encore irritations des yeux ou des oreilles pendant 7 jours après l'exposition. Les symptômes sont considérablement augmentés avec la durée du contact avec l'eau et la densité cellulaire de cyanobactéries. Ces différents effets peuvent être une conséquence aussi bien d'ingestions que d'inhalations ou encore de contacts cutané (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

L'homme peut également être exposé par voie orale à travers l'ingestion de comprimés de cyanobactéries. Ces produits sont potentiellement dangereux s'ils contiennent une des espèces toxiques ou des souches de cyanobactéries (Gilroy *et al.*, 2000).

Enfin, notons également qu'une exposition cutanée ou des muqueuses à des eaux à usages récréatifs peut également être à l'origine d'empoisonnement. Les principaux symptômes sont alors des réactions de type allergique comme la dermatite, l'asthme, le rhume des foies et la conjonctivite (Rao *et al.*, 2002).

L'ensemble des effets listés ci-dessus sont des conséquences immédiates d'une exposition ponctuelle aux microcystines. Mais une exposition plus longue peut avoir de graves effets sur le long terme.

I.C-1.b- Effets à long terme chez l'homme

En Chine, des études ont montré que les toxines cyanobactériennes font partie des facteurs de risque dans le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). L'incidence de cette maladie en Chine est l'une des plus élevées au monde, or les cyanobactéries sont abondantes dans les eaux de surface au sud-est de la Chine (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

I.C-2. Effets sur les organismes aquatiques

Pour étudier l'effet toxique des MC-LR sur les plantes aquatiques, des macrophytes appelées *Ceratophyllum demersum* ont été exposés pendant 6 semaines à des concentrations comprises entre 0,1 et 5,0 µg/L de MC-LR. Les résultats ont montré une réduction significative de croissance entre la 3^{ème} et la 6^{ème} semaine. Cela est dû à l'inhibition de la production d'oxygène lors de la photosynthèse, et aux changements dans la pigmentation (par exemple le changement de la concentration en chlorophylle). Des symptômes similaires ont été observés chez d'autres macrophytes et algues comme l'*Elodea Canadensis*, la *Cladophora*, le *Myriophyllum spicatum* et la *Phragmites australis* (Pflugmacher *et al.*, 2002).

Chez les poissons, les microcystines causent des lésions hépatocytaires chez la carpe (*Cyprinus carpio*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). La truite arc-en-ciel à laquelle on injecte de la MC-LR a montré un changement de couleur du vert argenté au noir foncé et une ataxie (perte de la coordination de mouvements). Enfin, à une concentration égale à 1000 µg.kg⁻¹, une insuffisance hépatique générale due à une nécrose hépatocytaire cause leur mort. De plus, des études ont montré que la MC-LR inhibe la réaction de la pompe Na⁺-K⁺ de la branchie de la carpe. Cette inhibition pourrait bloquer la fonction des branchies et donc perturber l'homéostasie ionique du milieu interne. À son tour, la déficience de l'activité branchiale peut entraîner la mort du poisson (Duy *et al.*, 2000).

I.C-3. Effets sur les animaux sauvages et domestiques

Les MCs sont responsables de plusieurs cas d'empoisonnement chez les animaux sauvages et domestiques, en particulier la mort de bétail, d'oies, de moutons, de cochons, de chevaux, de chiens, de chats, d'écureuils, de volailles et d'oiseaux. Chez ces animaux, des symptômes d'hépatotoxicité ont été observés comme la faiblesse, l'anorexie, la pâleur des extrémités et le trouble mental. La mort se produit après quelques heures à quelques jours post-exposition et est souvent précédée par un coma, des tremblements musculaires et une détresse générale. Le décès est la conséquence d'une hémorragie intrahépatique et d'un choc hypovolémique (Duy *et al.*, 2000).

A titre d'exemple, au cours des années 1990, les mortalités massives épisodiques de flamants nains (*Phoeniconaias minor*) se sont produites au Kenya. L'analyse du foie des carcasses des flamants a montré la présence de deux microcystines : MC-LR, MC-RR et de l'anatoxine-A. Les niveaux de MC-LR totalement extraites des foies des oiseaux variaient de 0,21 à 0,93 µg.g⁻¹. Ces concentrations de toxines peuvent être suffisantes pour avoir causé la mort des oiseaux.

Plus tard, en 2001, la mortalité massive des flamants dans le sud-ouest de l'Espagne a concerné aussi bien des oiseaux sauvages que captifs. Au moins 579 de 943 des poussins de flamants (*Phoenicopterus ruber*) sont morts, avec une population mixte d'autres oiseaux aquatiques au parc national de Lagune. Les microcystines ont été identifiées comme la cause probable de leur mort, au regard de la présence

dans l'eau de cyanobactéries produisant des MC, et de l'examen post-mortem des foies de ces volatiles (Codd *et al.*, 2003).

I.D- Les cyanotoxines et les procédures de traitement de l'eau

Les cyanotoxines sont produites par les cyanobactéries et donc l'élimination des toxines implique des mesures pour éradiquer les cellules cyanobactériennes. Les cyanotoxines sont solubles dans l'eau, aussi les mesures d'assainissement impliquent-elles des produits chimiques pour (i) réduire la toxicité ou (ii) détruire complètement les microcystines.

La coagulation ou la floculation induisent la précipitation de petites particules en des particules plus grandes en présence de produits chimiques tels que le chlorure de fer ou le sulfate d'aluminium. Cette caractéristique peut donc être exploitée pour le traitement de l'eau. L'efficacité de cette technique dépend d'une optimisation des paramètres chimiques. Néanmoins, celle-ci peut causer des problèmes supplémentaires tel que la lyse des cellules cyanobactériennes et la libération de toxines (Mouchet *et al.*, 1998).

I.D-1. Filtration

Cette technique peut être soit rapide soit lente. La filtration rapide est la méthode habituellement utilisée après la coagulation pour enlever les particules qui ont coagulé, mais elle n'élimine pas efficacement les cellules cyanobactériennes (Lepisto *et al.*, 1994).

Le traitement conventionnel de l'eau nécessite un lavage régulier des filtres, faute de quoi la lyse des cellules cyanobactériennes sur les filtres peut conduire à la libération de toxines (Hoger *et al.*, 1999).

Enfin, la filtration lente, qui consiste à faire passer l'eau à traiter à travers un lit de sable, ne suffit pas à elle seule à réduire la quantité de toxines (Hitzfeld *et al.*, 2000).

I.D-2. Chloration

L'efficacité de la chloration dépend en grande partie des composés chlorés utilisés et de leur concentration. Le chlore aqueux et l'hypochlorite de calcium à 1 mg/L sont capables d'éliminer plus de 95% des microcystines (Hitzfeld *et al.*, 2000).

I.D-3. La lumière

Les microcystines sont très stables sous la lumière naturelle, alors qu'un traitement à la lumière dans l'ultraviolet (UV) à une longueur d'onde proche du pic d'absorption des MC-LR et MC-RR, peut rapidement les décomposer (Tsuji *et al.*, 1995). Un processus photocatalytique utilisant un catalyseur TiO₂ et un rayonnement UV peut également décomposer les variants MC-LR, -YR et -YA en une dizaine de minutes (Shephard *et al.*, 1998).

I.D-4. Microfiltration membranaires (MF) et ultrafiltration (UF)

Une étude a montré que l'UF et la MF peuvent être très efficaces (> 98%) dans l'élimination des cellules entières de *M. aeruginosa* toxiques.

Ceci est attendu d'une membrane dont la taille des pores correspond à une très faible masse moléculaire comme celle utilisée pour la nanofiltration (Chow *et al.*, 1997).

I.D-5. Ozonation

En Europe et en Amérique du Nord, l'ozonation est utilisée principalement à des fins de désinfection ou d'élimination de couleur et / ou de l'odeur. L'ozone a été initialement utilisé au début des traitements de l'eau principalement pour inactiver les virus et les bactéries. Au cours de ces dernières années cependant, beaucoup d'usines de traitement des eaux ont inclus un double traitement d'ozonation.

Au niveau de l'eau, deux voies d'oxydation des polluants organiques par ozone ont été décrites, à savoir soit l'attaque directe par des molécules d'ozone, soit l'attaque indirecte par les radicaux libres (principalement OH) formés par la décomposition de l'ozone.

En effet, l'ozonation, est la technique la plus utilisée pour éliminer des microcystines. Rositano et collaborateurs ont montré que l'élimination des microcystines est proportionnelle à la concentration d'ozone lorsque celle-ci est supérieure à celle des MC (Rositano *et al.*, 1994).

I.D-6. Le charbon actif

Le traitement de l'eau avec le charbon actif, en combinaison avec l'ozonation, est le plus recommandé. En effet, le charbon actif est capable d'absorber la MC-LR grâce à ses mésopores (pores de diamètre d'environ 2 à 50 nm). Cependant, l'efficacité du traitement dépend de la dose utilisée. En effet, Drikas, en 1994, a constaté qu'un traitement avec 25 mg/L de charbon actif en poudre (CAP) à base de bois, avec un temps de contact de 30 minutes, pouvait réduire la concentration de MC-LR de 50 à moins de 1 µg/L (dose recommandée par l'OMS) (Drikas, 1994).

Enfin, une étude récente effectuée par Jeong et collaborateurs et publiée en Mai 2017, a montré que 60 min de pré-oxydation par le KMnO_4 (1 mg/L), suivie de l'addition de charbon actif (5-20 mg/L) et d'un coagulant, était l'approche la plus efficace (Jeong *et al.*, 2017).

I.E- Méthodes de détection des cyanotoxines

En raison de l'augmentation des cas d'intoxication par les cyanotoxines, il est nécessaire de développer et d'utiliser des méthodes sensibles et fiables capables de détecter les différents types de ces toxines. La sensibilisation aux dangers présentés par les toxines cyanobactériennes, a conduit à la mise au point d'un certain nombre de méthodes pour leur détection et leur quantification, allant des méthodes de criblage basées sur les tests *in vivo* à des techniques analytiques plus sophistiquées. Néanmoins, ces méthodes devraient être en mesure de détecter des concentrations de toxines inférieures à la valeur seuil établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour la qualité de l'eau potable qui est de 1 µg.L⁻¹ de MC-LR (Kaushik and Balasubramanian, 2012).

I.E-1. Méthodes analytiques

I.E-1.a- Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse

La chromatographie est une technique avancée couramment utilisée pour la purification de composés à partir de mélanges complexes. Gregson et Lohr ont été parmi les premiers à utiliser l'HPLC pour la purification des microcystines en 1982 (Gregson and Lohr, 1982).

La séparation par HPLC dépend principalement de plusieurs paramètres tels que la polarité, le débit, et le pH de la phase mobile, le type et la nature de la phase stationnaire, la composition et la nature de l'échantillon et enfin des facteurs environnementaux comme la température et le type de détecteur (Vander Heyden *et al.*, 2001).

Tableau I- 3: Applications de la spectrométrie de masse pour la détection de microcystines

	MC testées	Concentration mesurée	Principe	Avantages	Inconvénients
FAB/MS Oudra <i>et al.</i> , 2001	MC-LR, MC-RR, MC-YR	0.7-8.8µg/mg d'échantillon lyophilisé	Consiste à bombarder l'échantillon par un faisceau d'ions primaires ou d'atomes rapides qui éjecte les ions et les molécules de la solution	<ul style="list-style-type: none"> - Peu de fragmentation observée - Identifie les différents variants de MC - Taille de l'échantillon 300 - 6000 Da - Sensibilité : 10^{-12} Moles 	<ul style="list-style-type: none"> - Bruit de fond élevé - Equipement coûteux - Personnel hautement qualifié
ESI Trifirò <i>et al.</i> , 2016	MC LR, LY, LA, YR, RR, LF et LW	0.007 - 0.18 ng/mL	Consiste à pulvériser une solution, à ioniser les composants qui y sont présents et à en assurer l'évaporation, ceci en appliquant, à une pression atmosphérique, un champ électrique sur le liquide traversant le nébuliseur	<ul style="list-style-type: none"> - Identifie les différents variants de MC - Idéal pour l'analyse d'un échantillon inconnu - Offre les formules, les compositions élémentaires et prédit avec précision la séquence d'acides aminés. - Taille des molécules <200 000 Da - Sensibilité 10^{-14} moles 	<ul style="list-style-type: none"> - Décomposition possible par désorption thermique avant évaporation - Difficulté de reproduire les mêmes résultats et les mêmes paramètres expérimentaux
MALDI Welker <i>et al.</i> , 2002	MC LR, YR et RR	1 µg/L	L'analyte est dissous dans une solution contenant un excès d'une matrice formée d'un chromophore qui absorbe à la longueur d'onde laser. L'échantillon est séché et une petite quantité de cette « solution solide » est placée sur la cible laser. La matrice absorbe l'énergie de la pulsation laser et entraîne le chauffage rapide des cristaux, provoquant la vaporisation et l'ionisation de l'analyte.	<ul style="list-style-type: none"> - Données de grande précision - Identification des différents variants de MC - Possibilité de la réutilisation de l'analyte - Absence de contamination - Taille des molécules : <500 000 Da - Sensibilité : 10^{-15}-10^{-18} moles 	<ul style="list-style-type: none"> - Exige des paramètres de calibration et de conditions expérimentales différents selon la taille de l'analyte
PDA Xie and Park, 2007	MC-LR et RR	3.10 - 11.4 µg/g d'échantillon lyophilisé	Un PDA détecte l'absorption de la lumière dans la marge de longueur d'onde allant du rayonnement ultraviolet jusqu'à la lumière visible.	<ul style="list-style-type: none"> - Non destructive de l'échantillon - Mesure simultanée de plusieurs longueurs d'onde - Mesure des spectres à des intervalles de moins d'une seconde lors de la séparation par HPLC - Sensibilité $0,3 \cdot 10^{-9}$ moles 	<ul style="list-style-type: none"> - Le solvant doit être transparent - Un écart mineur dans le temps de rétention peut rendre difficile l'identification des composants.

D'une manière générale, les phases mobiles acides sont capables d'éluer plus de microcystines et de nodularines que les phases mobiles à pH neutre. En effet, le pH acide de la phase mobile protone les groupes carboxylés des microcystines et des nodularines (Meriluoto *et al.*, 2017).

Les développements technologiques récents en HPLC permettent des temps d'analyse plus rapides, sans pour autant sacrifier l'efficacité chromatographique. L'équipe de Meriluoto a proposé plusieurs compromis raisonnables qui garantissent un débit d'échantillonnage élevé sur l'instrumentation HPLC traditionnelle en utilisant des colonnes avec une taille de particule inférieure à 3 µm (Spooft *et al.*, 2010). Les colonnes d'HPLC monolithiques ont une structure de pores bimodales qui, combinée à une grande surface composée de mésopores, permettront des débits très élevés sans sacrifier la résolution (Cabrera *et al.*, 2000).

Les méthodes HPLC sont utilisées pour une séparation fine, préalable à l'identification des composants d'un produit. C'est pour cela qu'elle est utilisée le plus souvent en tandem avec la spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse (SM) est un outil précieux et très sensible pour déterminer la composition élémentaire et obtenir certaines informations structurales d'un composé. Ainsi, cette approche a été utilisée par Parker et collaborateurs en 2015 dans la détection simultanée et la quantification de MC-LR, -LA, -LY, -RR, -YR, -LW, et -LF, ainsi que de la nodularine-R dans les compléments alimentaires d'algues bleu-vert (Parker *et al.*, 2015).

Lorsqu'une approche HPLC est couplée à de la spectrométrie de masse, différentes modalités de spectrométrie de masse peuvent être utilisées : le FAB/MS (bombardement par des atomes rapides ou Fast Atom Bombardment), l'ESI (ionisation par électronébulisation ou Electrospray Ionisation), le MALDI (désorption et l'ionisation par impulsion laser, assistées par une matrice), et enfin le PDA (DéTECTEUR à photodiode). Sans entrer dans le détail de chacune de ces modalités de la spectrométrie de masse, le tableau I-3 ci-contre résume les utilisations de ces approches appliquées aux microcystines.

I.E-1.b- Alternatives

D'autres techniques intéressantes ont été étudiées dans la séparation à haute résolution des toxines cyanobactériennes. Les données sont résumées dans la tableau I-4 ci-après.

Tableau I- 4: Applications alternatives d'HPLC

Méthode	Principe	Caractéristiques	Références	Applications
chromatographie à couche mince (TLC)	Elle consiste à déposer l'échantillon sur la plaque de silice. Entraîné par un éluant qui diffuse le long du support, l'échantillon migre par capillarité sur la plaque et est plus ou moins freiné selon la nature des interactions qui s'établissent avec le support et l'éluant. La révélation est assurée à la lumière UV ou marquage à l'iode	Technique simple, peu coûteuse ne nécessitant pas de traitement préalable particulier des échantillons. La limite de détection de cette approche est de plusieurs dizaines de nanogrammes.	Poon <i>et al.</i> , 1987	1 ^{er} essai avec la MC : détecter 3 souches toxiques de <i>Microcystis aeruginosa</i> isolées du Loch Balgavies près de Dundee
			Pelander <i>et al.</i> , 2000	Comparaison des résultats de 38 échantillons d'extraits bruts par ELISA, PPIA et TLC
Electrophorèse capillaire (CE)	Un échantillon est injecté dans un capillaire (diamètre de 20 à 100µm) contenant un tampon conducteur d'électricité. Un courant électrique est appliqué sur ce capillaire et va déplacer ou faire migrer les composants de cet échantillon à travers le capillaire à différentes vitesses qui dépendent de leur charge et leur taille.	Détection rapide à de faibles concentrations (100 pg) dans de faibles volumes de mélanges.	Boland <i>et al.</i> , 1993	L'électrophorèse Capillaire (CE) couplée à la chromatographie liquide (LC) a été utilisée pour détecter les microcystines dans des échantillons d'eau douce. Limite de détection 3 µg/ml
			Bateman <i>et al.</i> , 1995	La CE couplée à la LC liée à la spectrométrie de masse est utilisée pour l'analyse de microcystines isolées à partir de souches toxiques de <i>Microcystis aeruginosa</i> . Limite de détection 0.2 µg/ml
			Aguete <i>et al.</i> , 2003	Analyses de 3 MC à partir d'algues et d'échantillons d'eau, réalisées en comparant les techniques HPLC versus LC-CE. Limite de détection 0.013-0.02 µg/g d'algues et 0.002 ng/ml d'eau

I.E-2. Tests *in vivo*

Avant tout, il convient de noter que les essais de toxicité sur les animaux fournissent des informations importantes à propos de la toxicité mais ne permettent pas d'identifier les toxines individuellement.

Les tests *in vivo* sont souvent utilisés pour étudier (i) la toxicité (en particulier l'hépatotoxicité et la neurotoxicité) et (ii) les effets biologiques à partir d'échantillons d'eau et de toxines isolées. Ces données sont nécessaires pour estimer le risque d'intoxication. Les résultats sont décrits et évalués en fonction de :

- La dose administrée,
- La connaissance de l'efficacité des concentrations, par exemple IC₁₀, IC₅₀ (concentration provoquant 10% ou 50% d'inhibition) et la dose sans effet observable,
- Des conditions de l'exposition (voie et milieu d'exposition, concentrations de matériaux d'essai utilisés, durée d'exposition et données cinétiques).

Les limites de cette approche sont les suivantes :

- Problèmes éthiques
L'expérimentation animale est indispensable pour l'étude des effets toxiques des hépatotoxines, d'autant que l'utilisation des cultures de cellules hépatiques n'est pas fiable. Cependant, les animaux sont doués de sensibilité, de mémoire et peuvent éprouver des souffrances. Depuis 1983, la France s'est dotée d'un Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé, qui, en plus des associations de défense animale, exigent que les animaux d'expérimentation soient traités humainement, utilisés uniquement quand cela est strictement nécessaire et en évitant toute souffrance.
- Manque de sensibilité
Les tests *in vivo* ne sont utilisés que lorsque les concentrations de toxines sont assez élevées pour conduire à des intoxications aiguës observables.
La toxicité est exprimée en DL₅₀ ou en dose létale approximative par rapport à la dose minimale (mg de toxine / kg de poids corporel de la souris).
 - Si la DL₅₀ est supérieure à 1000 : non toxique
 - Si la DL₅₀ est comprise entre 500 et 1000 : toxicité légère
 - Si la DL₅₀ est comprise entre 100 et 500 : toxicité moyenne
 - Si la DL₅₀ est inférieure à 100 : toxicité élevée
- Manque de spécificité
Cela est dû en particulier au fait que le test ne permette de voir que l'effet sur l'individu, mais pas d'identifier la toxine mise en jeu, comme évoqué préalablement (Harada *et al.*, 1999 ; Mountfort *et al.*, 2005).

I.E-2.a- Les essais de toxicité sur les souris

Dans le cadre de tels essais chez la souris, un extrait de cyanobactéries est préparé soit par sonication, soit par congélation-décongélation d'une suspension cellulaire stérilisée par ultrafiltration. 0,1 à 1,0 mL de la préparation reprise en tampon physiologique est ensuite injectée par voie intrapéritonéale. Enfin, la souris est observée pendant 24 h puis sacrifiée par une méthode reconnue (Falconer, 1993).

L'association de l'observation des symptômes *ante-mortem* et de l'analyse des lésions tissulaires *post-mortem* permet de déterminer la nature des cyanotoxines présentes dans l'échantillon étudié (Harada *et al.*, 1999). En effet, la présence de cyanotoxines neurotoxiques se manifeste souvent par de forts spasmes, suivis d'une mort rapide. Les microcystines et cylindrospermopsines induisent quant à elles

des changements caractéristiques du foie (gonflement, engorgement de sang, rupture de la structure hépatique et hémorragie) et d'autres organes tels que les reins et les poumons (Runnegar and Falconer, 1982). Cependant, lorsque plus d'un type de cyanotoxines est présent dans l'échantillon, la toxine dont l'action est plus rapide masque les autres symptômes.

I.E-2.b- Poissons et amphibiens

Plusieurs tests de toxicité sont effectués aujourd'hui sur des embryons de poissons comme les *Pimephales promelas*, le médaka japonais *Oryzias latipes*, et le poisson zèbre *Danio rerio* (Acs *et al.*, 2013). En Allemagne, par exemple, les embryons du poisson zèbre sont utilisés régulièrement pour surveiller la toxicité des eaux usées. Cependant, leur utilisation pour la surveillance des cyanobactéries nécessiterait des recherches supplémentaires (Blaha *et al.*, 2017).

I.E-2.c- Tests *in vivo* alternatifs

Les tests de toxicité sur les animaux sont pour des raisons éthiques de plus en plus abandonnés. De ce fait, plusieurs tests alternatifs ont été étudiés comme :

Les plantes et les algues

Différentes plantes ont été utilisées dans des études de toxicité cyanobactériennes telles que *Brassica sp* (famille Brassicacées), *Ceratophyllum sp* (famille Ceratophyllaceae), *Lemna sp* (famille des Lemnaceae), *Myriophyllum sp* (famille des Haloragacées), cette liste n'étant pas exhaustive. En ce qui concerne les algues vertes, qui peuvent être des concurrents directs des cyanobactéries pour les ressources, différents organismes ont été utilisés tels que *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.* et *Dunaliella sp.* D'une manière générale, les résultats obtenus sur ces végétaux sont controversés en raison d'une sensibilité faible (Babica *et al.*, 2006). En revanche, au regard des exigences des tests d'étude de toxicité *in vivo*, en particulier la rapidité et la fiabilité, la souche *Budakalászi sárgala* appartenant à la famille de *Sinapis alba* ou moutarde blanche, a montré une bonne sensibilité pour les MC (IC₅₀ de 5 µg/mL) (Vasas *et al.*, 2002).

Les lignées cellulaires et tests in vitro.

Une large gamme de lignées cellulaires établies et de cultures provenant d'organes humains et animaux ont été utilisées pour évaluer les cyanotoxines pures et les extraits cyanobactériens (Štraser *et al.*, 2013). Elles fournissent une alternative pour réduire l'utilisation de modèles de vertébrés. Plusieurs méthodes de toxicité *in vitro* ont été validées, mais aucune n'est encore recommandée pour la surveillance des cyanotoxines (Blaha *et al.*, 2017).

I.E-3. Le dosage biochimique : Test d'inhibition de PP1A/PP2A ou PPIA (Protein Phosphatase Inhibition Assay)

Même si les méthodes biochimiques sont régulièrement utilisées pour le dépistage rapide de MC dans les échantillons d'eau, elles ne permettent pas d'identifier les variants individuels des toxines. En outre, la quantification des MC peut être moins précise que par les méthodes physico-chimiques évoquées en chapitre I.E.1 (Catherine *et al.*, 2017).

I.E-3.a- Principe

Le PPIA, ou test d'inhibition des protéines phosphatases, fournit des informations sur la bioactivité des toxines dans l'échantillon (Metcalf *et al.*, 2017). Comme évoqué chapitre I.B.3, la MC-LR est un

inhibiteur des protéines phosphatases sérine / thréonine 1 et 2A (PP1 et PP2A). L'inhibition de PP1 et PP2A conduit à une hyperphosphorylation des protéines cytosquelettiques entraînant une déformation des hépatocytes (Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

An et Carmichael ont développé un dosage colorimétrique de l'inhibition des enzymes phosphatases (An and Carmichael, 1994). Dans cette approche, le substrat utilisé est le phosphate de p-nitrophényle. Les phosphatases hydrolysent le phosphate p-nitrophényle, libérant du phosphate et produisant du p-nitrophénol, un produit coloré. L'effet des MC sur les phosphatases peut donc être mesuré par cette approche. Un dosage similaire utilise la phosvitine comme substrat et s'appuie également sur une mesure colorimétrique (Nicholson and Burch, 2001).

1.E-3.a- Avantages

Le PPIA est une méthode adaptée à la détection d'hépatotoxines cyanobactériennes (microcystines et nodularines) puisqu'elle est directement applicable aux échantillons d'eau naturelle sans concentration préalable. Le seuil de détection varie entre 0,25 et 6,6 µg/L. Le principal avantage du PPIA reste la simplicité d'utilisation. En effet, des kits PPIA commerciaux utilisant un format de plaque 96 puits comprennent tous les réactifs nécessaires et nécessitent une seule étape d'incubation de 30 minutes. Un grand nombre d'échantillons peut être analysé en 1 à 2 heures lorsqu'un pré-traitement de l'échantillon n'est pas nécessaire comme dans le cas pour l'analyse des eaux de boissons. Le matériel utilisé est simple d'utilisation (lecteur de microplaque) et le personnel requiert une qualification moindre en comparaison avec une analyse HPLC ou LC-MS (Metcalf *et al.*, 2017).

1.E-3.b- Inconvénients

Les principaux inconvénients de l'approche enzymatique sont les suivants :

- L'échantillon cyanobactérien lui-même peut contenir une activité phosphatase qui masque la présence de toxines (Sim *et al.*, 1994) ;
- La possible inactivation rapide des phosphatases lorsque l'échantillon n'est pas stocké dans des conditions spécifiques (Sassolas *et al.*, 2011) ;
- La diversité d'activité des nombreux variants de microcystines vis-à-vis des phosphatases (Heresztyn *et al.*, 2001) ;
- La possible présence dans l'échantillon d'inhibiteurs de phosphatase autres que les microcystines, comme la calyculine A et l'acanthifolicine apparentée (acide 9,10-épithio-okaidaique), qui sont connues pour être produites par des éponges marines. D'autres toxines diététiques, les toxines de dinophysis (DTX 1 et 2) sont également des inhibiteurs puissants des phosphatases. Enfin, la tautomycine est un autre inhibiteur de phosphatases produit par la bactérie *Streptomyces spiroverticillatus*, et se retrouve souvent dans les coquillages, pouvant interférer avec la détection spécifique de microcystines.

En résumé, le PPIA n'est pas un test spécifique aux MC et ne permet pas de différencier les variants. De ce fait, une analyse de confirmation supplémentaire par LC-MS / MS est nécessaire pour des échantillons PPIA-positifs (Kaloudis *et al.*, 2013). Ainsi, le PPIA ne donne qu'une indication de la toxicité des échantillons, alors que d'autres méthodes analytiques telles que l'HPLC ou l'ELISA permettent de doser la toxine (Smienk *et al.*, 2013).

I.E-4. Les méthodes immunologiques

A ce jour, les méthodes de dépistage les plus utilisées pour la détection des microcystines sont les méthodes immunologiques (Metcalf and Codd, 2003). Ainsi, des kits d'immunodosage et des anticorps commerciaux sont disponibles pour certaines cyanotoxines.

Les anticorps, qui seront détaillés dans le chapitre 2, ont en effet un large potentiel dans la détection et la quantification des cyanotoxines, que ce soit avec des cellules cyanobactériennes lysées ou perméabilisées, des échantillons d'extraits bruts ou traités, ou encore des extraits de tissus d'animaux et/ou de plantes qui ont été exposés à des cyanotoxines.

La recherche d'anticorps anti-MC a commencé il y a à peu près une trentaine d'années. Les premiers anticorps polyclonaux contre les microcystines ont été produits chez le lapin et ont été signalés par Brooks et Codd en 1988 (Brooks and Codd, 1988) puis par Chu et collaborateurs en 1989 (Chu *et al.*, 1989).

Les premiers anticorps monoclonaux contre les microcystines ont été développés par Kfir et collaborateurs (Kfir *et al.*, 1986). En 2000, l'équipe d'Andrew Porter a sélectionné et caractérisé un anticorps recombinant anti-MC à partir d'une banque humaine naïve semi synthétique de fragments d'anticorps à chaîne unique (scFv) présentés en surface de phages. Cependant l'affinité de ce fragment d'anticorps vis-à-vis de la MC-LR reste relativement faible, avec une IC_{50} de l'ordre de $4\mu M$ (McElhiney *et al.*, 2000). Enfin en 2001, Zeck et collaborateurs ont produit un anticorps monoclonal dirigé contre le motif ADDA, qui est commun aux microcystines et aux nodularines (Zeck *et al.*, 2001-B).

Différents auteurs ont comparé les différentes approches, qu'elles soient physicochimiques, biochimiques ou immunologiques (Rapala *et al.*, 2002 ; Spooof *et al.*, 2003 ; Weller *et al.*, 2013). Il en ressort que les anticorps sont de loin les produits les plus fréquemment utilisés. Des tests d'immunodosage basés sur l'utilisation d'anticorps commerciaux existent sur le marché, ce qui est évidemment utile pour l'analyse des microcystines, mais certains tests souffrent d'une caractérisation insuffisante (Bradbury and Plückthun, 2015).

I.E-4.a- La méthode immuno-enzymatique ELISA pour Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

Les tests ELISA actuellement commercialisés reposent sur un principe de déplacement par compétition. Brièvement, des MC sont immobilisées puis révélées par des IgG anti-MC. Le complexe ainsi formé est à son tour révélé au moyen d'un anticorps anti-IgG couplé à une enzyme. Cette interaction est mise en compétition avec un échantillon à tester, éventuellement contaminé par de la MC libre. Une extinction du signal reflète donc la présence de MC dans l'échantillon testé. L'utilisation d'une courbe étalon établie en présence d'une concentration connue de MC permet un dosage quantitatif de la MC éventuellement présente dans l'échantillon prélevé sur le terrain. Le principe général est représenté sous forme de schéma dans la figure I-4.

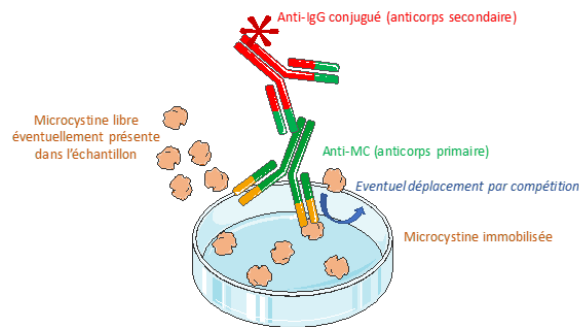


Figure I-4: Principe des tests ELISA commerciaux utilisés pour la détection de MC dans des échantillons.

Des kits d'immunodosage et des anticorps sont disponibles commercialement pour certaines cyanotoxines (voir chapitre 2 tableau 8). Si les anticorps utilisés reconnaissent le motif commun des MC (motif ADDA), alors l'ELISA ne peut que déterminer la teneur totale en microcystines. Outre la non distinction entre les différents variants de MC, un risque de réactions croisées avec les molécules de structure proche persiste. La sensibilité actuelle de détection des kits ELISA commerciaux varie de 0,1 à 2 $\mu\text{g/L}$ selon les kits, en dépit d'un seuil maximal recommandé par l'OMS pour les MCs de l'ordre de 1 $\mu\text{g/L}$.

Il existe sur le marché plusieurs fournisseurs comme Abraxis, Beacon, ou encore Enzo (liste non exhaustive). Ces kits se basent sur l'utilisation d'anticorps obtenus par la technologie des hybridomes. Cette approche est non seulement laborieuse et compliquée, mais elle présente également une limite liée à un accès compliqué à la séquence de l'anticorps, rendant toute approche d'ingénierie des anticorps toute aussi laborieuse.

I.E-4.b Test sur bandelettes ou Dipstick assay

Afin de faciliter et accélérer la démarche de la détection des MC, des recherches sont toujours en cours sur des techniques qui peuvent être effectuées sur le site d'échantillonnage et donnant un résultat rapide. Dans ce but, les bandelettes immunodiagnostiques ou Dipstick assay ont été décrites par Tippkotter en 2009 (Tippkotter *et al.*, 2009).

Le principe est le même que l'ELISA, avec un déplacement possible de l'interaction pré-établie entre l'anticorps et la MC immobilisée sur la bandelette si l'échantillon est contaminé par de la MC libre, mais la révélation est visuelle et se fait sur membrane sans avoir recours à une plaque 96 puits ni lecteur de plaque. Le principe est illustré en figure I-5.

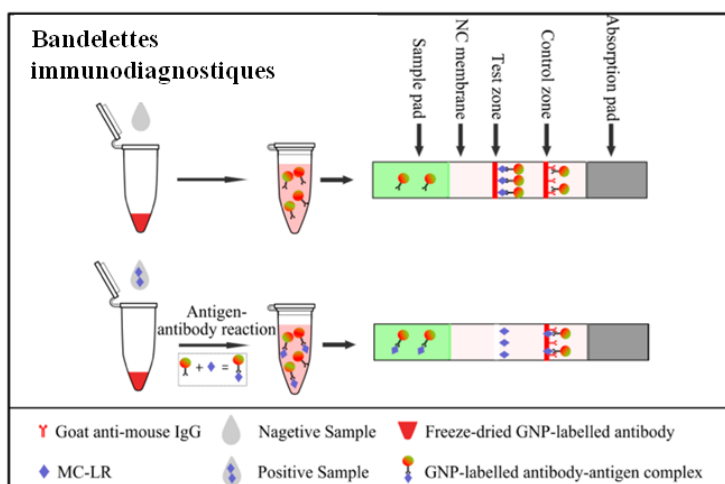


Figure I-5: Principe du test sur bandelettes pour la détection de la MC-LR. Source : Liu *et al.*, 2014.

Pyo et collaborateurs ont également présenté un système de bandelettes capables de détecter les MCs (Pyo *et al.*, 2006). Dans ce travail, la limite de détection est définie par le changement de couleur visible à l'œil nu, en comparant l'intensité du signal obtenu à celle de solutions étalons de MC. Des auteurs ont cependant émis des réserves quant à la subjectivité de l'analyse à l'œil nu. L'équipe de Roland Ulber a optimisé cette technique en utilisant des nanoparticules d'or (Tippkötter *et al.*, 2009). L'avantage de l'or est son excellente affinité pour les protéines et sa couleur rouge très intense. Ces bandelettes peuvent être utilisées sur le site de prélèvement de l'échantillon pour donner un résultat en 15 minutes avec une sensibilité de l'ordre de 1 à 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

I.E-4.c La Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

La technologie BIAcore® exploite le phénomène de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) pour l'étude des interactions entre des molécules en temps réel. Très brièvement, le principe repose sur l'utilisation d'une sensorchip recouverte d'or et surmontée d'un prisme à fort indice de réfraction. Une lumière incidente traverse le prisme et est réfléchié selon un angle particulier qui est mesuré. La lumière incidente déclenche une onde évanescente au niveau de la couche d'or qui se déplace perpendiculairement à la puce, et dont l'intensité est liée à l'indice de réfraction du système fluide au contact de la puce. Cette onde évanescente, ou plasmon, influence directement l'angle de la lumière réfléchié. Un ligand est immobilisé sur la puce (Figure I-6). Le partenaire d'interaction supposé de ce ligand, appelé « analyte » selon la terminologie BIAcore®, circule dans un système fluide au contact du ligand. Une éventuelle interaction entre les deux partenaires ligand/analyte modifie l'indice de réfraction du milieu fluide et donc le plasmon, influençant directement l'angle de la lumière réfléchié. Un logiciel de traitement nommé BIAeval permet de traduire les variations mesurées en sensorgrammes reflétant l'interaction en temps réel entre les molécules mises en jeu.

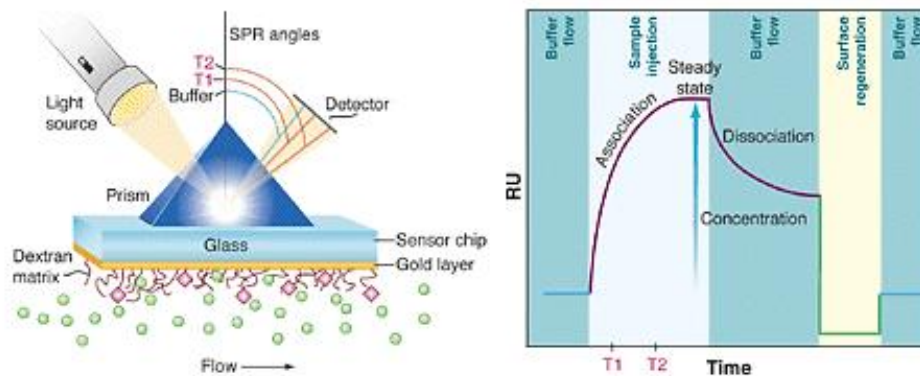


Figure I- 6: Principe de la technologie BIAcore®. Source : Wilson, 2002.

L'utilisation de la SPR comme outil de détection des microcystines a été initiée en 2009, avec l'équipe de Song qui a développé un test à large gamme de détection, allant de 1 à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Hu *et al.*, 2009). Cela a encouragé d'autres chercheurs à optimiser les conditions de la détection comme Heranz *et al* en 2010 ou Vinogradova *et al* en 2011. Plus récemment en 2014, l'équipe de Vasconcelos a réussi à atteindre une limite de détection égale à 0.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à partir de microcystines libres, et 0.05 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à partir de microcystines intracellulaires, et cela en immobilisant la MC-LR et injectant comme analyte un anticorps monoclonal anti MC-LR (Devlin *et al.*, 2014).

I.E-5. Méthodes alternatives

I.E-5.a- Les polymères à empreintes moléculaires ou "Molecularly imprinted polymer" (MIP)

Les MIP sont des matériaux de synthèse entièrement artificiels obtenus par polymérisation de monomères autour d'une molécule cible. En général, une molécule modèle (analyte) est mélangée avec un ou plusieurs monomères fonctionnels en présence d'un solvant et d'un catalyseur de polymérisation ou agent de réticulation. Une fois la polymérisation terminée, la molécule modèle est extraite du polymère obtenu. Il en résulte une cavité complémentaire en forme et en fonctionnalité, capable d'interagir avec les molécules identiques ou de structures proches de celle de la molécule modèle.

Les principaux avantages de cette approche sont la robustesse et souvent le coût. Le polymère imprimé peut potentiellement être régénéré presque indéfiniment sans perte d'activité, et ne se dénature pas en présence des solutions acides, basiques ou agressives (Weller, 2000).

En contrepartie, les MIP présentent quelques inconvénients, justifiant leur limitation dans de nombreux domaines. Chaque synthèse étant différente, un MIP spécifique peut s'avérer difficilement reproductible. De plus, le polymère relativement hydrophobe conduit à une liaison non spécifique élevée, nécessitant une optimisation très fine des conditions de liaison et d'éluion. En outre, l'utilisation de MIP pour les échantillons hautement aqueux reste encore difficile.

Plusieurs articles font état de l'utilisation de MIP pour la détection de microcystines, à savoir Chianella *et al.*, 2002 ; Queiros *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2012 et plus récemment Mbukwa *et al.*, 2013. La limite de détection peut atteindre 0.1 µg/L, ce qui est 10 fois moins que la valeur seuil proposée par l'OMS (1 µg/L). Cela montre une excellente affinité vis à vis de la MC, et ouvre la possibilité de son utilisation dans la purification ou la détection de MC dans le futur.

I.E-5.b- Les aptamères

Les aptamères sont de petits oligomères d'ADN ou d'ARN capables de se lier à une cible identifiée. Ils sont sélectionnés par une approche appelée SELEX (pour Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment), basée sur plusieurs cycles d'enrichissement à partir de banques aléatoires d'une large diversité.

Beaucoup de toxines cyanobactériennes sont de taille moyenne (200 à 4000 Da), ce qui les rend accessibles à la liaison sélective des aptamères. En 2012, un groupe a rapporté la sélection d'aptamères d'ADN de grande affinité, comprise entre 28 et 60 nM (Ng *et al.*, 2012). Ils ont utilisé une configuration électrochimique particulière pour la conception d'un système de biocapteur et ont observé une limite de détection de 10 pM, montrant les potentialités de cette approche. Plus récemment, les équipes de Zhao et de Wang ont développé deux aptamères, respectivement à capteur colorimétrique et à fluorescence, pour détecter la MC-LR (Li *et al.*, 2016 ; Lv *et al.*, 2017).

I.E-5.c- La PCR quantitative (PCRq)

Le séquençage des génomes des cyanobactéries a conduit à l'identification des gènes responsables de la production de cyanotoxines (mcy). Ceci a permis l'utilisation de ces gènes comme cibles pour la PCR, pour identifier des souches potentiellement toxiques. Ensuite, ces tests ont été rapidement développés en un format de PCR quantitative, permettant la quantification des gènes de la toxine (Foulds *et al.*, 2002). Cet outil se base sur la mesure du nombre de copies du gène de la cyanotoxine dans le but d'estimer la teneur en toxines dans l'eau douce et surveiller les efflorescences toxiques.

Cependant, cette technique présente une limitation particulièrement critique lorsque des échantillons réels sont concernés. Selon la nature de l'échantillon, l'ADN extrait peut contenir des contaminants qui entraînent l'inhibition de la PCR et affectent alors sa sensibilité avec des résultats faux négatifs. Par ailleurs, un gène codant pour une toxine peut être présent mais non exprimé, conduisant également à de faux négatifs.

Toutefois, il est possible d'améliorer encore la simplicité et la rapidité de ce test en mettant en œuvre des protocoles compatibles avec les extraits bruts et un équipement de PCR portable pour la détection sur le terrain en temps réel (Pacheco *et al.*, 2016).

Le tableau I-5 ci-dessous récapitule l'ensemble des approches utilisées pour la détection des microcystines et les références bibliographiques associées.

Tableau I- 5: Principales méthodes utilisées pour la détection des MC

Technique	Principe	Caractéristiques	Inconvénients	Références
ELISA	Détection de la cible fixée sur un support par utilisation d'un système d'anticorps mono- et/ou polyclonaux.	<ul style="list-style-type: none"> - Détection rapide et peu coûteuse. - Evaluation de la concentration totale de la toxine dans l'échantillon. - Présence des kits de détection commerciaux. - Spécificité et sensibilité élevées (IC₅₀ 0.26 - 0.38 µg/L (seuil de détection inférieur à celui fixé par l'OMS de 1 µg/L)). 	<ul style="list-style-type: none"> - Réaction croisée des anticorps avec les différents variants de la MC. 	Rapala <i>et al.</i> , 2002. McElhiney <i>et al.</i> , 2002 Singh <i>et al.</i> , 2012
Protein phosphatase Inhibition assay (PPIA)	Basé sur la capacité des MC à inhiber les résidus serine-thréonine des phosphatases.	<ul style="list-style-type: none"> - Mesure de la toxicité potentielle totale. - Spécificité et sensibilité élevées (IC₅₀ 2.2 - 2.5 µg/L). 	<ul style="list-style-type: none"> - Certains variants de la microcystine n'interagissent pas avec les phosphatases. - Possibilité de faux positifs dus à la présence d'une activité phosphatase de certaines cyanobactéries. 	Rapala <i>et al.</i> , 2002
Mouse bioassay	Détection des échantillons à concentration élevée en toxines par intoxication des souris.	<ul style="list-style-type: none"> - Détection des toxines à concentration élevée par intoxication aigüe chez les souris. 	<ul style="list-style-type: none"> -Sensibilité très faible. -Mode d'administration différente de l'exposition naturelle aux MC. -Problèmes éthiques liés à l'utilisation d'un grand nombre d'animaux. 	Mountfort <i>et al.</i> , 2015
Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	Système basé sur la migration de l'échantillon le long d'une colonne permettant une analyse qualitative, quantitative et séparative de l'échantillon.	<ul style="list-style-type: none"> - Identification des différents variants de toxines présentes dans un échantillon. - Système de détection par UV (HPLC-UV) ou spectrométrie de masse (LC-MS). - Spécificité et sensibilité élevées : 0.5 – 3.5 µg/L. 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipement coûteux. - Personnel qualifié. - Processus d'analyse et de traitement de données très long. 	Rapala <i>et al.</i> , 2002 Weller, 2013 Harada, 1993 Mountfort <i>et al.</i> , 2015

Aptamères	Utilisation de molécules à base d'ADN ou d'ARN permettant la reconnaissance structurale de la cible de la même façon que les anticorps.	<ul style="list-style-type: none"> - Molécules d'ADN ou d'ARN de très faible taille moléculaire et produites contre les MC après plusieurs tours de sélection par SELEX. - Seuil de détection de l'ordre de 10 pM. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité au pH et aux enzymes pouvant être présentes dans l'échantillon à analyser. 	Ng <i>et al.</i> , 2012
MIP	Détection de la cible par utilisation de polymères synthétiques obtenus par polymérisation de monomères autour de la molécule d'intérêt.	<ul style="list-style-type: none"> - Robustesse et faible coût par rapport aux anticorps. 	<ul style="list-style-type: none"> - Hétérogénéité dans les lots de synthèse. - Faible capacité de liaison. - Distribution hétérogène des sites de liaison. 	Weller, 2013 Pan <i>et al.</i> , 2015
Résonance plasmonique de surface (SPR)	Repose sur la fixation de la cible sur une puce et sa détection par le suivi de changement de masse à la surface de cette puce lors du passage de l'analyte dirigé contre la cible.	<ul style="list-style-type: none"> - Mesure des interactions entre des molécules en temps réel. - Possibilité d'utilisations répétées de la puce de détection sans perte de ses propriétés de liaison à la cible. - Détection rapide sur une courte durée de temps ≈ 50 minutes. - Seuil de détection : $0.05-0.5 \mu\text{g/L}^{-1}$ 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite une optimisation préalable de la méthode de détection et d'analyse : Concentrations des réactifs, composition des tampons et solutions à utiliser en fonction de la cible. 	Hu <i>et al.</i> , 2009 Herranz <i>et al.</i> , 2010
Biocapteurs immunoelectrochimiques à base de graphène	Utilisation d'un système de nanosphères de carbone et d'anticorps couplés à la HRP pour amplification du signal. - Utilisation du graphène pour l'immobilisation de la cible.	<ul style="list-style-type: none"> - Rapide et ne nécessite pas une préparation préalable de l'échantillon. 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible sensibilité (seuil de détection : 16 ng/L). 	Weller, 2013 Zhao <i>et al.</i> , 2013
Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	Détection en une seule étape par mélange de nanoparticules magnétiques avec l'échantillon.	<ul style="list-style-type: none"> - Limite de détection : $0.6 \mu\text{g/L}$. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite un personnel qualifié et un équipement très coûteux. 	Harada, 1993 Ma <i>et al.</i> , 2009

II

Les scFv comme outils de détection

A-Introduction

B- Les anticorps, principaux acteurs du système immunitaire

C- *Le phage display*

D- Détection de la microcystine LR

II- Les scFv comme outils de détection

II.A- Introduction

L'immunologie est une science relativement nouvelle. Le système immunitaire permet de faire la distinction entre le soi et le non-soi, c'est à dire toute molécule étrangère à l'organisme. L'origine de l'immunologie est généralement attribuée à Edward Jenner qui a découvert, en 1796, le vaccin contre la variole. Toutes les avancées et découvertes qui ont suivi sont dues à plusieurs chercheurs parmi lesquels Robert Koch, qui a montré que les maladies infectieuses étaient causées par des microorganismes, chacun responsable d'une pathologie particulière, ou encore Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato, qui ont découvert que le sérum des individus vaccinés contenait des substances, qu'ils appelèrent « anticorps », liées spécifiquement au pathogène concerné. Le travail de ces 2 immunologistes, en combinaison avec celui de l'immunologiste russe Elie Metchnikoff, a beaucoup apporté à l'étude de la réponse immunitaire et a permis de définir, par la suite, les réponses immunitaires innée et adaptative. La contribution du chercheur allemand Paul Ehrlich s'ajoute à cette liste grâce à ses travaux concernant la réponse immunitaire humorale et les interactions antigène-anticorps. Ce travail lui a permis d'obtenir le prix Nobel de médecine en 1908.

Le système immunitaire défend l'hôte contre l'infection. L'immunité innée sert de première ligne de défense. L'immunité adaptative, quant à elle, est basée sur la sélection clonale d'un répertoire de lymphocytes portant des récepteurs qui sont spécifiques des antigènes, permettant au système immunitaire de reconnaître n'importe quel antigène étranger. Au cours de la réponse immunitaire adaptative, les lymphocytes spécifiques de l'antigène prolifèrent et se différencient en cellules effectrices qui éliminent les agents pathogènes. La défense de l'hôte nécessite différents systèmes de reconnaissance et une grande diversité de mécanismes effecteurs pour rechercher et détruire une large variété d'agents pathogènes dans leurs divers habitats. Ainsi, non seulement la réponse de l'immunité adaptative élimine l'agent pathogène, mais elle génère également un nombre accru de lymphocytes mémoire différenciés par sélection clonale, ce qui permet une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une potentielle réinfection (Murphy and Weaver, 2017).

II.B- Les anticorps, ou immunoglobulines, principaux acteurs du système immunitaire

Pratiquement toute substance du non-soi, à l'exception des haptènes, peut provoquer une réponse immunitaire et la synthèse d'anticorps spécifiques. Même la réponse à un immunogène simple portant un déterminant antigénique unique est diversifiée et comprend plusieurs molécules d'anticorps différentes, ayant chacune une affinité (ou force de liaison) et une spécificité pour l'antigène différentes (Schroeder and Cavacini, 2010). Sécrétés par les lymphocytes B à la suite de l'intrusion d'un élément du non-soi, les anticorps sont capables de se lier à l'antigène de façon spécifique afin de le neutraliser.

La diversité des anticorps chez un individu est connue sous le nom de répertoire d'anticorps ou répertoire d'immunoglobulines. Chez l'homme, le répertoire est estimé entre 10^{11} et 10^{15}

molécules différentes. Cependant, le nombre d'anticorps spécifiques présents à un moment donné est limité par le nombre total de cellules B chez un individu, ainsi que par l'exposition de chaque individu à des immunogènes potentiels. Le répertoire des anticorps est généré par des réarrangements d'ADN se produisant au cours du développement des cellules B (Murphy and Weaver, 2017).

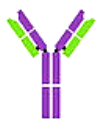
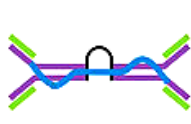
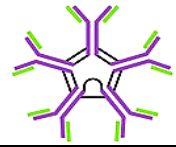
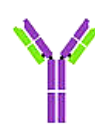
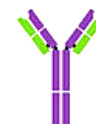
II.B-1. Structure et caractéristiques

Pour revue : Schroeder and Cavacini, 2010.

D'un point de vue structural, les immunoglobulines (Ig) sont des hétérodimères composés de deux chaînes lourdes identiques appelées H pour *Heavy* d'environ 50-70 kDa, et de deux chaînes légères identiques appelées L pour *Light* d'environ 25 kDa.

Il existe 5 types de chaînes lourdes (γ , α , μ , δ et ϵ) qui définissent les cinq classes (ou isotypes) d'immunoglobulines, respectivement IgG, IgA, IgM, IgD, et IgE. De plus, il existe deux types de chaînes légères : κ et λ , qui peuvent se combiner avec n'importe quel type de chaîne lourde. Les principales caractéristiques et propriétés de chaque classe sont représentées dans le tableau II-1.

Tableau II-1 : Principales caractéristiques et propriétés des différentes classes des immunoglobulines

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
					
Chaîne lourde	γ	α	μ	δ	ϵ
Nombre de sites de liaison à l'antigène	2	4	10	2	2
Proportion (%)	75-80	12-20	6-10	<1 %	<0,01
Sous-classes	IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4	IgA1 et IgA2	1	1	1
Structures possibles d'Ig	Monomères	Monomères / dimères	Pentamères / monomère	monomères	monomères
Poids moléculaire (kDa)	150	160/monomère	900	185	200
Activation du complément	+	-	++	-	-
Liaison aux récepteurs Fc des phagocytes	++	-	+	-	-
Activation des granulocytes	-	-	-	-	++
Fonction	Ig principale des réponses secondaires : neutralisation des toxines et opsonisation	Sécrété dans le mucus, les larmes, le lait maternel et la salive	Ig principal des réponses primaires	Récepteur des cellules B	Implication dans l'activité allergique et antiparasitaire

Inspiré de Schroeder and Cavacini, 2010 et <http://symposium.com/antibodies-classes/> consulté le : 28-10-2017.

Les chaînes lourdes sont associées par deux ponts disulfures, et chaque chaîne légère établit un pont disulfure avec une chaîne lourde. La région charnière (ou *Hinge* en anglais), située dans la région médiane de deux chaînes lourdes, est très variable en longueur et nombre de ponts disulfures selon les sous-classes des IgG, ce qui leur confère une flexibilité segmentaire et rotationnelle importante, facilitant ainsi plus ou moins la fixation à l'antigène (Liu and May, 2012). Enfin, des ponts disulfures intra-chaînes existent également sur chacune des chaînes lourdes et légères de l'anticorps, permettant ainsi la définition de domaines, ou boucles peptidiques, de 110 résidus en moyenne par domaine, et nommés : V_L et C_L pour la chaîne légère et, V_H, C_{H1}, C_{H2} et C_{H3} pour la chaîne lourde (Figure II-1)

D'un point de vue fonctionnel, les Ig se caractérisent par la présence d'un domaine variable dans la région NH₂ terminale (V_L et V_H) et de domaines constants du côté COOH terminal. Alors que la partie variable est responsable de la reconnaissance et la neutralisation de l'antigène, la partie constante est quant à elle porteuse des fonctions effectrices telles que l'activation du complément et le recrutement de certaines cellules immunitaires grâce aux récepteurs du Fc.

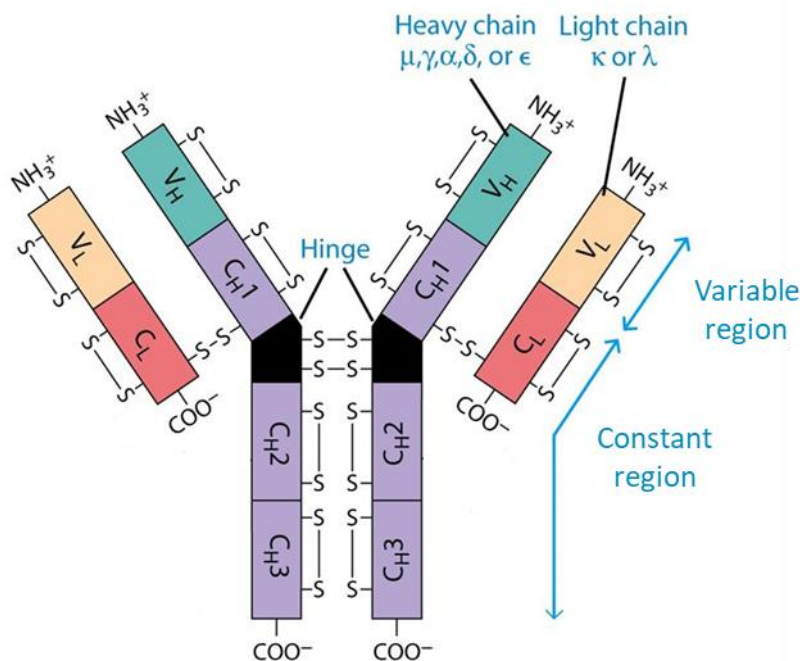


Figure II-1: Structure des immunoglobulines G humaine. Source : Kindt et al., 2007.

Les domaines variables des chaînes lourdes et légères montrent une diversité séquentielle très élevée. Ils sont codés par des segments de gènes distincts. Les régions variables des chaînes légères sont codées par deux segments de gènes appelés V_L et J_L, tandis que celles des chaînes lourdes sont codées par trois segments de gènes appelés V_H, D_H et J_H (Figure II-2). La région variable est organisée en zones hypervariables ou CDR (*Complementarity Determining Region*), zones de 5 à 10 acides aminés en général, formant en partie le site de liaison et de complémentarité avec l'épitope de l'antigène. Les CDR sont encadrés par des régions dites charpentes ou « *Framework* », séquences présentant une moins grande variabilité que les CDR.

Les *frameworks* permettent la définition des différents sous-groupes de gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères.

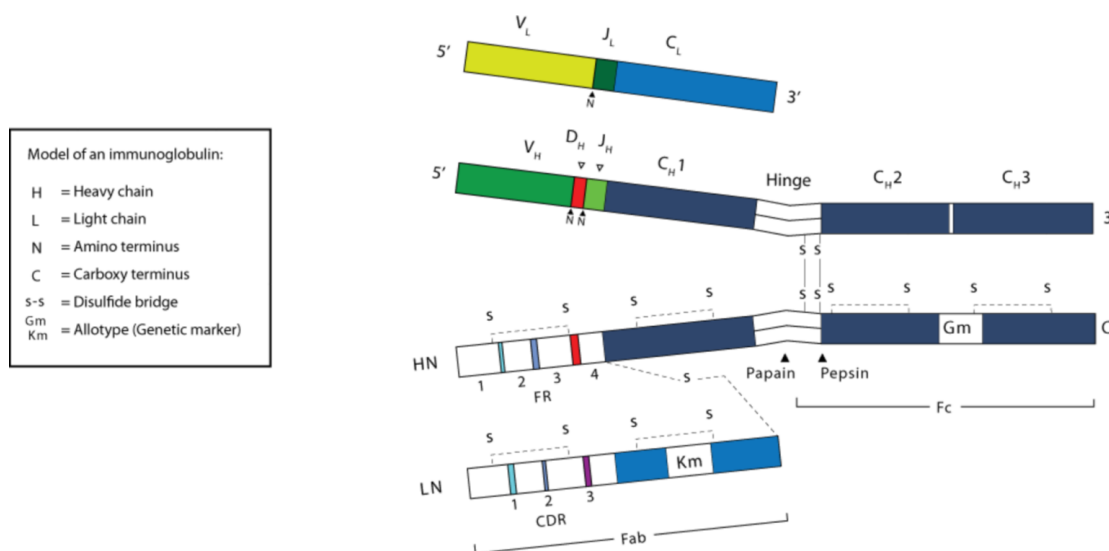


Figure II- 2: Organisation des segments de gènes codant pour les chaînes lourdes et légères. Source : Schroeder and Cavacini, 2010.

II.B-2. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux constituent un outil important dans plusieurs domaines, notamment pour la recherche fondamentale et les applications diagnostiques et médicales. Les anticorps monoclonaux sont essentiellement produits à partir de souris, voire de rats, en utilisant la technologie d'hybridation cellulaire dite des « hybridomes » mise en œuvre par Kohler et Milstein (Kohler and Milstein, 1975).

Le principe de cette technologie est le suivant : après immunisation de l'animal contre un antigène spécifique, les cellules spléniques sont isolées puis fusionnées avec des cellules de myélome immortelles, non sécrétrices d'anticorps. Une sélection adaptée, permet d'isoler des hybridomes sécrétant indéfiniment des anticorps. Un travail de sous-clonage, le plus souvent par dilutions limites, suivi d'un criblage par ELISA, permet *in fine* de sélectionner l'hybridome sécréteur des anticorps aux spécificités recherchées (Barbas *et al.*, 2001) (Figure II-3).

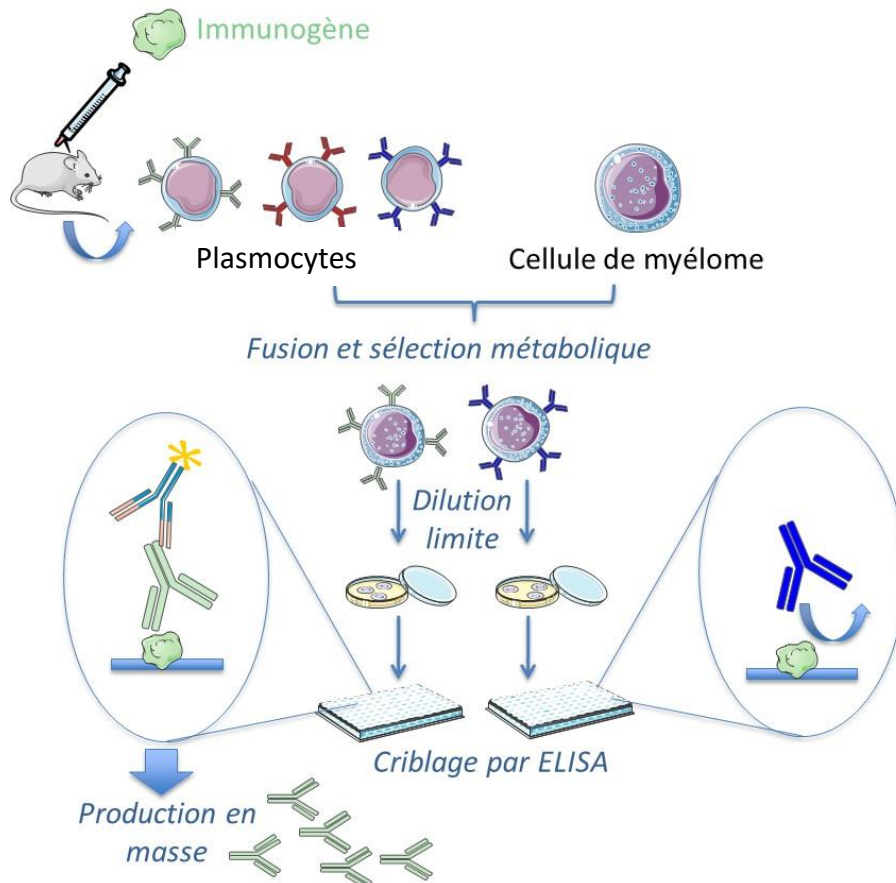


Figure II- 3: Principe de la production des anticorps monoclonaux chez la souris par la technologie des hybridomes.

II.B-3. Les fragments d'anticorps et le cas du scFv

Même si l'anticorps entier présente certains avantages liés en particuliers aux fonctions effectrices portées par la région constante des IgG, les chercheurs se sont peu à peu tournés vers des fragments d'anticorps, de taille plus restreinte, donc potentiellement moins immunogènes et diffusant mieux dans les tissus. Ainsi, le traitement des Ig par différentes protéases a permis aux chercheurs d'obtenir les premiers fragments d'anticorps, ouvrant la voie à l'ingénierie des anticorps. Il est ainsi possible de fragmenter des IgG avec de la papaïne, une enzyme protéolytique induisant l'hydrolyse des liaisons peptidiques de l'IgG, générant ainsi trois fragments (Figure II-4). Deux de ces trois fragments sont identiques et conservent leur capacité à se lier à l'antigène. Ces deux fragments sont appelés les fragments Fab (pour *Fragments of antigen-binding*) (Porter, 1959).

La pepsine est une enzyme qui hydrolyse en des sites différents de ceux de la papaïne. Les IgG traitées avec la pepsine donnent un fragment, nommé $F(ab')_2$, ayant une masse moléculaire d'environ 100 kDa, soit le double de la masse moléculaire d'un fragment Fab, et de nombreux fragments de masse plus faible (Figure II-4). Ce fragment $F(ab')_2$ peut également se lier à l'antigène puisqu'il possède les deux sites de liaison à l'antigène des IgG (Elgert, 1998 ; Ribatti, 2015).

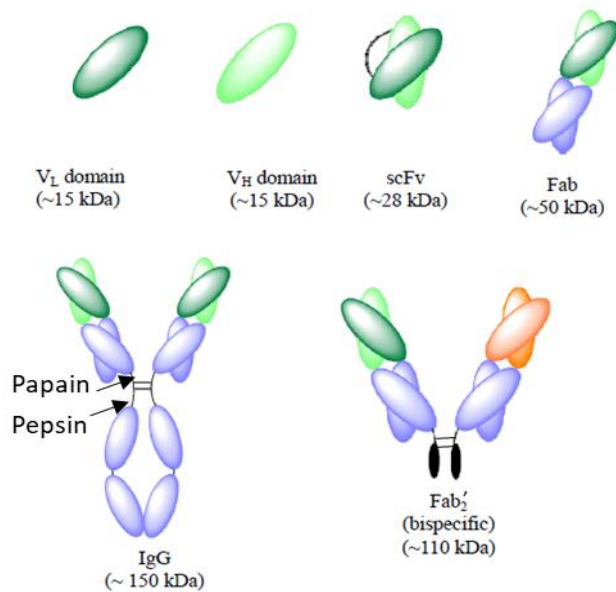


Figure II- 4: Représentation des différents formats d'anticorps. Inspiré de : Herrington-Symes et al., 2013.

Jusque dans les années 1990, le seul moyen d'obtenir des fragments d'anticorps actifs était la protéolyse ménagée par exemple par la papaine ou la pepsine. A partir des années 1990, avec la meilleure connaissance de la structure des Ig et la possibilité de produire des protéines recombinantes par ingénierie moléculaire, sont apparus de nouveaux fragments d'anticorps susceptibles de satisfaire de nouvelles exigences. Toutefois, on peut noter que lors des deux dernières décennies, les chercheurs se sont particulièrement focalisés sur le scFv (pour *single chain Fragment variable*), un format obtenu exclusivement par génie recombinant. Il s'agit d'un fragment d'anticorps à chaîne unique, constitué des domaines variables des chaînes lourdes et légères, reliées entre elles par un peptide flexible nommé *linker* (Figure II-4).

Finalement, la production des anticorps est donc peu à peu passée de la technologie des hybridomes à des approches de génie génétique. Au cours des dernières décennies, les fragments d'anticorps ont été isolés et présentés sous forme de fragments dans divers systèmes d'expressions tels que les levures, les ribosomes et les phages. Le système d'expression des levures a été utilisé pour l'expression de protéines thérapeutiques depuis le début des années 1980. Leur croissance nécessite des milieux de culture spécifiques et elles peuvent sécréter de grandes quantités de protéines recombinantes. De cette manière, ce système constitue une alternative intéressante lorsque les fragments d'anticorps sont difficiles à exprimer dans les bactéries (Alvarenga et al., 2017).

La présentation de protéines en association avec un ribosome ou le *Ribosome display* est une technologie de sélection *in vitro* pour les protéines et les peptides provenant des banques de très grande taille (jusqu'à 10^{14} combinaisons différentes estimées). Son avantage principal est que la diversité de la bibliothèque n'est pas limitée par l'efficacité de transformation des cellules bactériennes, mais seulement par le nombre de ribosomes et de molécules d'ARNm différentes présentes *in vitro* (Zahnd et al., 2007).

Néanmoins, la technologie de “*phage display*” ou la présentation de molécules à la surface de phages filamenteux, est la plus développée et appliquée comme outil de sélection de molécules d’intérêt, directement à partir d’un répertoire de gènes d’anticorps. Une rapide comparaison entre la technologie des hybridomes et la sélection d’anticorps par phage display est présentée dans le tableau II-2.

Tableau II- 2: Comparaison entre la technologie des hybridomes et la sélection d’anticorps par phage display.

Technologie des hybridomes	Phage display
Après immunisation d’une souris, les cellules B sont fusionnées avec des cellules de myélome, entraînant une production infinie d’un anticorps d’intérêt codé par des segments de gènes définis	Tous les segments de gènes sont clonés aléatoirement dans des vecteurs phagiques pour permettre une représentation optimale du répertoire immun
Sélection et production ont lieu <i>in vivo</i> : V _H -V _L sont exprimés par des cellules B ayant subi une sélection positive ou négative avant de rencontrer l’antigène	Sélection et production ont lieu <i>in vitro</i> : V _H -V _L sont exprimés par le phage ayant subi une série de sélections positives et/ou négatives basées sur la reconnaissance de la cible d’intérêt
Procédure longue et délicate qui nécessite une manipulation animale pouvant durer de 6 à 12 mois	Procédure relativement simple, éthique (absence de manipulation animale), et qui nécessite classiquement 4 à 6 tours de sélection (soit 3 à 4 mois)
Affinité des clones isolés pour un Ag donné $\approx 10^{-9}$ M	Affinité des clones isolés pour un Ag donné $\approx 10^{-7}$ M
Pour les antigènes non immunogènes, approche nécessitant un couplage avec une molécule porteuse afin d’engendrer une immunogénicité	Approche permettant la sélection d’anticorps dirigés contre n’importe quel antigène (non immunogène, autoantigène, antigène toxique <i>in vivo</i> , ou encore antigène situé à la surface des cellules)
La diversité d’une banque d’hybridomes est limitée par la qualité de la fusion, l’instabilité des clones lors de la sélection, et la maintenance délicate de la culture cellulaire.	La diversité des banques de phages est limitée par les étapes de construction de la banque (clonages de toutes les séquences du répertoire immun, efficacité de la ligation puis de la transformation bactérienne), mais aussi par la qualité de l’expression du fragment d’anticorps en fusion avec la protéine du manteau du phage ou sa toxicité vis à vis d’ <i>E.coli</i> .

Inspiré de Sorouri *et al.*, 2014.

Cependant, les scFv provenant du phage display présentent plusieurs avantages en comparaison avec les anticorps monoclonaux provenant de la technologie d’hybridomes :

- Les phages sont plus stables et peuvent être stockés jusqu’à plusieurs années à 4°C.
- Ils peuvent être produits rapidement juste par infection bactérienne.
- Leurs gènes peuvent être facilement manipulés et enfin ils peuvent être produits sans avoir recours aux hybridomes et à l’immunisation des animaux.
- En dernier lieu, les clones de scFv ayant la meilleure affinité pour un antigène donné, peuvent être produits plus facilement (Ahmad *et al.*, 2012).

II.C- Le *phage display* ou présentation de molécules en surface de phages filamenteux

Parmi les différentes approches permettant l'isolement d'anticorps ou fragments d'anticorps d'intérêt, la technologie du *phage display*, ou présentation de molécules en surface de phages filamenteux, reste la plus développée et constitue un outil puissant.

En 1985, Georges Smith a été le premier à proposer que des gènes étrangers pouvaient être fusionnés à un gène codant pour une protéine de surface (pIII) d'un phage filamenteux non lytique, sans altérer sa capacité d'infection (Smith, 1985).

Quelques années plus tard, les Fab et les scFv ont pu être exprimés en surface de phages en tant que protéines fonctionnelles, conservant donc leurs capacités à se lier spécifiquement à leurs antigènes (McCafferty *et al.*, 1990 ; Hoogenboom *et al.*, 1991). Notamment, ils sont les plus utilisés dans le *phage display*. Néanmoins, les Fabs sont plus difficiles à assembler, plus susceptibles d'être dégradés et ont des rendements plus faibles sous forme soluble (Bradbury and Marks, 2004).

II.C-1. Les phages filamenteux

Les bactériophages filamenteux sont des virus infectant les cellules procaryotes. Ces virus possèdent un ADN simple brin circulaire enfermé dans une capsidie protéique constituant le manteau, ou enveloppe extérieure du phage (Sidhu, 2001). Les phages infectent les bactéries à Gram négatif exprimant les pili de conjugaison codés par le facteur de fertilité F (F+) (Barbas *et al.*, 2001). Cette infection ralentit la croissance bactérienne. Les phages filamenteux M13, f1 et fd sont les plus utilisés grâce à leur capacité à infecter les souches d'*Escherichia coli* F+.

D'un point de vue structural, le phage M13 contient un génome d'ADN simple brin circulaire formé de 11 gènes de 6407 nucléotides, et entouré de protéines de manteau (Figure II-5). L'enveloppe protéique est composée de cinq protéines : Quatre protéines d'enveloppe mineures : pIII, pVI, pVII et pIX et une protéine d'enveloppe majeure : pVIII qui couvre toute la longueur du phage à raison de 2700 exemplaires par particule. Les protéines pIII et pVI sont localisées à une extrémité, tandis que pVII et pIX sont à l'autre extrémité de la particule phagique, chacune étant représentée en cinq exemplaires. Toutes ces protéines du manteau jouent un rôle dans la reconnaissance des cellules hôtes (Sidhu, 2001).

Les protéines pIII et pVIII se sont avérées être les plus utilisées comme support de présentation des fragments d'Ac sur la surface du bactériophage filamenteux. Le choix entre ces deux systèmes dépend de la valence requise (nombre de copies exprimées par bactériophage).

L'expression de 2700 copies de protéines recombinantes par particule phagique, rend le système d'expression avec la protéine pVIII très utile pour la sélection de plusieurs clones avec des affinités variées. Contrairement à pVIII, la protéine pIII n'est présente qu'à un des pôles du phage (Ahmad *et al.*, 2012).

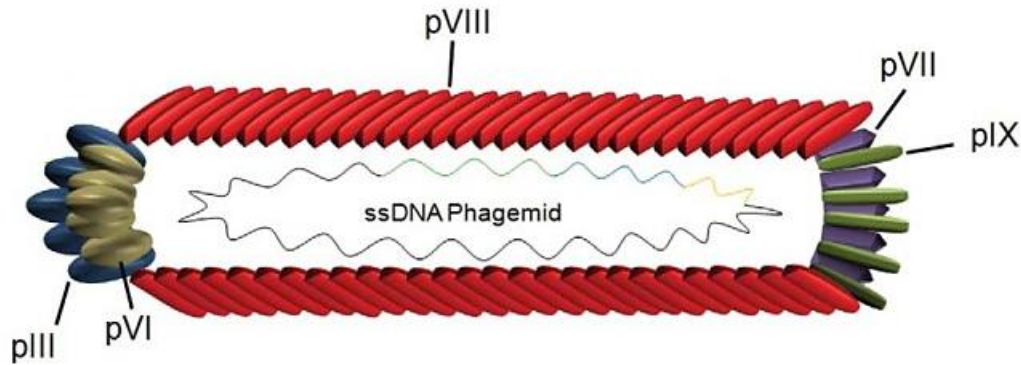


Figure II- 5: Présentation du bactériophage M13. Source : Kierny *et al.*, 2012.

II.C-2. Vecteurs phagiques.

Il existe deux méthodes pour exprimer une protéine de fusion en surface de phages.

La première consiste à cloner le gène de fusion directement dans le génome du phage. Toutes les copies de la protéine de manteau choisie seront dans ce cas fusionnées à la protéine d'intérêt, et aucune surinfection par un phage auxiliaire ne sera nécessaire, simplifiant les conditions de culture (Tohidkia *et al.*, 2012).

Le vecteur f1 de type sauvage a été le premier utilisé pour exprimer une protéine de fusion (Smith, 1985). En raison de plusieurs défauts dans le taux d'infection et de production de phages, Smith a suggéré l'utilisation d'un autre vecteur appelé fd-tet, résistant à la tétracycline (Crissman and Smith, 1984). Par la suite, ce vecteur a été modifié en fd-CAT1, efficace pour l'expression d'un domaine variable d'anticorps (McCafferty *et al.*, 1990), ainsi qu'en fd-DOG1 pour le clonage de Fab (Hoogenboom *et al.*, 1991). Ce vecteur et ses dérivés sont devenus les plus utilisés dans cette approche puisque les protéines de fusion exprimées n'empêchent pas l'infectivité, la réplication du génome, ni même la production de phages (Barbas *et al.*, 2001).

La seconde méthode consiste à utiliser un vecteur phagique recombinant, appelé phagemide, combinant plasmide et génome du phage. Les phagemides contiennent non seulement l'origine de réplication et le signal d'encapsidation du phage M13, mais aussi l'origine de réplication et le système d'expression du plasmide, incluant en général un site de clonages multiples, un marqueur de résistance aux antibiotiques et un promoteur (Sidhu, 2001).

Le système phagemide nécessite cependant une infection des bactéries par un phage auxiliaire, ou *phage helper*, car certains gènes codant pour les protéines nécessaires à l'assemblage du phage intègre sont manquants. Si l'utilisation d'un phage auxiliaire induit une étape supplémentaire liée à la nécessité de coinfection, cette approche présente néanmoins l'avantage d'exprimer la protéine d'intérêt à raison d'une copie par phage en moyenne, ce qui limite l'éventuelle altération des capacités d'infection du phage.

II.C-3. L'infection bactérienne

Le cycle de vie du bactériophage est divisé en trois phases : L'infection initiale, la réplication du génome phagique et la production de nouvelles particules virales.

1- La phase d'infection est initiée par la liaison de la protéine pIII du phage au pilus F d'*E.coli* (Figure II-6). Le pilus F est un tube protéiné à la surface d'*E.coli* qui permet le transfert de l'ADN phagique dans les bactéries. Ce processus est appelé la conjugaison (Lazzaroni *et al.*, 1999).

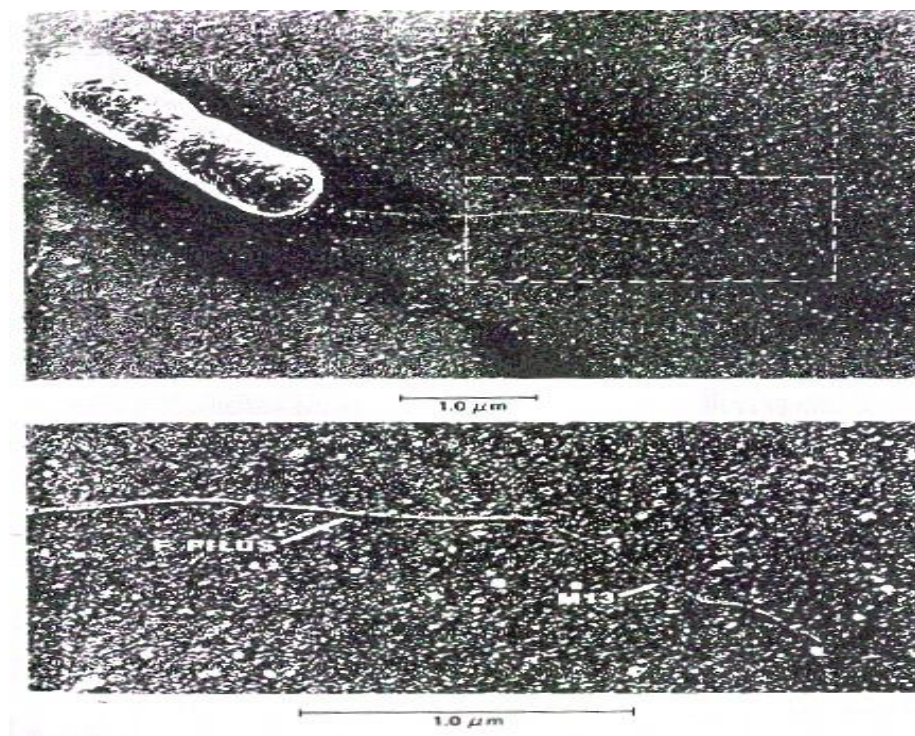


Figure II- 6: Infection d'une bactérie *E.coli* par un bactériophage filamenteux (M13) observée par microscopie électronique.
Source : Thèse Anne-Sophie Yribarren, 2003.

2- La phase de réplication du génome phagique commence une fois que l'ADN viral simple brin est introduit dans le cytoplasme bactérien. Cette étape est assurée par la machinerie enzymatique de l'hôte pour répliquer l'ADN phagique monocaténaire. Au fur et à mesure de leur expression, les protéines de structure et les protéines d'assemblage s'intègrent à la membrane cytoplasmique bactérienne.

3- La phase de production de nouvelles particules virales est divisée en trois étapes : initiation, élongation et terminaison.

- a- *L'initiation* : Les protéines pVII, pVIII et pIX interagissent avec le signal d'empaquetage afin d'assurer un assemblage efficace de l'ADN simple brin dans le phage.
- b- *L'élongation* : Cette phase est initiée par la protéine pV. Lorsque la concentration intra-bactérienne de pV atteint un seuil critique, des dimères de cette protéine se lient au plasmide viral monocaténaire nouvellement synthétisé, empêchant la synthèse du brin complémentaire.
- c- *La terminaison* : Cette étape correspond à l'encapsidation et la libération de nouvelles particules virales. Les protéines pV sont remplacées par les protéines

pVIII du manteau et les protéines d'assemblage pI et pIV assurent la formation d'un tunnel d'export à travers l'espace périplasmique bactérien pour la sécrétion de la particule phagique naissante dans le milieu extracellulaire (Barbas *et al.*, 2001).

La figure II-7 ci-après récapitule l'ensemble des étapes du processus d'infection.

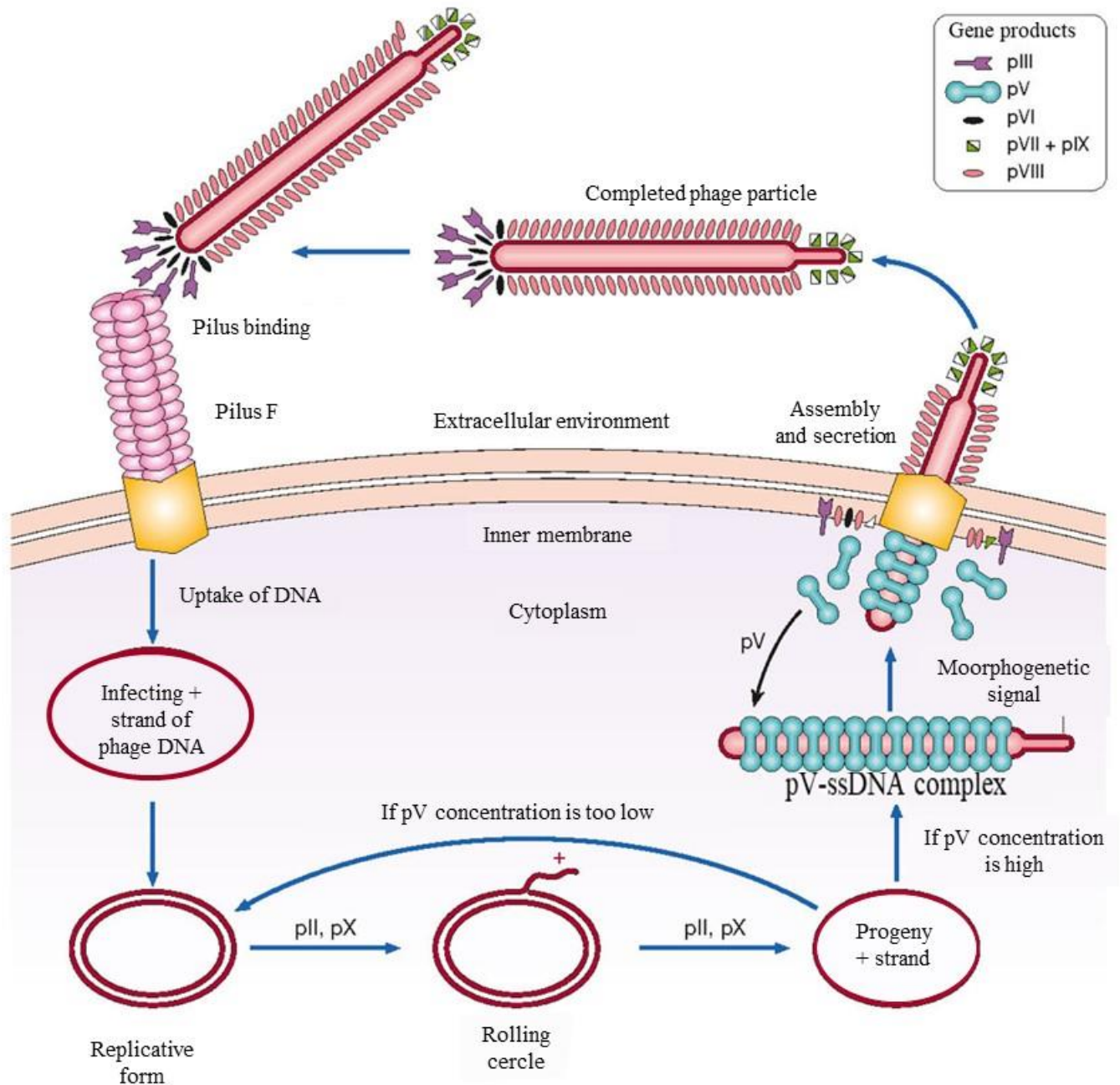


Figure II- 7: Représentation schématique du processus d'infection d'une bactérie *E. coli* par une particule virale filamenteuse M13. Inspirée de : Kehoe and Kay, 2005 et <http://slideplayer.com/slide/10599998/> consulté le 9-11-2017.

II.C-4. Construction de banques de phages d'anticorps

II.C-4.a - Principe général

Nous décrivons ici le principe de construction d'une banque de fragments d'anticorps de type scFv, mais le principe reste globalement le même quel que soit le format de l'anticorps choisi. Comme illustré sur la figure II-8, les ARNm sont dans un premier temps extraits des cellules B préalablement isolées, généralement à partir de la rate. Cet ARN est ensuite converti en ADNc par transcription inverse. Les ADNc codant pour les régions V_H et V_L sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces qui leur sont spécifiques. L'assemblage des V_H et V_L est assuré au moyen d'une PCR dite d'assemblage reposant sur des zones de séquences chevauchantes complémentaires, et l'ensemble est cloné dans un vecteur phagemide approprié, puis introduit dans *E. coli*. Enfin, les bactéries ainsi transformées sont infectées par le phage helper afin de permettre l'assemblage des phages exprimant les fragments scFv. Par la suite, les phages exprimant les scFv à leur surface seront sélectionnés pour leur reconnaissance spécifique de l'antigène étudié (Tohidkia *et al.*, 2012).

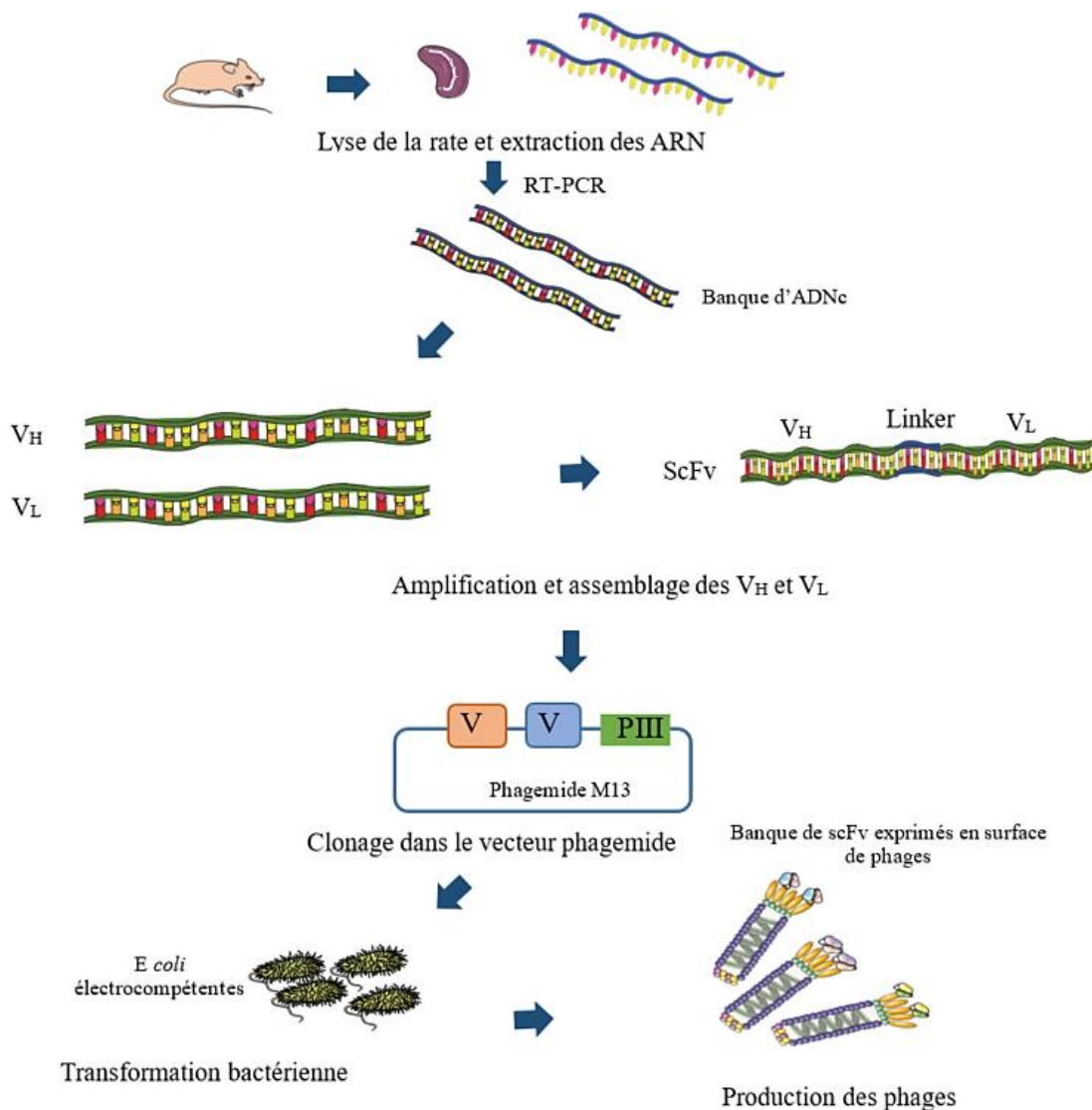


Figure II- 8: Principe général de construction d'une banque de scFv en surface de phages.

D'une manière générale, il existe trois types de banques d'anticorps, indépendamment du format de l'anticorps exposé : les banques naïves, les banques immunisées et les banques synthétiques. La différence fondamentale entre ces 3 types de banques consiste en l'origine des séquences utilisées pour construire la banque. (Ponsel *et al.*, 2011)

- Les banques naïves sont obtenues à partir d'un animal non immunisé préalablement, donc la production d'anticorps pour constituer cette banque est plus rapide que celle des autres types de banques. Les gènes d'anticorps clonés sont naturellement réarrangés et n'ont pas subi de maturation vis-à-vis d'un antigène en particulier. Cependant, les affinités de ces banques sont généralement plus faibles.
- Les banques immunisées sont créées à partir des cellules B provenant d'un individu (humain ou animal) préalablement immunisé par un immunogène. De ce fait, la taille de ces banques est relativement plus petite que les naïves, les gènes des anticorps clonés sont matures vis-à-vis de l'antigène, et la sélection clonale induite par l'immunisation a permis la prolifération de cellules B sécrétant des anticorps spécifiques de l'immunogène utilisé.
- Les banques synthétiques ou semi-synthétiques se caractérisent par une diversité des régions CDR obtenue de manière synthétique par mutagenèse dirigée ou aléatoire (Bradbury and Marks, 2004).

II.C-4.b- Cas de la banque utilisée dans le cadre de ce travail

Nous disposons dans notre laboratoire d'une banque de phages de scFv construite lors de travaux précédents (Shahsavarian *et al.*, 2014 ; Shahsavarian *et al.*, 2017). Celle-ci a été construite à partir de souris naïves et immunisées. Dans ce dernier cas, l'immunogène utilisé est la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) conjuguée au sulfone penam, choix justifié par un travail de thèse préalable n'ayant pas de lien direct avec l'étude présentée ici. Néanmoins, indépendamment de l'immunogène utilisé, cette banque reste une source de diversité au sein de laquelle il est possible de puiser des fragments d'anticorps spécifiques pour une cible identifiée. Lors de la construction de cette banque, deux souches murines distinctes ont été utilisées : (i) des souris *Balb/C*, illustrant un répertoire immunitaire sain, et (ii) des souris *SJL/J* susceptibles de développer une maladie auto-immune (l'EAE ou Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale) (Brown and McFarlin, 1981). Cette dernière souche de souris illustre donc un répertoire immunitaire auto-immun, dont la diversité attendue sera différente de celle du répertoire immunitaire sain. Cela permet *in fine* d'augmenter la diversité de la banque. La banque, ainsi construite à partir d'IgG, représente donc finalement quatre répertoires immuns différents, provenant de :

- Souris saines et naïves,
- Souris saines et immunisées,
- Souris sensibles à l'auto-immunité et naïves,
- Souris sensibles à l'auto-immunité et immunisées.

Selon le principe général évoqué préalablement (Figure II-8), l'ARN total a été isolé à partir des rates des différentes souris. Ensuite, deux PCR successives ont été effectuées. Les amorces ou *primers* de la première PCR ciblent du côté 5' le L-PART, une séquence signal *leader* relativement conservée des gènes de chacune des chaînes lourde et légère. Du côté 3', les

régions constantes des chaînes lourdes (γ) et légères (κ et λ) sont ciblées. La seconde PCR est qualifiée de PCR nichée ou *nested PCR*, et permet d'augmenter la spécificité de l'amplification. Les amorces utilisées visent cette fois-ci les FR1 et FR4 de chaque domaine (V_L et V_H) (Figure II-9). La conception de l'ensemble de ces amorces (1^{ère} et 2^{ème} PCR) s'est faite sur la base d'une analyse approfondie de l'ensemble des séquences d'anticorps référencées dans l'IMGT. Le mélange des amorces utilisées regroupe de ce fait une très large variété de séquences (plus de 300 amorces distinctes pour la 1^{ère} PCR, et plus de 500 pour la PCR nichée) afin de récupérer la plus large diversité possible d'immunoglobulines. Cette diversité a par ailleurs été validée par une approche de séquençage NGS lors de travaux réalisés dans une thèse en cours au sein de notre équipe.

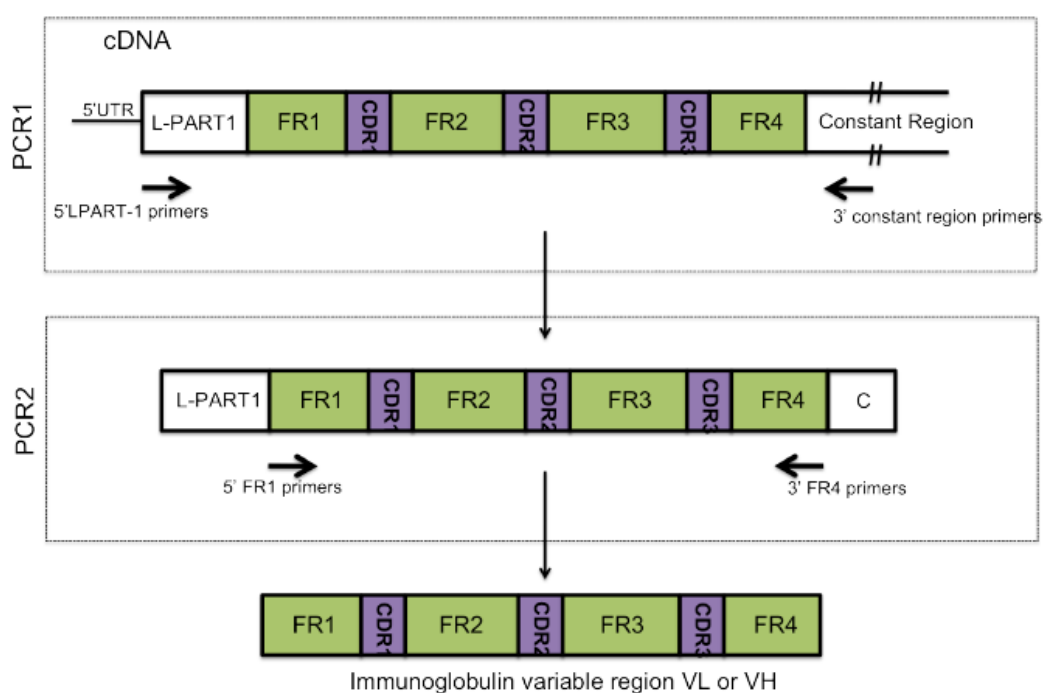


Figure II-9: Stratégie des 2 PCR successives effectuées pour l'amplification des V_L et V_H lors de la construction des banques en surface de phages. Source : Thèse Melody Shahsavarian, 2015.

Enfin, pour l'obtention des scFv, les V_H et V_L sont assemblées grâce à la SOE-PCR (*Single Overlap Extension Polymerase Chain Reaction*) par l'intermédiaire de zones chevauchantes du linker introduites par les amorces de l'amplification précédente. Ces fragments sont ensuite clonés dans les vecteurs de phagemides, transformés dans *E. coli* et enfin exprimés à la surface du phage.

Finalement, les quatre sous-banques ont été rassemblées pour former une large banque unique contenant 2.7×10^9 séquences différentes (Shahsavarian *et al.*, 2017).

II.C-5. Procédure de sélection de scFv spécifiques

Le principe général d'une sélection par phage display, récapitulé dans la figure II-10 ci-après, est le suivant (Bratkovic, 2010) : les phages de la banque sont mis au contact de la cible immobilisée sur un support solide (microplaques, billes...). Les phages non-spécifiques sont

éliminés par une série de lavages, tandis que les phages retenus sur la cible sont élués. Les phages élués sont alors amplifiés par infection bactérienne et soumis de nouveau à un cycle de sélection. Plusieurs cycles successifs sont réalisés, en augmentant éventuellement la pression de sélection ou en alternant avec des cycles de sélection négative. Dans ce dernier cas, le but est de discriminer des phages reconnaissant le support solide ou la protéine porteuse éventuellement utilisée, des phages reconnaissant effectivement la cible identifiée. Il s'agit alors de procéder à un tour de sélection contre le support ou la protéine porteuse seule. Seuls les phages non retenus sont alors récupérés. En moyenne, 4 à 6 cycles de sélection sont nécessaires pour permettre l'isolement de fragments d'anticorps spécifiques d'une cible.

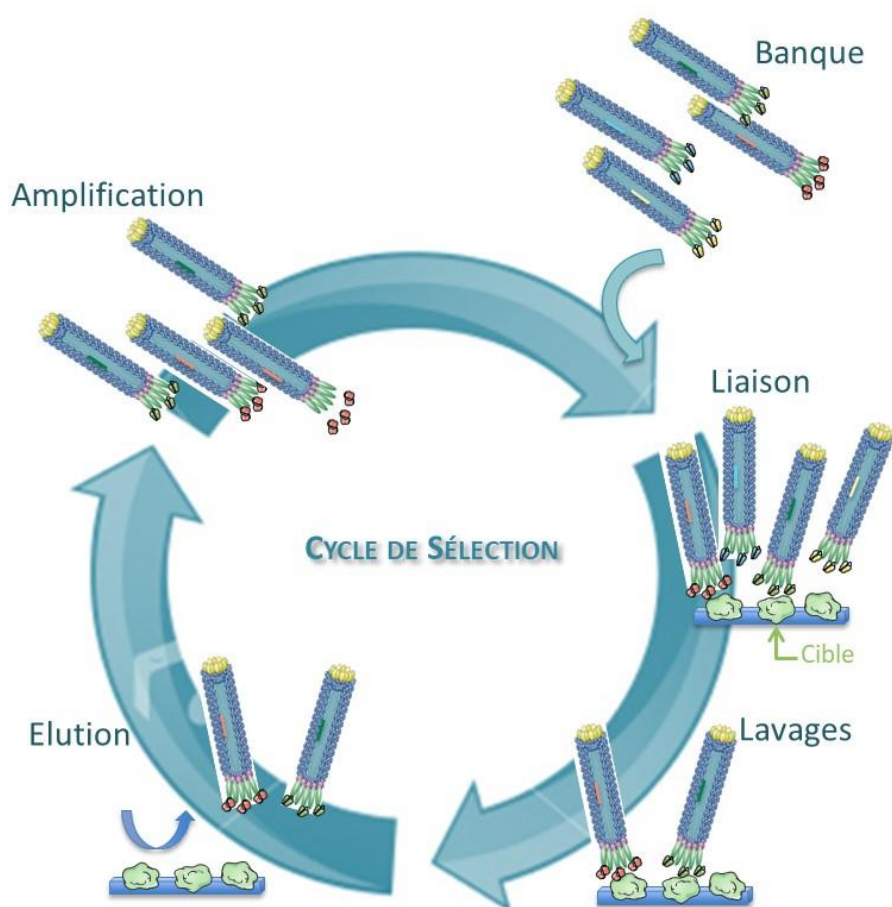


Figure II- 10: Principe de sélection par Phage Display.

II.D- Détection de la microcystine LR

Comme énoncé dans le premier chapitre, les microcystines constituent actuellement un risque majeur pour la santé humaine sur plusieurs sites géographiques de différents pays. La mise au point de nouveaux moyens de détection de cette toxine apparaît donc comme essentielle. Aujourd'hui, malgré un vrai besoin, peu d'anticorps contre la microcystine-LR existent sur le marché. Le tableau II-3 en reflète quelques exemples.

Tableau II- 3 : Anticorps commerciaux contre la microcystine-LR.

Anticorps / Clone	Isotype	Limite de détection	IC ₅₀	Société (s)
MC10E7	IgG1	0.006 µg/L	0.06 µg/L	Enzo
C64A1	IgG1	nd	nd	Abcam, Hytest
AD4G2	IgG1	0.07 µg/L	0.33 µg/L	Enzo
C64C12	IgG1	nd	nd	Abnova
B762M	IgG1	nd	nd	Acris, Biorbyt, Meridian

nd = non disponible. Inspiré de Weller, 2013.

Les clones MC10E7 et AD4G2 sont parmi les anticorps monoclonaux les plus utilisés pour la détection de MC-LR. En effet, ces deux clones sont proposés dans plusieurs kits ELISA du fait de leur haute spécificité vis-à-vis de la MC-LR. Le clone MC10E7 reconnaît les microcystines ayant une arginine en position 4. Sa constante de dissociation à l'équilibre (K_D) est de l'ordre de $0,14 \cdot 10^{-10}$ M et la limite de détection, dans les tests les plus sensibles développés, est de 6 ng/L (Zeck *et al.*, 2001-A). Le clone AD4G2 est quant à lui capable de reconnaître le motif ADDA commun à toutes les microcystines. La limite de détection de la MC-LR par cet anticorps est de 0.07 µg/L et son K_D n'a pas été déterminé (Zeck *et al.*, 2001-B). Il est important de signaler que la limite de détection de ces deux anticorps est inférieure à celle préconisée par l'OMS, à savoir 1 µg/L. Cependant, le clone AD4G2 a été retiré du marché pour une raison inexplicée, peut-être par suite de la perte du clone due à une instabilité. Ce problème est assez fréquemment rencontré avec les hybridomes, et, contrairement aux recommandations générales, la séquence de l'anticorps AD4G2 n'a jamais été publiée (Bradbury and Plückthun, 2015).

Si la plupart des anticorps dirigés contre les microcystines sont des anticorps entiers, quelques fragments d'anticorps, en particulier des scFv, ont également été produits. Ces derniers présentent l'avantage d'être plus faciles à produire et puisque leur séquence est connue, il est possible d'envisager leur manipulation ou modulation de leur spécificité ou affinité par mutagenèse aléatoire et technique du phage display. Cependant, il a été montré une réaction croisée avec plusieurs types de microcystines, réduisant leurs potentielles applications (Weller, 2013). Le tableau II-4 présente une liste non exhaustive de quelques scFv reconnaissant la microcystine LR.

Tableau II- 4: scFv reconnaissant la MC-LR.

Références	Limite de détection	Réaction croisée	IC ₅₀
McElhiney <i>et al.</i> , 2002	0,02 µg/mL	MC-RR, Nodularin, MC-LW et MC-LF	0,123 µg/mL
Murphy <i>et al.</i> , 2015	0,19.10 ⁻³ µg/mL	MC-YR, MC-LA, MC-LF, MC-LW, MC-RR et Nodularine.	4,8.10 ⁻³ µg/mL
Zhang <i>et al.</i> , 2016	0,13.10 ⁻³ µg/mL	Légère réaction croisée (< 3%) MC-RR, -YR, MC-LW, MC-LF, MC-LA, MC-LY et MC-WR-	0,81 .10 ⁻³ µg/mL

Les scFv sont des molécules présentant de nombreux avantages par rapport aux anticorps monoclonaux. Leur synthèse présente un intérêt à la fois économique et éthique. Leur format s'adapte bien à la technologie du *phage display* pour sélectionner les scFv les plus intéressants. Il est ensuite possible de récupérer la séquence du scFv d'intérêt afin de le cloner sous n'importe quel type de format (Fab ou anticorps entier par exemple). Enfin, ils ouvrent la voie de l'ingénierie des anticorps avec la possibilité de réaliser des mutations rationnelles pour améliorer l'affinité ou moduler la spécificité. Ils constituent donc un outil d'intérêt pour diverses applications, en particulier pour les techniques de détection. Comme évoqué précédemment (chap II.C-4.b), nous disposons au sein de notre laboratoire d'une banque de scFv dont la diversité et la fonctionnalité ont été validées, et qui a déjà été utilisée avec succès pour la sélection de scFv catalytiques présentant une activité β -lactamase (Shahsavarian *et al.*, 2017). Le présent travail vise donc à sélectionner, à partir de cette même banque, des fragments d'anticorps contre la MC-LR qui pourront être utilisés comme nouveaux outils pour le développement des techniques de détection contre cette toxine.

III

Vers la sélection d'anticorps ou fragments d'anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR

A- Préparation de la cible

B- Préparation d'anticorps monoclonaux par la technologie des hybridomes

C- Sélection par Phage Display de scFv dirigés contre la MC-LR

Les tests d'immunodétection apparaissent actuellement comme les méthodes les plus adaptées pour le dépistage rapide des microcystines en raison de leur sensibilité, leur spécificité et de leur facilité d'utilisation (Zhang *et al.*, 2016 ; Pérez-Schirmer *et al.*, 2017). Ces tests se fondent sur la reconnaissance antigène-anticorps, l'antigène étant la MC. La fiabilité de ces tests dépend principalement de la spécificité et de l'affinité des anticorps utilisés vis-à-vis de la MC. L'objectif de notre étude étant la production de nouveaux fragments d'anticorps sous un format scFv, dirigés contre la MC-LR, la sélection s'effectuera à partir de la banque de scFv déjà élaborée et évoquée dans le chapitre précédent (II.C-4-b).

Néanmoins, l'exploitation de la technologie du phage display pour la sélection d'entités interagissant contre des cibles de petite taille est une approche complexe à maîtriser, comme évoqué dans la littérature (Van Dorst *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2016). Cela peut s'expliquer par le fait que les petites molécules sont difficiles à immobiliser et ont peu d'épitopes disponibles, conduisant à une faible interaction avec les protéines en surface de phages (Zhao *et al.*, 2004). Face à ce risque et pour pallier à de potentielles futures difficultés, une approche plus traditionnelle par la technologie des hybridomes a également été développée afin d'isoler un anticorps contre la MC-LR. Qu'il s'agisse de produire des anticorps monoclonaux par la technologie des hybridomes, ou de sélectionner des scFv par *phage display*, une première étape commune de préparation de l'immunogène ou de la cible est requise. Le chapitre suivant vise donc à décrire cette première étape.

III.A- Préparation de la cible

La MC-LR est un peptide non immunogène de faible masse moléculaire (995.2 Da). Que ce soit pour l'immunisation des souris pour l'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre la MC-LR par la technologie des hybridomes, ou que ce soit en vue de l'immobilisation de la cible sur un support solide, prérequis nécessaire au processus de sélection par phage display, il est nécessaire que la microcistine soit couplée à une protéine porteuse.

III.A-1. Validation de la qualité de la MC-LR

Dans un premier temps, la vérification de la qualité de la MC-LR fournie commercialement a été réalisée. Dans ce but, une HPLC et une spectrométrie de masse ont été effectuées. La chromatographie liquide combinée à la spectrométrie de masse offre en effet une analyse de grande sensibilité dans la détection et l'identification des constituants de la solution de MC-LR utilisée par la suite pour le couplage avec la protéine porteuse.

Les principaux chromophores de la MC-LR sont (i) le résidu ADDA et (ii) le groupe carboxylé insaturé dans la N-méthyl-déshydroalanine, tous deux absorbant fortement à 238 nm (Meriluotto and Codd, 2005). L'analyse HPLC de la MC-LR permet d'observer 2 pics différents à 4.79 et 7.78 minutes (Figure III-1.A). L'identification de la nature des molécules contenues dans chaque pic a ensuite été déterminée par spectrométrie de masse (Figures III-1.B et C). Le pic obtenu dans la figure III-1.B confirme la taille attendue de la MC-LR à 995.2 Da, tandis que le 2^{ème} pic, dont l'analyse est représentée dans la figure III-1.C, montre des fragments d'ions provenant des esters de phthalate issus des tubes d'échantillonnage utilisés. Dans la figure III-1.B on observe 2 pics : Le premier à 352.33 Da dû à des impuretés liées au solvant ou à l'échantillon, et le second à 498.27 Da qui présente la m/z de la [MC-LR+2H]⁺⁺ de l'ion dichargé de la molécule. Ces résultats confirment la pureté de la MC-LR commerciale. Ce travail a été effectué en collaboration avec Mr Franck Merlier, responsable de la plateforme de spectrométrie de masse au sein de l'UMR7025.

Vers la sélection d'anticorps ou fragments d'anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR

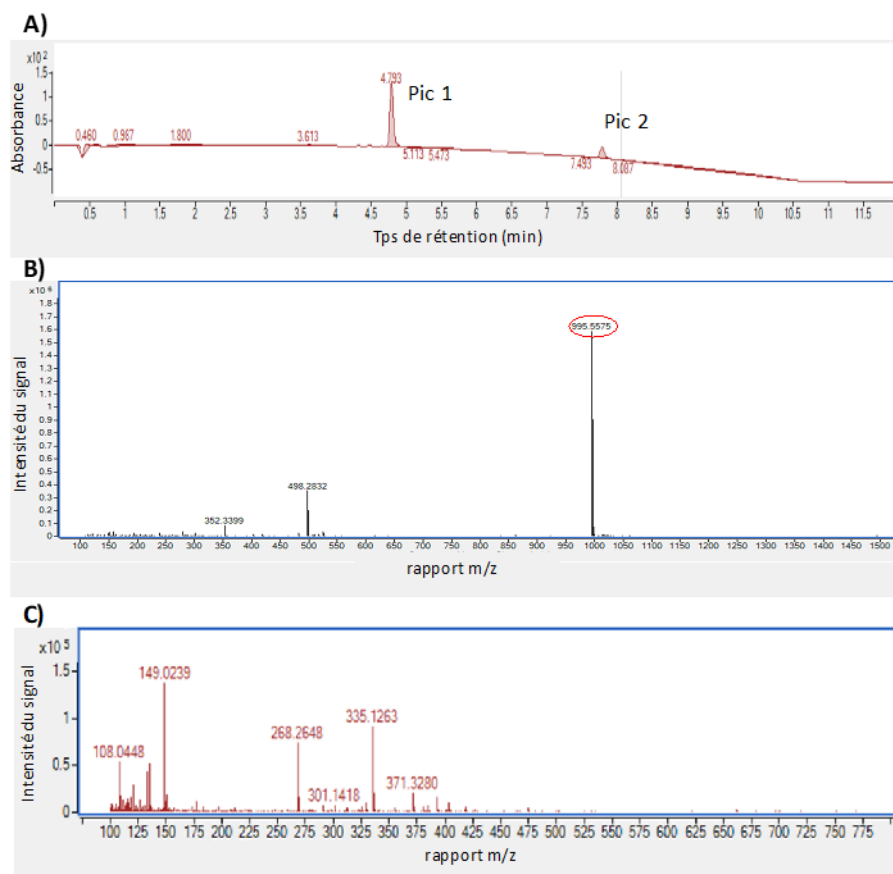


Figure III- 1: Analyse de la qualité de la Microcystine-LR commerciale. A) : Analyse par HPLC (colonne C18 Sigma, 50x 2.1 mm, particule 1.9 μ m) ; B) : Spectre de masse réalisé sur le pic 1 ; C) : Spectre de masse réalisé sur le pic 2.

III.A-2. Conjugaison de la MC-LR aux protéines porteuses ou *carrier proteins*

Les protéines porteuses sont des protéines dont la taille est suffisamment élevée pour stimuler une réponse immunitaire lors de leur injection. Elles sont utilisées pour être couplées à des antigènes de petite taille appelés haptènes afin d'induire la production d'anticorps spécifiques de l'haptène, ou encore pour favoriser l'adsorption de ce dernier sur un support d'immobilisation (dans le cas présent, la plaque de 96 puits).

Les principales protéines porteuses couplées à la MC-LR sont l'ovalbumine (OVA) et la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Le couplage est médié par de l'EDC (1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide hydrochloride). L'EDC est un agent de conjugaison qui active les groupements carboxyliques pour la liaison d'amines primaires, permettant ainsi le couplage entre la protéine porteuse et l'haptène. Son action sur les groupements carboxyliques induit la formation d'un intermédiaire (l'ester actif O-acyliso-urée) réagissant à son tour rapidement avec un groupement amine pour former une liaison amide et libérer un produit secondaire, l'iso-urée (Figure III-2). Comme illustré en figure III-3.A dans le paragraphe suivant, la MC-LR possède 3 possibilités de se lier à l'ovalbumine via l'EDC.

Vers la sélection d'anticorps ou fragments d'anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR

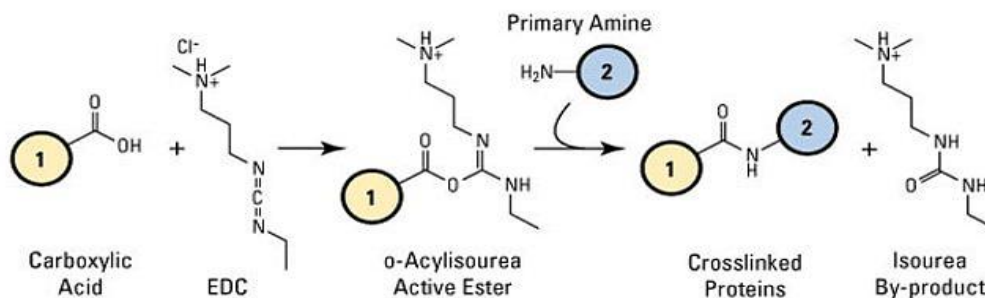


Figure III- 2: Réaction de conjugaison par l'intermédiaire de l'EDC. Les molécules (1) et (2) peuvent être des peptides ou protéines ayant des groupements carboxyles et amines primaires respectifs. Pierce™ EDC Crosslinker, Thermo Scientific.

D'autres protéines porteuses comme la BSA (pour *bovine serum albumin*) et de procédés de couplage ont été utilisés dans la littérature comme la NHS (N-hydroxysuccinimide) (Zeck *et al.*, 2001-B) et le glutaraldéhyde (McElhiney *et al.*, 2002).

III.A-3. Conjugaison de la MC-LR à l'Ovalbumine (OVA)

L'ovalbumine est la protéine majoritaire du blanc d'œuf. Sa taille et sa structure la rendent particulièrement utile comme support pour les peptides peu immunogènes et/ou difficiles à manipuler dans des essais de criblage typiques tels que le test ELISA. En effet, l'ovalbumine contient de nombreuses amines primaires et des groupes carboxyles qui peuvent être ciblés pour la conjugaison avec l'haptène via l'EDC (figure III-3.B). Cette protéine de 45 kDa, possède 20 lysines présentant des groupements amine primaire libres, ainsi que 14 acides aspartiques et 33 acides glutamiques présentant des groupements carboxyliques. En admettant que chaque site soit effectivement accessible, chaque molécule d'ovalbumine serait donc susceptible de se lier à 67 MC-LR. Les conditions précises de couplage sont indiquées en Annexe I-1.

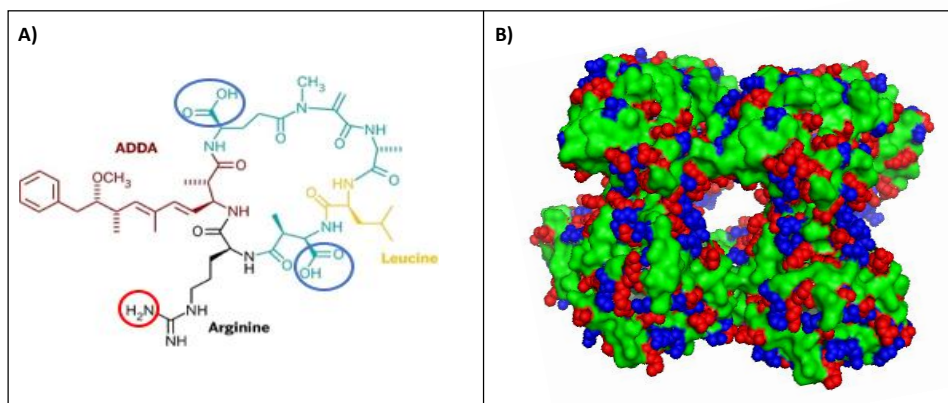


Figure III- 3: Sites de liaison respectifs sur la MC-LR et l'ovalbumine. A) : Structure de la MC-LR. Les sites de liaisons à une protéine carrier sont mis en évidence : les groupements carboxyliques sont entourés en bleu et le groupement amine en rouge. B) : Représentation tridimensionnelle de l'ovalbumine. Les groupements carboxyliques sont représentés en bleu et les groupements amines en rouge.

III.A-4. Vérification de la conjugaison

Trois approches ont été adoptées afin d'évaluer la qualité du couplage de la MC-LR à l'OVA : Un test ELISA ; une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou SDS-PAGE et un Western Blot.

Vers la sélection d'anticorps ou fragments d'anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR

Les quantifications de protéines, couplées ou non, sont systématiquement réalisées par un test de dosage à l'Acide Bicinchoninique (BCA) (cf Annexes I-2).

III.A-4.a- Vérification du couplage par ELISA

Comme illustré en figure III-4, le test ELISA développé pour valider le couplage vise à comparer la reconnaissance par l'anticorps monoclonal commercial AD4G2 de l'OVA-MC avec celle de l'OVA non conjuguée. La révélation de ce complexe est assurée par un anticorps secondaire couplé à la HRP. Les conditions précises de cette expérience sont rappelées en Annexe I-3.

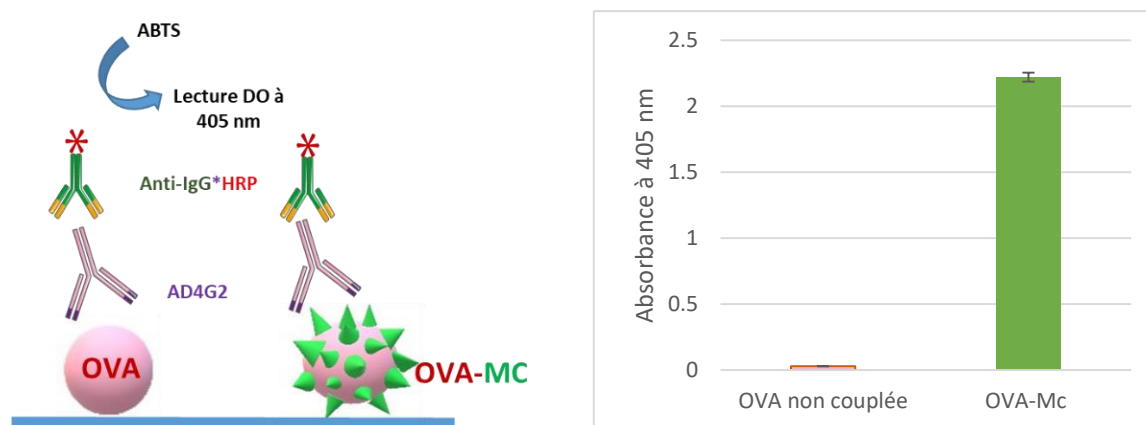


Figure III- 4: Test ELISA vérifiant le couplage de la MC-LR à l'ovalbumine. A) : schéma du format utilisé. B) : Résultat du test ELISA.

Les résultats présentés en figure III-4 confirment non seulement le couplage de la MC-LR sur l'OVA, mais suggèrent également que la MC-LR une fois conjuguée à l'OVA est toujours accessible à l'anticorps, validant ainsi la future utilisation de ce format pour le criblage des hybridomes ou la sélection des phages.

III.A-4.b- Vérification du couplage par SDS-PAGE

La migration sur gel de polyacrylamide permet de comparer les profils de l'ovalbumine avant et après la conjugaison à la MC-LR. Les conditions précises de cette expérience sont indiquées en Annexe I-4. La figure III-5 montre 3 bandes distinctes pour l'ovalbumine non conjuguée (pistes 3 et 4) : 2 bandes proches de 37 kDa et la 3^{ème} à 75 kDa. Le profil de migration de l'OVA-MC se caractérise en revanche par une bande diffuse qui remplace les 2 bandes clairement séparées, proches de 37 kDa (pistes 1 et 2).

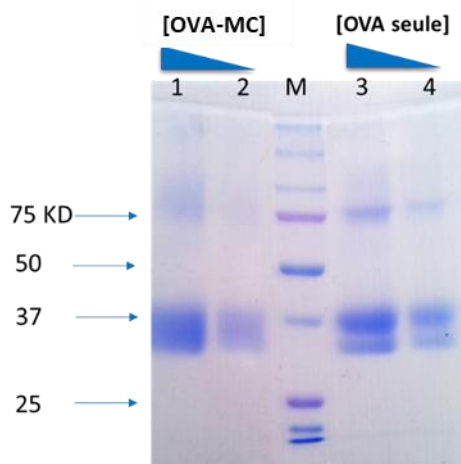


Figure III- 5: Vérification du couplage de la MC à l'OVA par électrophorèse SDS PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie.

M : Marqueur de poids moléculaire. Puits 1 et 2 : OVA-MC à 577 et 288 $\mu\text{g/ml}$. Puits 3 et 4 : OVA non conjuguée à 577 et 288 $\mu\text{g/ml}$.

La faible taille de la MC-LR, associée au fait que seuls quelques sites de fixation potentielle vont effectivement se lier à la MC-LR, peut expliquer l'absence de changement de taille de l'OVA seule *versus* OVA-MC. En revanche, l'apparition de la bande diffuse ou trainée caractéristique après couplage à la MC-LR suggère un couplage de quantités hétérogènes à la surface de l'ovalbumine. Une caractérisation par Western Blot doit permettre de confirmer cette hypothèse.

III.A-4.c- Vérification du couplage par Western Blot

Une analyse par Western Blot a permis de confirmer le couplage de la MC à l'ovalbumine. L'OVA seule et l'OVA-MC ont été soumis à une migration électrophorétique, suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose. Après incubation avec l'anticorps commercial AD4G2 spécifique de la MC-LR, la révélation des immun complexes est assurée par un anticorps secondaire couplé à la HRP. Les conditions précises de cette expérience sont indiquées en Annexe I-5. Les résultats obtenus et présentés en figure III-6 confirment le couplage entre la MC-LR et l'OVA.

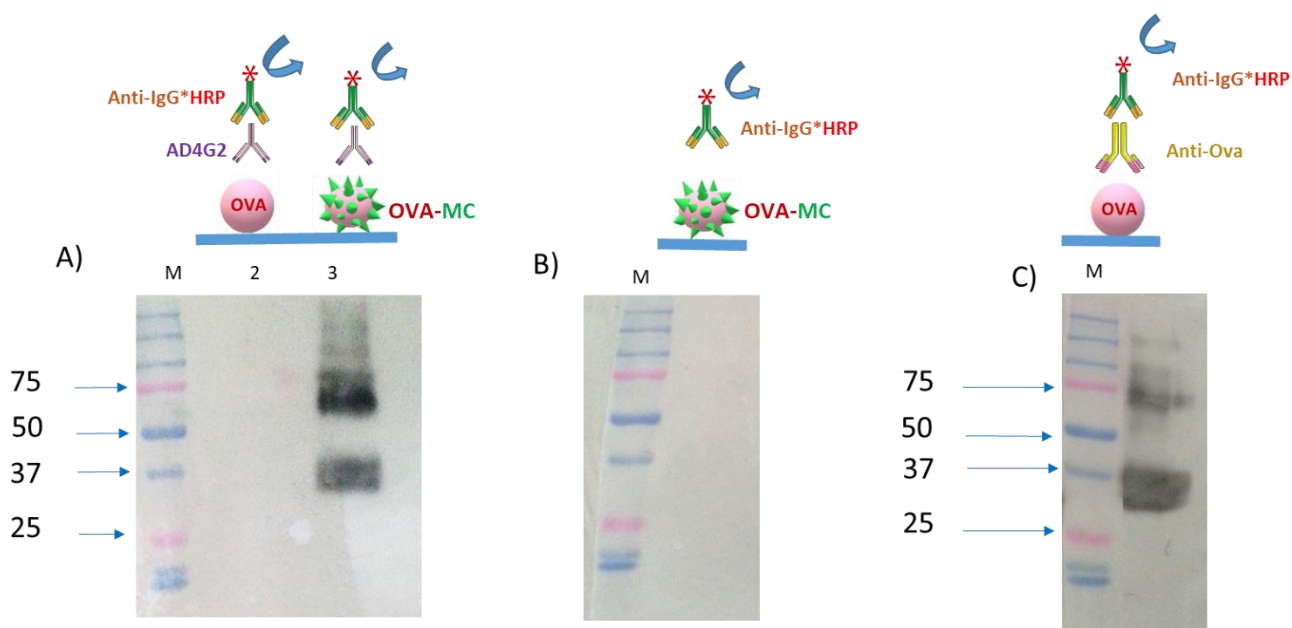


Figure III- 6: Analyse par Western Blot du couplage de la MC-LR à l'ovalbumine. A) : Test de la reconnaissance de l'OVA non conjuguée ou de l'OVA-MC par AD4G2. B) Témoin négatif. C) : Témoin positif. Pour chaque WB, M : Marqueur de poids moléculaire Dual Color, Biorad.

III.A-5. Conjugaison de la MC-LR à la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*)

La KLH est produite à partir de certaines populations du mollusque *Megathura crenulata*. Grâce à sa structure oligomérique, de la séquence de ses sous-unités très éloignée de celle des protéines de mammifère et sa masse moléculaire élevée (350 à 400 kDa), la KLH provoque vraisemblablement une réponse immunitaire plus importante que l'ovalbumine préalablement mentionnée (Harris and Markl, 1999). Elle est de ce fait largement utilisée comme protéine porteuse pour la conjugaison aux haptènes.

La KLH possède 7 732 groupements carboxyliques et 10 732 groupements amines primaires, assurant une quantité maximale théorique de 18 464 sites d'accrochage pour la MC-LR (selon les indications du fournisseur : Thermofisher scientific) (Figure III-7.A). Néanmoins, tout comme pour l'ovalbumine, tous ces sites ne sont pas accessibles. Les conditions précises de couplage sont indiquées en Annexe I-1.

III.A-6. Vérification de la conjugaison

La validation du couplage de la MC-LR à la KLH a été menée par ELISA et Western Blot. La simple analyse par SDS-PAGE n'apporte pas ici de résultat pertinent car la masse moléculaire élevée de la KLH limite la migration de la protéine au sein du gel d'acrylamide 10 %.

III.A-6.a- Vérification du couplage par ELISA

Le principe de l'ELISA est similaire à l'approche développée préalablement pour l'OVA-MC. Les conditions expérimentales précises sont détaillées en Annexe I-3. Les figures III-7.B et C confirment le couplage de la MC-LR à la KLH, ainsi que l'accessibilité de la MC-LR une fois liée covalamment à la KLH. Une fois encore, ce contrôle permet de valider le format expérimental qui sera utilisé par la suite, aussi bien pour le criblage des hybridomes que pour la sélection des phages exprimant les scFv spécifiques à la MC.

III.A-6.b- Vérification du couplage par Western Blot

L'analyse par Western Blot a là encore été réalisée selon un principe similaire à ce qui a été mis au point pour l'ovalbumine. Les conditions précises de cette expérience sont indiquées en Annexe I-5. Les résultats obtenus et présentés en figure III-7.D et E valident le couplage entre la MC-LR et la KLH.

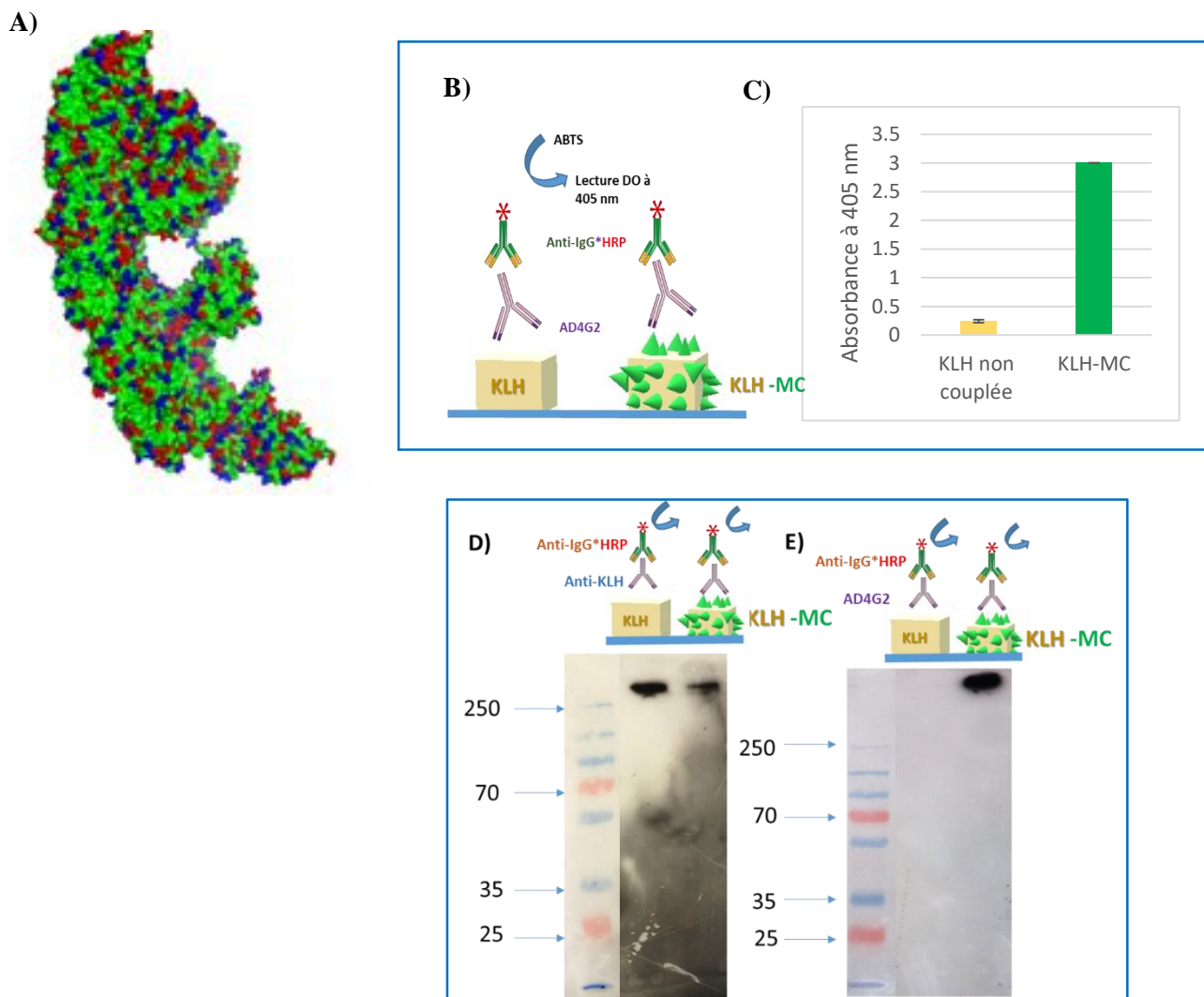


Figure III- 7: Représentation d'une sous-unité de KLH et tests de vérification de son couplage à la MC-LR.

A) Représentation tridimensionnelle d'une sous-unité de KLH. Les groupements carboxyliques sont représentés en bleu et les groupements amines en rouge.

B) et C) respectivement schéma du format utilisé dans le test ELISA et résultat du test vérifiant le couplage de la MC-LR à la KLH.

D) et E) Analyse par Western Blot du couplage de la MC-LR à la KLH. D) Témoins positifs représentant la reconnaissance de la KLH non conjuguée ou de l'KLH-MC par l'anti-KLH. E) Reconnaissance de la KLH non conjuguée (témoin négatif) ou de l'KLH-MC ou test par l'AD4G2. Pour chaque WB, M : Marqueur de poids moléculaire Dual Color, Biorad.

III.B- Préparation d'anticorps monoclonaux par la technologie des hybridomes

Comme déjà décrit dans le chapitre précédent (II-B.2), la première étape propre à la technologie des hybridomes concerne l'immunisation des souris. La difficulté et le risque inhérent à cette approche dans le cas de l'obtention d'anticorps monoclonaux contre la microcystine reposent donc sur le fait que cette dernière n'est pas immunogène. Pour surmonter cette limitation, des souris SWISS ont été immunisées par voie sous-cutanée avec de la MC-LR conjuguée à la KLH. Quinze jours plus tard, les rates de souris ont été collectées et les cellules spléniques isolées puis fusionnées avec des cellules de myélome SP2/0 pour la génération d'hybridomes. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Dr Larissa Alvarenga au laboratoire d'immunochimie, département de pathologie fondamentale à l'Université Fédérale de Parana, à Curitiba au Brésil. Les conditions expérimentales sont détaillées en Annexe I-6.

A l'issue du sous-clonage et d'un criblage adapté des surnageants de culture par ELISA, deux anticorps monoclonaux ont été retenus et produits par voie ascitique. Ils nous ont été transmis par l'équipe brésilienne pour une caractérisation plus fine. Un surnageant des anticorps polyclonaux obtenu avant l'étape de sous-clonage par dilutions limites nous a également été fourni afin de servir de témoin positif. Le titre des anticorps mesuré est de 1/20 000, ce qui confirme que la stratégie d'immunisation avec l'haptène a été réalisée avec succès. Les résultats présentés en figure III-8 confirment la présence, au sein du surnageant d'anticorps polyclonaux, d'anticorps susceptibles de reconnaître spécifiquement l'OVA-MC par comparaison avec l'OVA seule. Enfin, la fonctionnalité de deux clones isolés, nommés respectivement E1 et E4, a été analysée par ELISA (figure III-8). Contrairement aux résultats obtenus sur les anticorps polyclonaux, ceux obtenus avec les produits d'ascites correspondant aux clones E1 et E4 ne permettent pas de mettre en évidence une réactivité spécifique quelle que soit la dilution des échantillons. Il est vraisemblable que les clones sélectionnés n'étaient pas stables et ont perdu la capacité à produire l'anticorps. Un autre criblage sera nécessaire dans le futur en repartant des clones non sous-clonés, mais ce travail long et fastidieux est en cours et ne sera pas présenté dans le présent manuscrit.

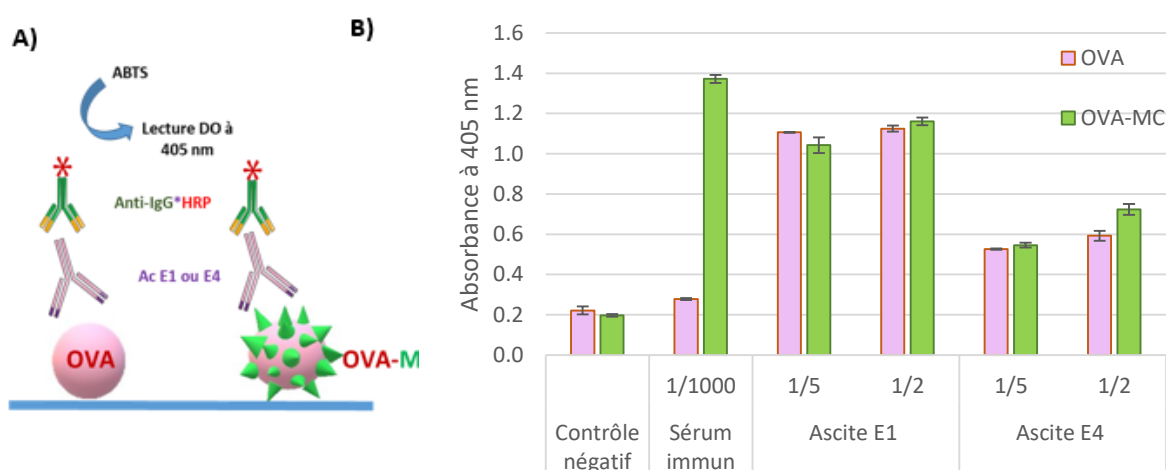


Figure III- 8: Test ELISA de reconnaissance de l'OVA-MC par les anticorps issus de la technologie des hybridomes. A) : Schéma du format du test utilisé. B) : Résultats obtenus avec les différents échantillons. Le témoin négatif correspond à un contrôle de non reconnaissance de la cible par l'anticorps secondaire. Les anticorps polyclonaux utilisés sont ceux issus de la technologie des hybridomes avant l'étape de clonage par dilutions limites.

III.C- Sélection par Phage Display de scFv dirigés contre la MC-LR

L'objectif de ce travail est la sélection de scFv spécifiques de la MC-LR au sein d'une banque décrite préalablement (chapitre II.C-4.b), dont la taille est de 2.7×10^9 séquences. L'optimisation des conditions de sélection est primordiale car chaque sélection de phage display est unique en fonction de la nature de la cible, de la diversité de la banque de phages, et bien sûr des conditions expérimentales. Comme mentionné au chapitre II.C.5, la procédure de sélection se déroule en plusieurs tours successifs afin d'enrichir la population de phages élués en phages spécifiques de la MC-LR. Deux stratégies de sélection distinctes ont été développées.

III.C-1. 1^{ère} stratégie de sélection : SOM

Dans cette première stratégie relativement classique, 5 cycles de sélection successifs ont été réalisés, tous contre l'OVA-MC directement immobilisée au fond de la microplaque. Le principe général est illustré en figure III-9. Les 3 premiers cycles sont qualifiés de sélection positive, les phages reconnaissant l'OVA-MC immobilisée au fond de la microplaque étant conservés. Au cours du quatrième cycle, une pression de sélection est exercée en réduisant la quantité de phages mis en contact avec la cible de $5 \cdot 10^{12}$ à $5 \cdot 10^{11}$ phages. Enfin, un cinquième cycle de sélection dite négative est appliqué. Ce dernier a pour objectif de distinguer les phages spécifiques à la MC-LR, de ceux spécifiques à l'OVA seule. L'OVA seule est alors immobilisée au fond de la plaque, et ce sont les phages non retenus qui sont cette fois-ci récupérés. Cela permet en principe d'éliminer les phages reconnaissant fortement l'ovalbumine seule. Pour chaque cycle de cette première stratégie de sélection, l'élué est réalisé à l'aide d'un tampon acide (Glycine-HCl 0.1M, pH 2.2).

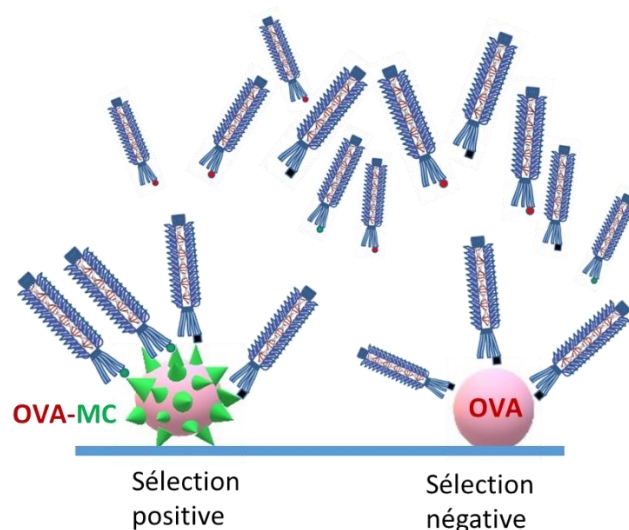


Figure III- 9: Principe des tours de sélection positive et négative effectués lors de la 1^{ère} stratégie de sélection.

Le tableau III-1 récapitule les conditions de sélection mises en œuvre lors des 5 tours de cette première stratégie de sélection. Les conditions expérimentales sont détaillées en annexe I-7.

Après chaque cycle, les phages élués sont titrés (Annexe I-7.d). L'enrichissement global en phages retenus par rapport à la quantité de phages infectieux initiale utilisée en début de sélection est déterminé par le ratio suivant :

$$\text{Enrichissement} = \frac{\text{Titre en phages élués}}{\text{Titre en phages initiaux}} \times 100$$

Vers la sélection d'anticorps ou fragments d'anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR

La figure III-10 présente l'évolution de cet enrichissement au cours des cycles de sélection menés.

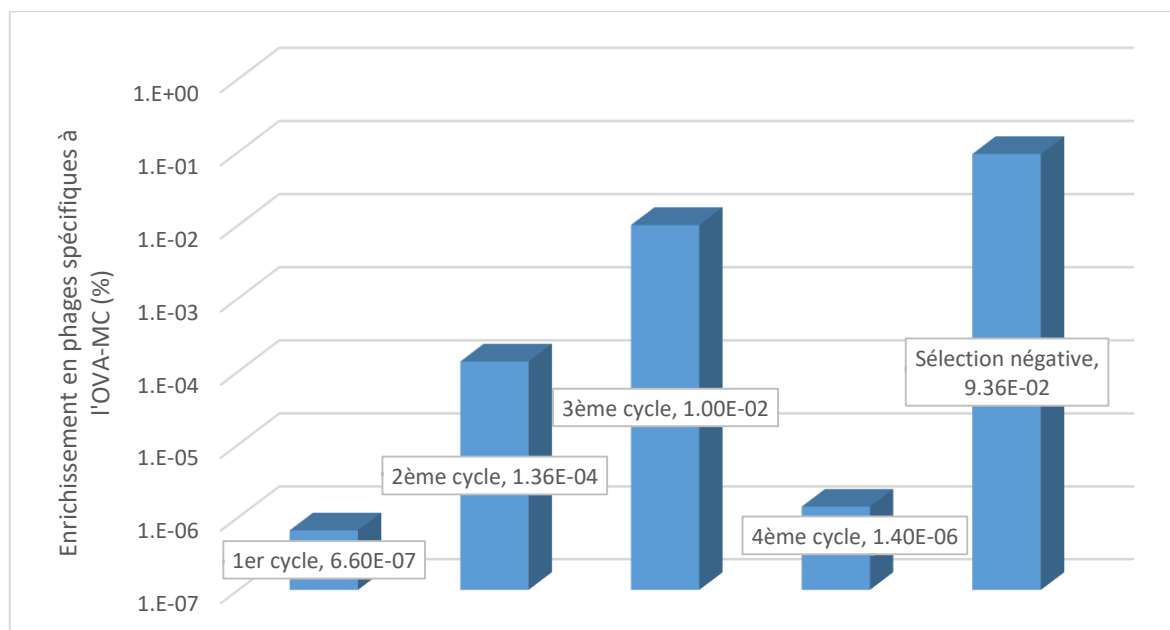


Figure III- 10: Enrichissement de la banque en phages porteurs de scFv spécifiques de l'OVA-MC après chaque tour de sélection, en appliquant la 1^{ère} stratégie de sélection.

Le graphique suggère qu'au cours des trois premiers cycles de sélection, un enrichissement progressif et significatif en phages d'intérêt a eu lieu. Ensuite, lors du 4^{ème} cycle, au cours duquel une pression de sélection a été effectuée, le taux de phages a chuté d'un facteur de l'ordre de 7000, permettant en principe de ne retenir que les phages les plus affins. Enfin, le dernier cycle de sélection permet de restaurer un taux élevé de phages reconnaissant l'OVA-MC. Le taux d'enrichissement suit donc une évolution classique, similaire à ce que nous avons observé par le passé au sein de notre équipe lors de travaux précédents (Thèses Anne-Sophie Yribarren, 2003 ; Emilie Queffeuilou, 2011 et Melody Shamsavarian, 2015).

Cette première stratégie est appelée SOM pour désigner la « Sélection contre l'OVA-MC ».

III.C-2. 2^{ème} stratégie de sélection : SOK

Afin d'optimiser nos chances d'obtenir un, voire plusieurs, scFv susceptibles de reconnaître la MC-LR, une deuxième stratégie de sélection a été mise au point. Celle-ci est moins conventionnelle que la précédente et combine à la fois différentes protéines porteuses de la MC-LR, et différents modes d'éluion. Le principe général est illustré en Figure III-11.

Vers la sélection d'anticorps ou fragments d'anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR

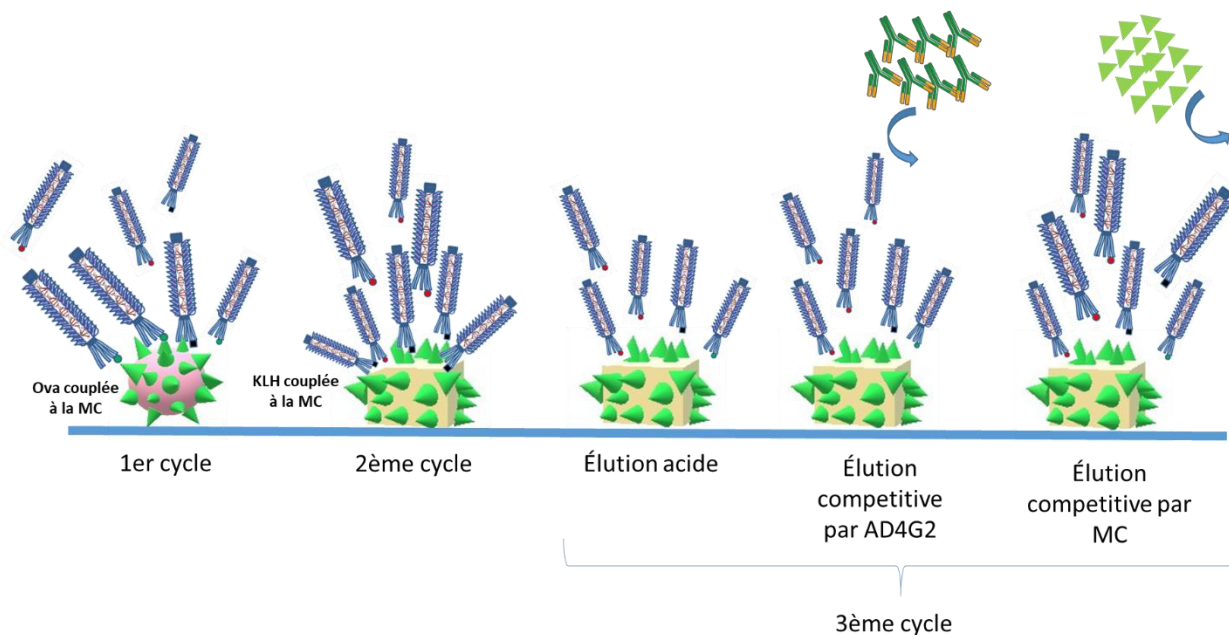


Figure III- 11: Principe des tours de sélection positive et négative effectués lors de la 2^{ème} stratégie de sélection.

Brièvement, un premier cycle de sélection positive est effectué contre l'OVA-MC, suivis de 2 cycles de sélection positive contre la KLH-MC. Cette alternance entre les deux protéines « carrier » a pour but d'éliminer efficacement des scFv spécifiques de l'OVA seule. Lors des 2 premiers cycles, une élution acide similaire à la stratégie SOM préalablement présentée est appliquée. En revanche, 3 conditions d'élutions distinctes ont été indépendamment appliquées à l'issue du troisième cycle :

- i. Elution acide par une solution de glycine-HCl 0.1M à pH 2.2 pour perturber la liaison entre les phages et la MC-LR.
- ii. Elution par compétition vis-à-vis du scFv en utilisant l'anticorps commercial AD4G2
- iii. Elution par compétition vis-à-vis de la MC-LR en utilisant de la MC-LR libre en large excès (10 à 100 fois plus concentrée que la MC-LR immobilisée).

Cette deuxième stratégie est appelée SOKM pour désigner la « **S**élection contre l'**O**V A et la **K**LH conjuguées à la **M**C »

Les conditions expérimentales de cette deuxième stratégie de sélection sont détaillées en annexe I-7. Le tableau III-1 ci-dessous récapitule les conditions des deux stratégies.

Tableau III- 1 : Conditions des procédures des 2 stratégies de sélection.

	Tours de sélection	Molécules immobilisées	Concentration des phages ajoutés (pfu)	Elution	Enrichissement (% phages élués)	Nb de clones isolés / Dénomination	
Stratégie 1	1	Ova-MC	5.10 ¹²	Solution acide	6.60.10 ⁻⁷	-	
	2	Ova-MC			1.36.10 ⁻⁴	-	
	3	Ova-MC			1.00.10 ⁻²	-	
	4	Ova-MC	5.10 ¹¹		1.40.10 ⁻⁶	16	SOMa
	5	Ova	5.10 ¹²		9.36.10 ⁻²	20	
Stratégie 2	1	Ova-MC	5.10 ¹²	Solution acide	1.20.10 ⁻⁶	5	SOKa
	2	KLH-MC		Solution acide	8.00.10 ⁻⁷	5	
	3	KLH-MC	5.10 ¹²	Solution acide	8.00.10 ⁻⁸	5	SOKMa
				Compétition avec MC libres	3.20.10 ⁻⁷	25	SOKMc
				Compétition avec AD4G2	2,60.10 ⁻⁷	5	SOKMd

De la même manière que précédemment, le taux d'enrichissement a été évalué. La figure III-12 présente l'évolution de cet enrichissement au cours des cycles de sélection menés.

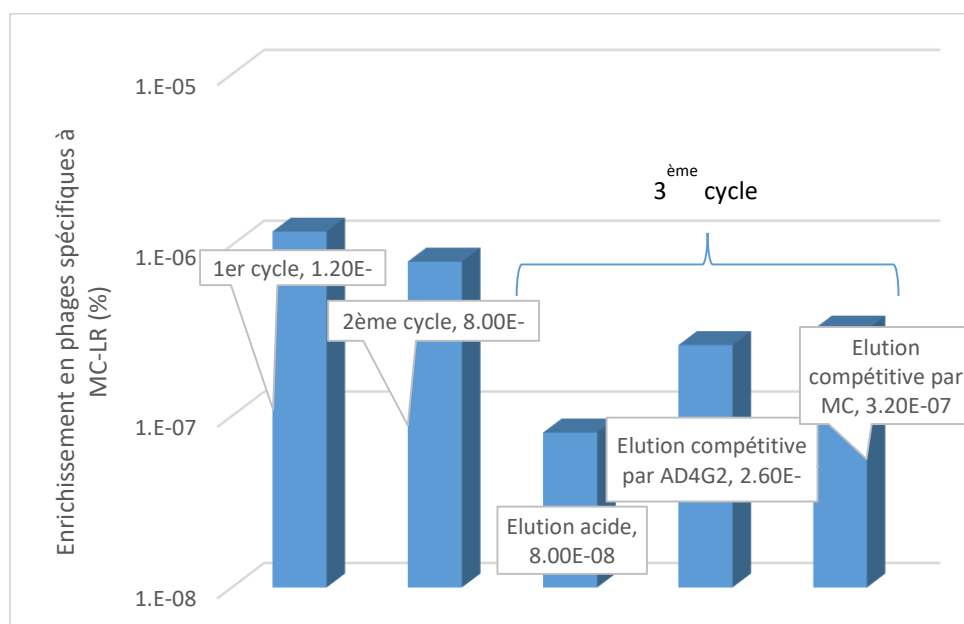


Figure III- 12: Enrichissement de la banque en phages porteurs de scFv spécifiques de la MC après chaque tour de sélection, en appliquant la 2^{ème} stratégie de sélection.

Le profil d'enrichissement diffère selon la stratégie mise en place (figure III-10 et 12). Ici, l'enrichissement diminue au cours des cycles successifs. La diminution observée entre les cycles 1 et 2 se justifie par l'utilisation de deux protéines carrier différentes entre ces deux cycles. Cela est équivalent à une pression de sélection. La diminution observée entre le cycle 2 et les cycles 3, quel que soit le mode d'élution, est en revanche surprenante, la quantité de phages utilisée lors de ce 3^{ème} cycle de sélection étant maintenue constante. Il est possible que les différentes conditions d'élutions appliquées soient moins drastiques, induisant une élution moins importante des phages. Cela semble cohérent pour les

modes d'éluion par compétition, que ce soit par AD4G2 ou par la MC-LR libre. Mais en revanche pour l'éluion acide, la solution utilisée est identique à celle utilisée lors de la stratégie SOM. Ce résultat reste inexpliqué. Le travail de caractérisation a néanmoins été poursuivi.

III.C-3. Evaluation des enrichissements par Phage-ELISA

La technique de Phage-ELISA, dérivée d'un ELISA classique, permet d'estimer la reconnaissance des protéines en surface de phages vis-à-vis de la cible de sélection. Cette technique peut s'appliquer au cours de la sélection sur une population de phages hétérogènes, ou encore sur des phages isolés puis amplifiés, présentant de ce fait tous le même scFv.

Dans un premier temps, un phage-ELISA a été réalisé sur chaque population phagique obtenue après chaque cycle de sélection, c'est-à-dire sur une population de phages hétérogènes. Le principe consiste à immobiliser la cible (à savoir l'OVA-MC ou la KLH-MC) sur une microplaque. Les populations de phages récupérées lors des différents tours de sélection préalablement réalisés sont ensuite mises en contact avec la cible. La révélation est assurée par un anticorps secondaire spécifique de la protéine du manteau de phage PVIII, couplé à l'HRP. Le signal obtenu est comparé à un contrôle négatif dans lequel l'OVA ou la KLH non conjuguées sont immobilisées. Les conditions précises de cette technique sont rappelées en Annexe I-8. La figure III-13 ci-après rassemble les résultats obtenus pour les deux stratégies de sélection.

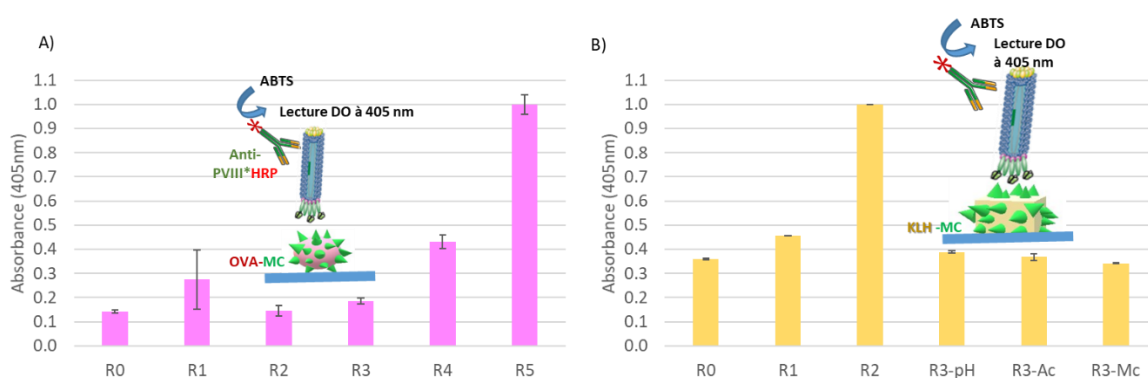


Figure III- 13: Formats et résultats des phage-ELISA appliqués aux populations phagiques enrichies en cours de sélection. R0 correspond à la banque d'origine. R1 à 5 indiquent les cycles successifs réalisés. R3-pH, R3-Ac et R3-Mc indiquent qu'il y a eu 3 cycles de sélection avec éluion respectivement par traitement acide, par compétition avec l'anticorps AD4G2, ou enfin par compétition avec de la MC-LR libre. Les formats des Phage-ELISA appliqués sont illustrés en encadrés. A) : Résultats obtenus suite à la 1^{ère} stratégie de sélection. B) : Résultats obtenus suite à la 2^{ème} stratégie de sélection.

Concernant la stratégie SOM, les résultats suggèrent un enrichissement en phages spécifiques de la MC-LR. Concernant la stratégie SOKM en revanche, on observe une diminution de la reconnaissance lors du 3^e cycle de sélection, quel que soit le mode d'éluion, à pression de sélection équivalente. En outre, les témoins sur OVA seule ou KLH seule se sont avérés élevés, peu reproductibles et variant de 50% à 100% du signal obtenu avec la cible conjuguée à la MC-LR. En dépit d'un travail de répétition des conditions expérimentales et de mise au point, nous ne sommes pas parvenus à obtenir de résultats plus cohérents. Ces points peuvent être expliqués par la possible présence de trace de PEG-NaCl résiduelle lors de la reprise des phages après précipitation lors du procédé de purification des phages. Une telle contamination pourrait en effet induire des signaux anormalement élevés lors du phage ELISA, ne permettant pas une différence suffisamment significative entre les échantillons testés et les contrôles négatifs, impactant très probablement la sélection elle-même. La variabilité des lots de préparation des

Vers la sélection d'anticorps ou fragments d'anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR

phages peut expliquer celle des résultats. Nous avons malgré tout poursuivi la caractérisation de quelques clones issus des deux stratégies de sélection.

III.C-4. Détermination des clones reconnaissant la microcystine MC-LR en surface de phages.

Un criblage est réalisé sur les derniers cycles de sélection afin de choisir les clones les plus spécifiques à la MC-LR. Contrairement à la sélection, le criblage consiste à analyser chaque scFv en surface de phages individuellement. Ce travail est réalisé sur un nombre de clones limités choisis aléatoirement au sein des populations phagiques issues des derniers tours de sélection.

Ainsi, 36 clones ont été isolés à partir de la stratégie de sélection SOM : 16 provenant du 4^{ème} tour et 20 clones provenant du 5^{ème} tour. Ces clones sont appelés SOMa pour désigner les clones « **S**électionnés contre l'**O**VA-**MC** élués par solution **a**cide », attribués d'un chiffre pour distinguer les différents clones issus de ce premier travail.

45 clones ont été isolés à partir de la stratégie SOKM, dont 35 provenant du 3^{ème} tour de sélection, mais résultant de conditions d'élution différentes. Ces clones sont appelés SOKMa, SOKMc et SOKMd pour désigner les clones « **S**électionnés contre l'**O**VA et la **KLH** conjuguées à la **MC** » et élués respectivement par solution **a**cide, en **c**ompétition avec la MC libre, et en compétition avec l'**AD4G2**. Là encore, ce code est suivi d'un chiffre pour distinguer les différents clones issus de ce second travail.

Le format du phage-ELISA est similaire au précédent, et réalisé soit sur de l'OVA-MC immobilisée sur la plaque, soit sur de la KLH-MC. La révélation est assurée par un anticorps anti-PVIII conjugué à la HRP (Figure III-14.A). Les conditions précises de cette expérience sont indiquées en Annexe I-8.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure III-14.B et C et résultent de 3 répétitions indépendantes. Afin de ne pas alourdir le graphique, seuls 20 clones ont été représentés sur les 56 testés, à savoir tous les clones qui ont été finalement retenus ainsi que quelques clones non retenus choisis aléatoirement. En raison des difficultés de reproductibilité et de témoins négatifs rencontrés au cours de ce travail pour les raisons évoquées précédemment, nous avons défini deux critères pour retenir les clones les plus pertinents parmi les 56 clones testés :

- A. Les clones dont le signal de reconnaissance de l'OVA-MC ou de la KLH-MC est au moins deux fois supérieur au signal du contrôle négatif (population de phages issus de la banque initiale avant sélection) sont considérés comme pertinents, indépendamment du fait qu'il y ait une différence entre les signaux obtenus sur la cible seule ou conjuguée.
- B. Les clones dont le signal de reconnaissance de la cible seule (OVA ou KLH) est significativement inférieur au signal de reconnaissance de la cible conjuguée (OVA-MC ou KLH-MC) sont également considérés comme pertinents.

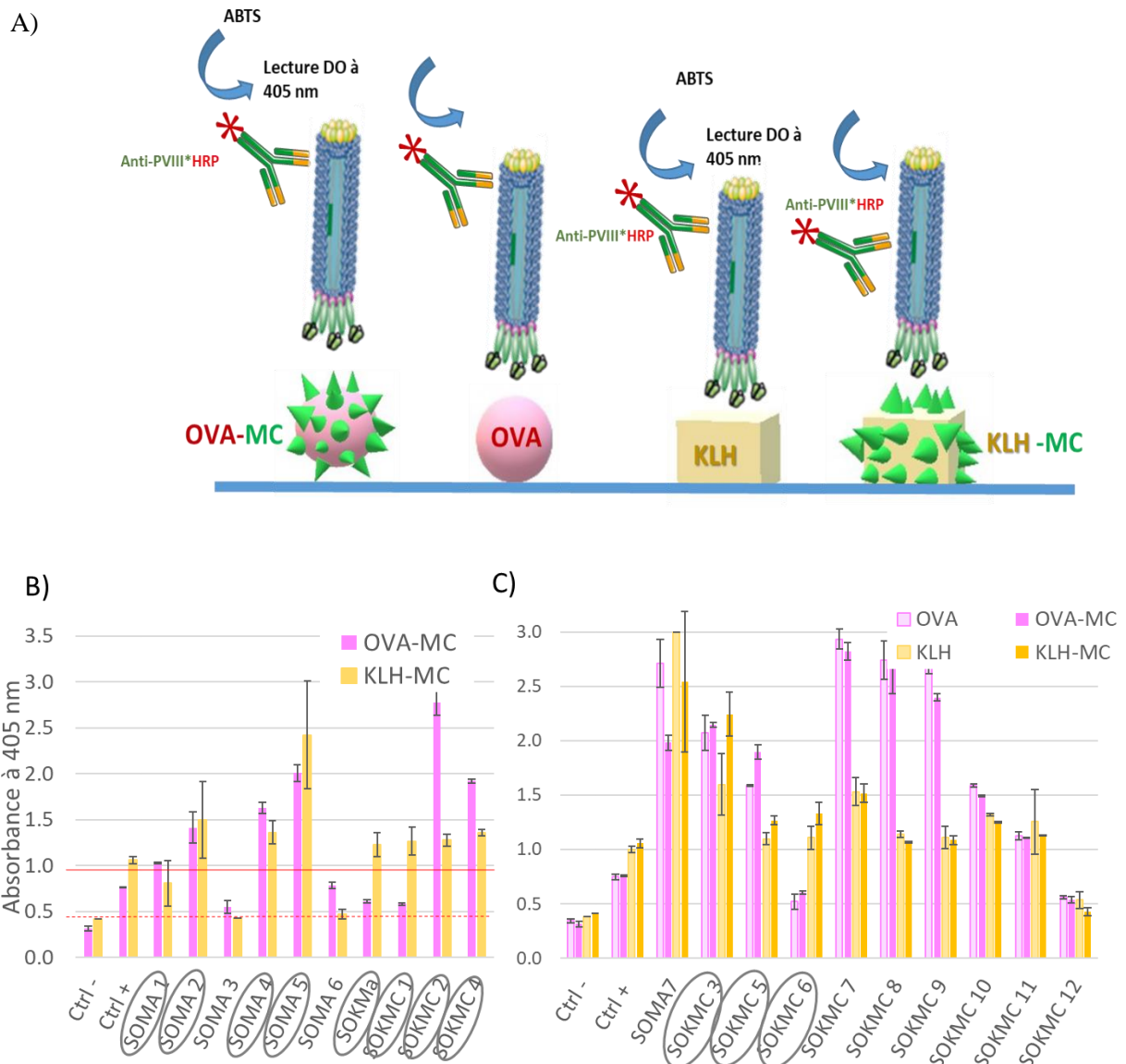


Figure III- 14: A-Format du phage ELISA appliqué sur les phages isolés et amplifiés.

B et C- Résultat de 20 clones issus des 2 stratégies de sélection. Les clones indiqués entourés sont les clones les plus affins pour la MC et choisis pour être caractérisés. Le Ctrl- correspond aux phages du cycle 0, et le Ctrl+ correspond à la population phagique issue du dernier cycle de sélection. A) : Critère de sélection A : Signal au moins deux fois supérieur au contrôle négatif. La ligne rouge en pointillés indique la valeur maximale du témoin négatif et la ligne rouge pleine indique le seuil au-dessus duquel les clones ont été retenus. B) : Critère de sélection B : Différence significative, au minimum pour une des deux cibles, entre la reconnaissance de la cible seule (coloration claire) par rapport à la cible conjuguée (coloration foncée).

Au regard des résultats présentés en figure III-14, et en cumulant les critères A et B, 11 clones ont été finalement retenus. Il s'agit des clones SOMa1, SOMa2, SOMa4 et SOMa5, tous provenant de la 1^{ère} stratégie de sélection SOM contre l'OVA-MC, ainsi que les clones SOKMc1 à 6 et SOKMa provenant de la 2^{nde} stratégie de sélection SOKM croisée contre OVA-MC et KLH-MC, résultant respectivement d'une élution par compétition avec la MC-LR libre et d'une élution acide. Ces clones seront donc soumis à une analyse plus fine incluant leur séquençage, leur clonage et leur expression sous forme soluble. L'objectif final est de mener à bien une caractérisation biochimique fine de la reconnaissance de la MC-LR par les scFv solubles et purifiés ainsi sélectionnés.

Vers la caractérisation des fragments d'anticorps sélectionnés contre la MC-LR

D- Séquençages et modélisation structurale

E- Clonage et Production des scFv sous forme soluble

F. Caractérisation biochimique et validation de la fonctionnalité

Comme stipulé dans la première partie du chapitre 3, 11 clones ont été sélectionnés par la technique Phage Display et ont montré une potentielle spécificité pour la MC-LR. Les SOMa proviennent du 4^{ème} tour de sélection effectué contre l'OVA-MC lors de la stratégie de sélection SOM, tandis que les SOKMc et SOKMa proviennent du 3^{ème} tour de sélection effectué lors de la stratégie de sélection SOKM contre la KLH-MC, élus respectivement par compétition avec les MC libres ou par solution acide.

Afin d'étudier plus finement les clones retenus, nous avons procédé i) au séquençage de chaque clone, ii) à l'expression des clones retenus sous forme soluble, et enfin iii) à la caractérisation biochimique de la reconnaissance des scFv solubles vis-à-vis de la protéine cible.

III.D- Séquençages et modélisation structurale

III.D-1. Résultats de séquençage des clones sélectionnés lors de cette étude.

Les phagemides de chaque clone ont été purifiés à l'aide du kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, #12162) selon le protocole du fournisseur. Les plasmides purifiés ont été séquençés par MWG-Eurofins (Ebersberg, Allemagne), en utilisant des amorces s'hybridant directement sur le vecteur phagique pAK100, en amont et aval du scFv, et dont les séquences sont respectivement :

pAK100back: 5' TGT AGC GCG TTT TCA TCG GC 3'

pAK100for: 5' GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3'

Les 11 clones ont été séquençés et le résultat a révélé que :

- i) Parmi les 11 clones séquençés, 5 (SOKMa, SOKMc1, SOKMc2, SOKMc4 et SOKMc6) possèdent des domaines V_H ou V_L non fonctionnels. Ils n'ont donc pas été conservés. Le détail de leur séquence est présenté dans l'annexe I-9.
- ii) Sur les 6 clones restants, les 4 clones SOMa (1 à 4) présentent tous la même séquence nucléotidique, bien que provenant de clones bactériens différents. Nous avons donc par la suite appelé ce clone unique SOMa.
- iii) Enfin, les deux clones restants présentent des séquences *a priori* fonctionnelles, sans redondance et ont conservé leurs dénomination initiale SOKMc3 et SOKMc5.

Un premier constat important est l'observation de redondances de séquences pour une même stratégie de sélection, comme c'est le cas ici pour les 4 clones SOMa. Ce résultat constitue en effet un critère important d'une sélection aboutie. En effet, le fait que ces clones, isolés à partir de colonies bactériennes distinctes, se trouvent répétés plusieurs fois indique que l'enrichissement mené a permis de faire émerger cette séquence, et renforce donc son intérêt.

Les figures III-3.15 et 16 illustrent les séquences nucléotidique et protéique du clone SOMa, ainsi que les domaines variables sous la forme de colliers de perles de V_L (III-3.16-A) et V_H (III-3.16-B) obtenus

avec l'outil de l'IMGT. De la même manière, les figures III-17 et 18 concernent le scFv SOKMc3, tandis que les figures III-19 et 20 concernent le scFv SOKMc5.

Selon la codification de l'IMGT, pour chaque collier de perles, les CDR 1,2 et 3 de V_L sont colorés respectivement en bleu, vert clair et vert foncé, et ceux de V_H sont colorés en rouge, orange et violet. Les acides aminés hautement conservés dans les IgG sont écrits en rouge sur fond bleu. Les acides aminés hydrophobes et les résidus tryptophane présents dans plus de 50% des séquences analysées sont représentés en bleu. Les résidus proline, jouant un rôle structural important, sont en jaune. Les positions délimitant les CDR sont représentées sous forme de carrés, sachant que ces positions appartiennent aux régions charpentes (*Framework*). Les positions hachurées correspondent à des positions non occupées dans ce domaine, au regard de la numérotation unique de l'IMGT. Enfin les flèches indiquent l'orientation des brins.

Vers la caractérisation des fragments d'anticorps sélectionnés contre la MC-LR

ATG GCG CTG GCC GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA
M A L A E I V L T Q S P A I M S A S P
 GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TAC ATG CAT TGG
 G E K V T M T C S A S S S I S Y M H W
 TAT CAG CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG
 Y Q Q K P G F S P K L L I Y R T S N L
 GCT TCT GGA GTC CCA GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC
 A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L
 ACA ATT GGC ACC ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT
 T I G T M E A E D V A T Y Y C Q Q G S
 AGT ATA CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGT **GGT GGT GGT**
 S I P L T F G A G T K L E L K R **G G G**
GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC GAG GTG
G S G G G G S G G G G S G G G G S E V
 AAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC
 K L V E S G G G L V K P G G S L K L S
 TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT GAC TAT TAC ATG TAT TGG GTT CGC CAG ACT
 C A A S G F T F S D Y Y M Y W V R Q T
 CCG GAA AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT GAT GGT GGT AGT TAC ACC TAC
 P E K R L E W V A T I S D G G S Y T Y
 TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC AAC
 Y P D S V K G R F T I S R D N A K N N
 CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT GTA
 L Y L Q M S S L K S E D T A M Y Y C V
 AGA GAA GGG AGA CGA CGA GAG GGA TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA
 R E G R R R E G Y A M D Y W G Q G T S
 GTC ACC GTC TCC TCG GCC TCG GGG GCC GAA GTC GAG CAG AAG CTG ATC TCT GAG GAA
 V T V S S A S G A E V E Q K L I S E E
 GAC CTG **TAG**
 D L **Stop**

Figure III- 15: Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOMa. Les début et fin de la séquence sont marqués en violet. En vert, la séquence de la région variable de la chaîne légère (V_L), en rouge la séquence du linker, en bleu celle de la région variable de la chaîne lourde (V_H), et enfin les nucléotides résiduels provenant du vecteur pAK100 lors du clonage de la banque sont représentés en noir.

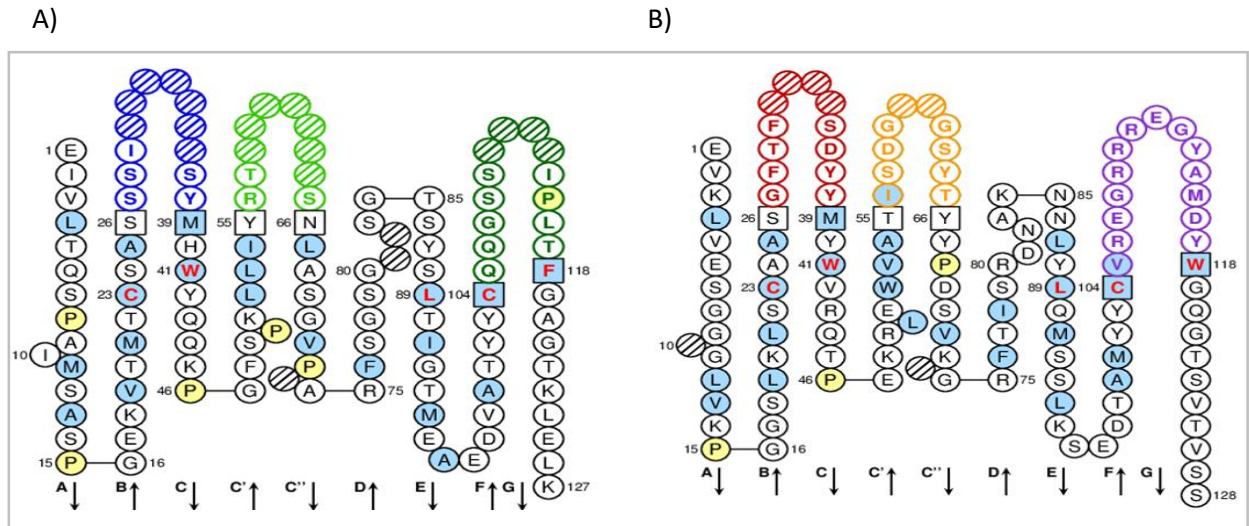


Figure III- 16: Colliers de perles des domaines variables VL (A) et VH (B), obtenus avec l'outil de l'IMGT pour le clone SOMa.

Vers la caractérisation des fragments d'anticorps sélectionnés contre la MC-LR

ATG GCG CTG GCC GAA ATT TTG CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA
 M A L A E I L L S Q S P A I M S A S P
 GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA CGT TAC ATG CAC TGG
 G E K V T M T C S A S S S V R Y M H W
 TAC CAG CTG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG
 Y Q L K S G T S P K R W I Y D T S K L
 GCT TCT GGA GTC CCT TCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC
 A S G V P S R F S G S G S G T S Y S L
 ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGT CAA CAG TGG AGT
 T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S
 AGT TAC CCA CTG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGT GGT GGT GGT
 S Y P L T F G G G T K L E I K R G G G
 GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC GAG GTG
 G S G G G G S G G G G S G G G G S E V
 CAG CTT CAG GAG TCT GGG CCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GTC TCA GTG AAG ATT TCC
 Q L Q E S G P E L V R P G V S V K I S
 TGC AAG GGT TCC AGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GCT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGT
 C K G S S Y T F T D Y A M H W V K Q S
 CAT GCA AAG AGT CTA GAG TGG ATT GGA GTT ATT AGT ACT TAC TAT GGT AAT ACT AAC
 H A K S L E W I G V I S T Y Y G N T N
 TAC AAC CAG AAG TTT AAG GGC AAG GCC ACA ATG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA
 Y N Q K F K G K A T M T V D K S S S T
 GCC TAT ATG GAA CTT GCC AGA TTG ACA TCT GAG GAT TCT GCC GTC TAT TAC TGT GCA
 A Y M E L A R L T S E D S A V Y Y C A
 AGA GAC TAC GGT AGT AGA GGG TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA
 R D Y G S R G Y Y A M D Y W G Q G T S
 GTC ACC GTC TCC TGG GCC TCG GGG GCC GAA TTC GAG CAG AAG CTG ATC TCT GAG GAA
 V T V S W A S G A E F E Q K L I S E E
 GAC CTG TAG
 D L Stop

Figure III- 17: Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOKMc3. Les début et fin de la séquence sont marqués en violet. En vert, la séquence de la région variable de la chaîne légère (V_L) en rouge la séquence du linker, en bleu celle de la région variable de la chaîne lourde (V_H) et enfin les nucléotides résiduels provenant du vecteur pAK100 lors du clonage de la banque sont représentés en noir.

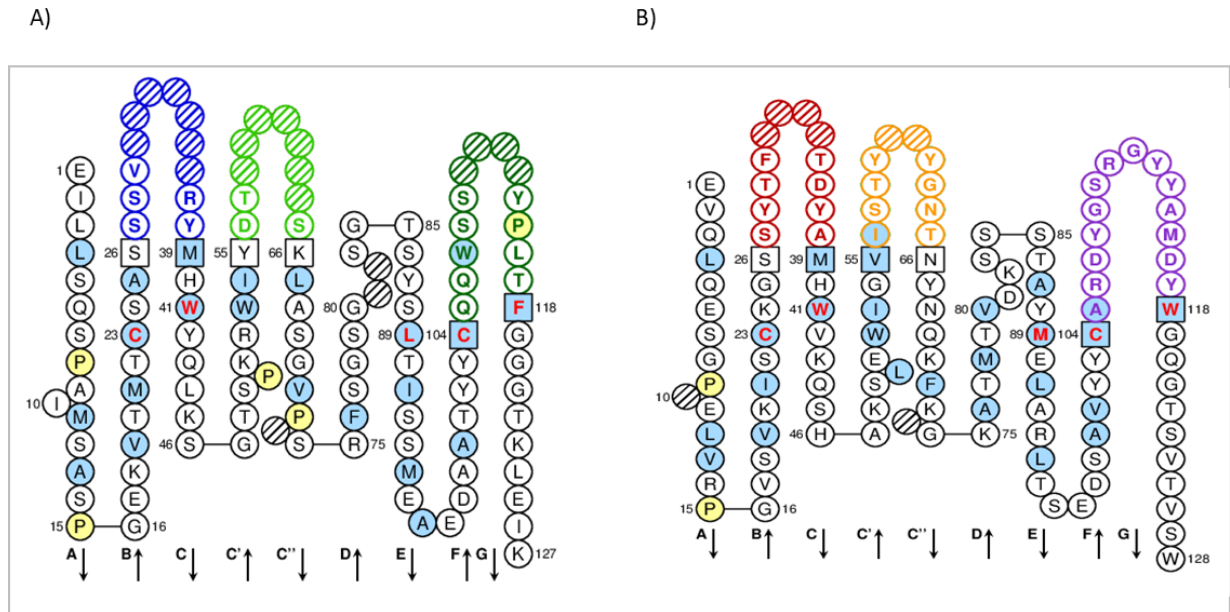


Figure III- 18: Colliers de perles des domaines variables VL (A) et VH (B), obtenus avec l'outil de l'IMGT pour le clone SOKMc3.

Vers la caractérisation des fragments d'anticorps sélectionnés contre la MC-LR

ATG GCG CTG GCC GAA ATC CTG ATG ACC CAG TCT CCA TCC AGT CTG TCT GCA TCC CTT
 M A L A E I L M T Q S P S S L S A S L
 GGA GAC ACA ATT ACC ATC ACT TGC CAT GCC AGT CAG AAC ATT AAT GTT TGG TTA AGC
 G D T I T I T C H A S Q N I N V W L S
 TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA AAT ATT CCT AAA CTA TTG ATC TAT AAG GCT TCC AAC
 W Y Q Q K P G N I P K L L I Y K A S N
 TTG CAC ACA GGC GTC CCA TCA AGG TTT AGT GGC AGT GGA TCT GGA ACA GGT TTC ACA
 L H T G V P S R F S G S G S G T G F T
 TTA ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAC ATT GCC ACT TAC TAC TGT CAA CAG GGT
 L T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q G
 CAA AGT TAT CCT CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGT GGT GGT
 Q S Y P R T F G G G T K L E L K R G G
 GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC GAG
 G G S G G G S G G G S G G G G S E
 GTG ATG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC
 V M L V E S G G G L V K P G G S L K L
 TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC TAT GCC ATG TCT TGG GTT CGC CAG
 S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q
 ACT CCG GAA AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT GGT TAT GAT GGT CCT TAC ACC
 T P E K R L E W V A T I G Y D G P Y T
 TAC TAT CCA GAC AAT GTA AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GAC AAC AAC
 Y Y P D N V K G R F T I S R D N D N N
 AAC CTG TAC CTG CAA ATG AGC CAT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TTC TGT
 N L Y L Q M S H L K S E D T A M Y F C
 GCA AGA GAT CAG GCC TAC TAT AGT AAT TAC TAT GCT ATG GAC TAT TGG GGT CAA GGA
 A R D Q A Y Y S N Y Y A M D Y W G Q G
 ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCG GCC TCG GGG GCC GAA TTC GAG CAG AAG CTG ATC TCT
 T S V T V S S A S G A E F E Q K L I S
 GAG GAA GAC CTG TAG
 E E D L Stop

Figure III-19: Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOKMc5. Les début et fin de la séquence sont marqués en violet. En vert, la séquence de la région variable de la chaîne légère (V_L) en rouge la séquence du linker, en bleu celle de la région variable de la chaîne lourde (V_H) et enfin les nucléotides résiduels provenant du vecteur pAK100 lors du clonage de la banque sont représentés en noir.

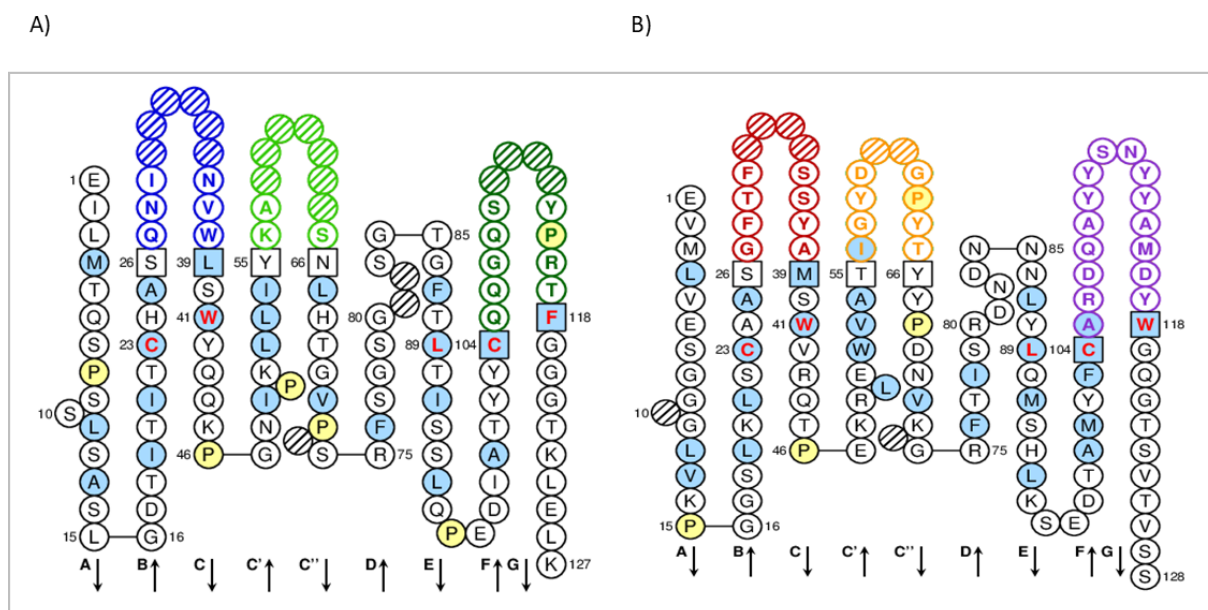


Figure III- 20: Colliers de perles des domaines variables VL (A) et VH (B), obtenus avec l'outil de l'IMGT pour le clone SOKMc5.

III.D-2. Résultats de séquençage du clone 3A8

En 2002, un anticorps recombinant sous forme de scAb (single chain Antibody) spécifique à la MC-LR a été sélectionné à partir d'une banque humaine naïve semi synthétique, et caractérisé par l'équipe d'Andrew Porter (McElhiney *et al.*, 2002). Plus récemment, ce fragment d'anticorps a été produit sous forme de scFv dimérisé, couplé à la phosphatase alcaline, afin de tester son utilisation potentielle dans les méthodes immunologiques de détection directe de la MC-LR (Alvarenga *et al.*, 2014). L'étude de l'affinité de ce scFv a révélé des données compatibles avec un modèle composé de deux populations de scFv 3A8 capables de se lier à l'OVA/MC immobilisée. Il s'agirait du même scFv (même masse moléculaire et même séquence), mais présentant vraisemblablement deux repliements distincts, reflétant une différence de fonctionnalité. Les valeurs de K_D obtenues sont 0,22 nM pour la première population, et 8,73 μ M pour la deuxième. L'expression périplasmique alors utilisée pour la production de 3A8 pourrait expliquer un repliement non homogène. C'est pourquoi nous avons décidé d'exprimer ce scFv par la voie cytoplasmique, requérant une solubilisation des scFv et la mise au point d'une renaturation homogène pour l'ensemble des protéines recombinantes produites. En outre, nous avons remarqué que le linker du 3A8 est constitué de 15 résidus (G4S répétés 3 fois) tandis que celui des scFv que nous avons sélectionnés est de 20 résidus (G4S répétés 4 fois). Il est maintenant connu que les *linkers* trop courts conduiront à la formation de multimères, c'est pour cela les *linkers* de longueur entre 15 et 20 résidus, sont les plus souvent utilisés. Paudel et collaborateurs (2017) ont étudié l'effet de la variation de la longueur du *linker* en produisant 3 scFv de format VH-(GGGG)n-VL où n = 3, 5, ou 7. Ils ont trouvé que leur réactivité et leur spécificité était identique donc la différence de longueur du linker entre le 3A8 et les 3 autres scFv n'aura pas d'effet sur la comparaison de leur spécificité pour la MC-LR.

Les figures III-3.21 et 22 illustrent les séquences nucléotidique et protéique ainsi que les domaines variables de V_L (III-3.22-A) et V_H (III-3.22-B) sous la forme de colliers de perles obtenus avec l'outil de l'IMGT pour le clone 3A8.

Vers la caractérisation des fragments d'anticorps sélectionnés contre la MC-LR

ATG GCC GAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA
 M A E V Q L Q Q S G A E V K K P G A S
 GTG AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC CTC ACT GAA TTA TCC ATG CAC TGG
 V K V S C K V S G Y T L T E L S M H W
 GTG CGA CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGT TTT GAT CCT GAA GAT
 V R Q A P G K G L E W M G G F D P E D
 GGT GAA ACA ATC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GAG GAC ACA
 G E T I Y A Q K F Q G R V T M T E D T
 TCT ACA GAC ACA GCC TAC ATG GAG CTA AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG
 S T D T A Y M E L S S L R S E D T A V
 TAT TAC TGT GCA GGG TAT CGG TCG CCT ATG CCT ACG GCT AAT AAG TGG GGC CAA GGT
 Y Y C A G Y R S P M P T A N K W G Q G
 ACC CTG GTC ACC GTC TCG TCA GGC GGA GGC GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT
 T L V T V S S G G G G S G G G G S G G
 GGC GGA AGC CTT CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG
 G G S L Q S V L T Q P P S A S G T P G
 CAG AGG GTC ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATC GGA AGT AAT TAT GTA
 Q R V T I S C S G S S S N I G S N Y V
 TAC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACG GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT AGG AAT AAT
 Y W Y Q Q L P G T A P K L L I Y R N N
 CAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC
 Q R P S G V P D R F S G S K S G T S A
 TCC CTG GCC ATC AGT GGG CTC CGG TCC GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA GCA
 S L A I S G L R S E D E A D Y Y C A A
 TGG GAT GAC AGC CTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGG CGC
 W D D S L V F G G G T K L T V L G R

Figure III- 21: Séquences nucléotidique et protéique du scFv 3A8. Les début et fin de la séquence sont marqués en violet. En bleu, la séquence de la région variable de la chaîne lourde (V_H) en rouge la séquence du linker, en vert celle de la région variable de la chaîne légère (V_L) et enfin les nucléotides résiduels provenant du vecteur lors du clonage sont représentés en noir.

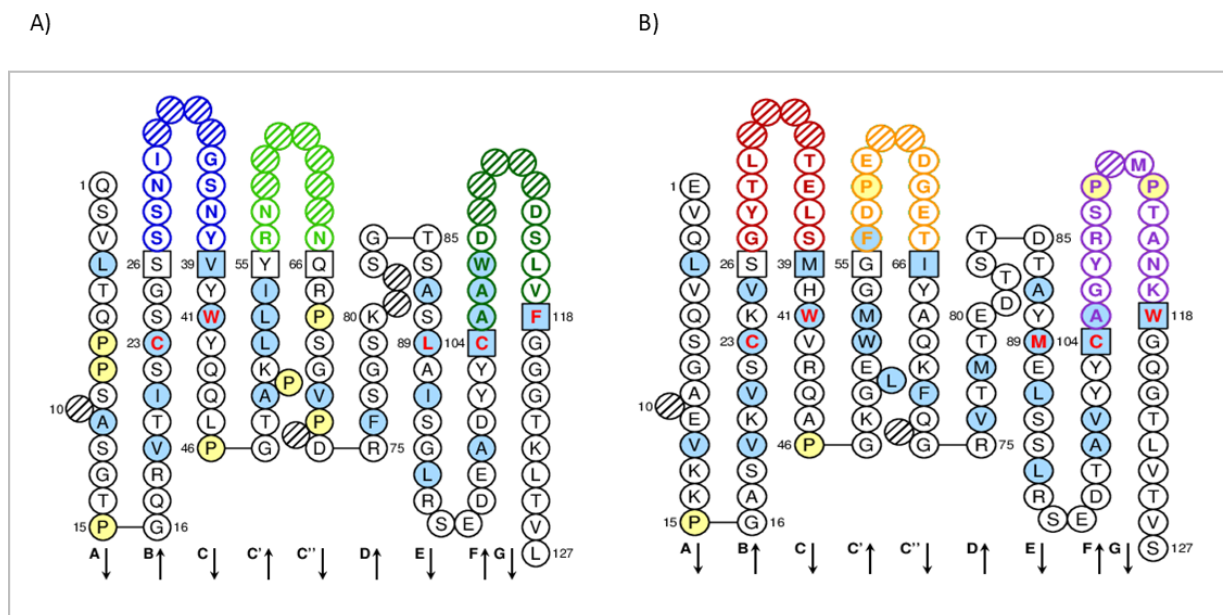


Figure III- 22: Colliers de perles des domaines variables VL (A) et VH (B), obtenus avec l’outil de l’IMGT pour le clone 3A8.

III.D-3. Détermination des sous-groupes de gènes de l’ensemble des scFv

Afin de finaliser l’étude des séquences des scFv, nous avons déterminé les sous-groupes de gènes d’immunoglobuline dont provient chaque clone grâce à l’outil IMGT V-Quest. Cela donne une indication sur les sous-groupes de gènes sollicités, sur l’importance des éventuelles mutations dans la reconnaissance, et éventuellement sur l’émergence de certains sous-groupes lors de la sélection des scFv. Les résultats de ce travail figurent dans le tableau III-2.

Tableau III- 2: Sous-groupe de gènes exprimés par les scFv inclus dans cette étude et pourcentages d’identité entre les séquences des scFv sélectionnés et les lignées germinales les plus proches.

Clone	IGKV	Identité	IGKJ	Identité	IGHV	Identité	IGHJ	Identité	IGHD
SOMa	IGKV4	95.29%	IGKJ5	100%	IGHV5	99.31%	IGHJ4	90.74%	IGHD2
SOKMc3	IGKV4	96.74%	IGKJ1	94.29%	IGHV1	95.49%	IGHJ4	92.59%	IGHD1
SOKMc5	IGKV15	98.29%	IGKJ1	91.43%	IGHV5	96.53%	IGHJ4	96.30%	IGHD2
3A8	IGLV1	100%	IGLJ2	100%	IGHV1	98.61%	IGHJ3	69.57%	IGHD6

Concernant la chaîne légère de ces anticorps, SOKMc3 et SOMa appartiennent au même sous-groupe de gènes (IGKV4), avec un taux d’identité par rapport à la lignée germinale la plus proche supérieur à 95%. Concernant le segment du gène J, SOKMc3 et SOKMc5 proviennent du même sous-groupe de gène IGKJ1 avec des pourcentages d’identité supérieurs à 90%.

Concernant la chaîne lourde, SOMa et SOKMc5 sont codés par les mêmes sous-groupes de gènes, à savoir IGHV5, IGHD2 et IGHJ4. Le sous-groupe IGHJ4 est commun aux 3 scFv sélectionnés (SOMa, SOKMc3 ou SOKMc5).

L’ensemble de ces résultats suggère une certaine similarité des sous-groupes de gènes exprimant les clones sélectionnés, ce qui semble cohérent, la cible contre laquelle ils sont dirigés étant unique.

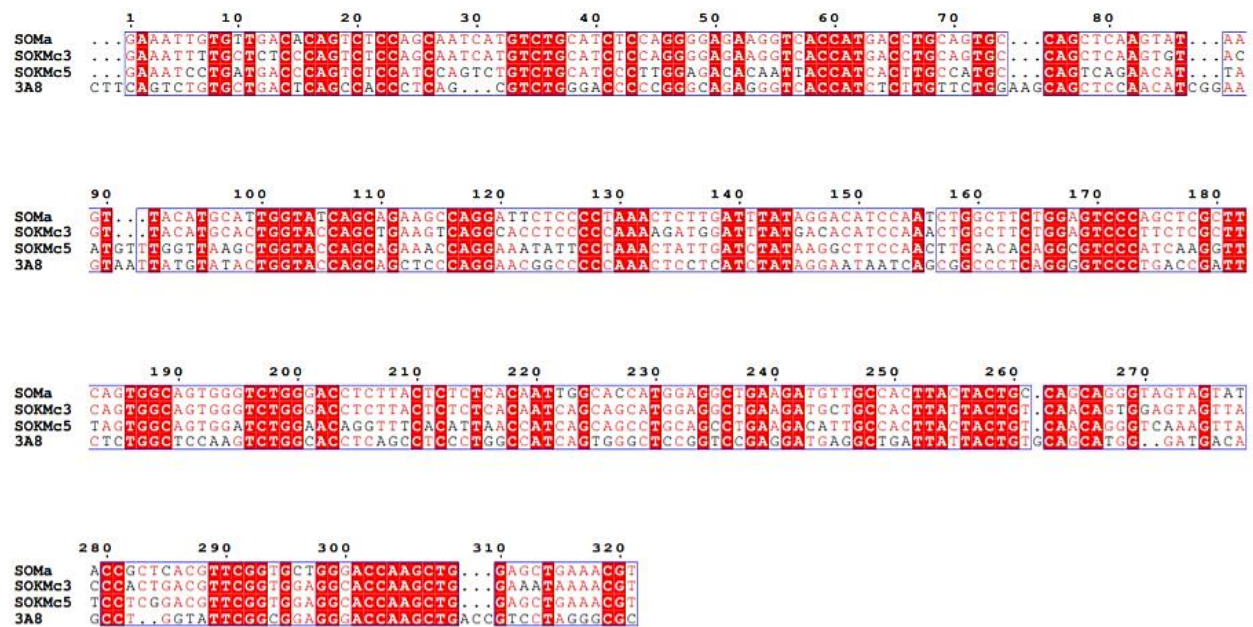
En revanche, le clone 3A8 n'est pas comparé aux autres scFv dans cette étude, puisque ce dernier provient d'une banque de scFv humains, contrairement aux 3 autres qui sont d'origine murine. Qui plus est, la banque dont est issu 3A8 est semi synthétique et ne reflète donc pas vraiment d'effet de la maturation *in vivo* propre aux banques immunisées.

Concernant la chaîne légère, 3A8 provient des sous-groupes IGLV1 et IGLJ2 avec un pourcentage d'identité égal à 100%. Cela suggère que ce scFv n'a pas subi de mutations, ce qui est cohérent avec l'aspect naïf de la banque dont il est issu. Concernant la chaîne lourde de 3A8, les sous-groupes de gènes IGHV1, IGHJ3 et IGHD6 ont été identifiés. Le faible pourcentage d'identité observé pour IGHJ3 (69,57%) s'explique probablement par l'aspect « semi-synthétique » de la banque.

III.D-4. Alignement des séquences

L'alignement des séquences nucléotidiques et protéiques de ces 4 clones, réalisé avec l'outil Multalin [http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/] est présenté en figures III-3.23 et 24.

A)



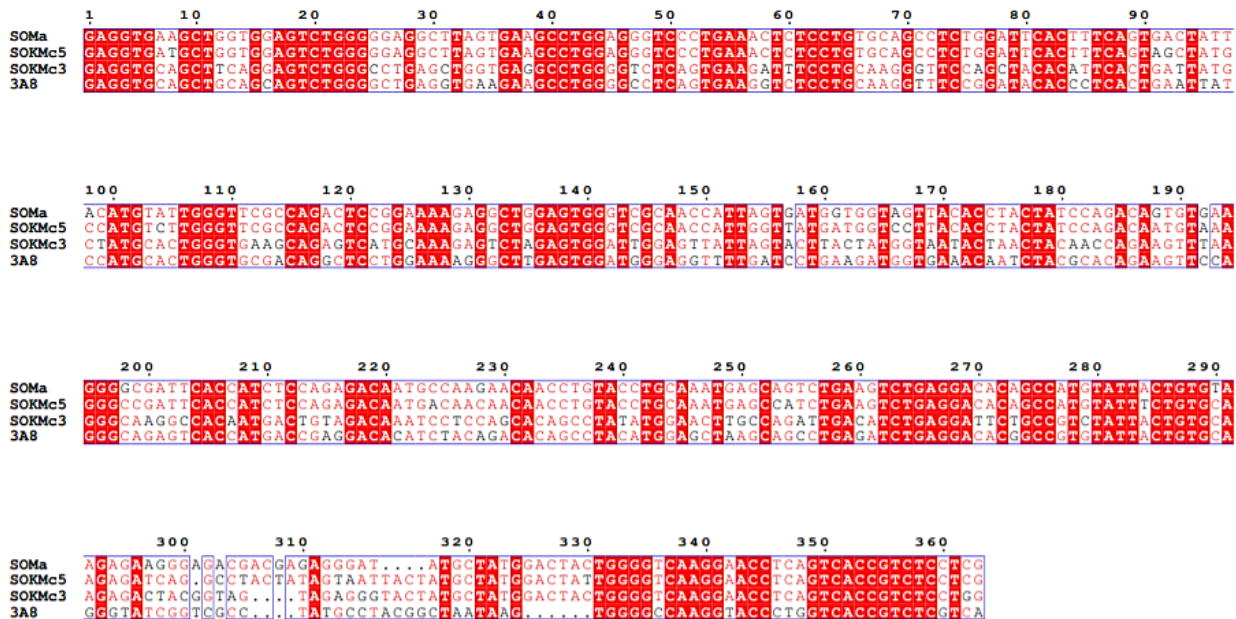
B)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
SOMa	EIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAS	SSI--SY	MHWYQKPGFSPKLLIY	RTS	NLASGV PARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYC	QQGSSIIPLT	FGAGTKLEIKR
SOKMc3	EILLSQSPAIMSASPGEKVTMTCSAS	SSV--RY	MHWYQLKSGTSPKRWIY	DTS	KLASGV PSRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC	QQWSSYPLT	FGGGTKLEIKR
SOKMc5	EILMTQSPSSLASLGDITITCHAS	QNI--NWW	LSWYQKPGNIKLLIY	KAS	NLHTGVP SRFSGSGSGTGFTLTISSLQP EDIATYYC	QQGQSYPRT	FGGGTKLEIKR
3A8	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNY	VYWYQLPGTAPKLLIY	RNN	QRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDSLV	FGGGTKLTVL

Figure III- 23: A) Alignement nucléotidique des 4 séquences de la région variable de la chaîne légère (VL). Les nucléotides à faible consensus sont écrits en rouges et ceux de haut consensus sont écrits en blanc sur fond rouge. B) Alignement protéique et distribution des régions de Framework et CDR des VL des 4 scFv. Les acides aminés à haut consensus sont colorés en rouge, ceux de faible consensus sont colorés en bleu, et les nucléotides à consensus unique sont représentés en noir.

Vers la caractérisation des fragments d'anticorps sélectionnés contre la MC-LR

A)



B)

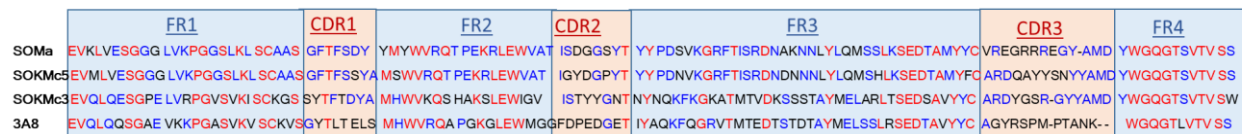


Figure III- 24: A) Alignement nucléotidique des 4 séquences de la région variable de la chaîne lourde (VH). Les nucléotides à faible consensus sont écrits en rouges et ceux de haut consensus sont écrits en blanc sur fond rouge. B) Alignement protéique et distribution des régions de Framework et CDR des VL des 4 scFv. Les acides aminés à haut consensus sont colorés en rouge, ceux de faible consensus sont colorés en bleu, et les nucléotides à consensus unique sont représentés en noir.

Tableau III- 3: Taux d'identité entre les séquences nucléotidiques et protéiques des scFv étudiés.

Clones	Chaîne légère		Chaîne lourde	
	Séquence nucléotidique	Séquence protéique	Séquence nucléotidique	Séquence protéique
SOMa, SOKMc3 et SOKMc5	62.96%	56.48%	59.67%	46.72%
SOMa, SOKMc3, SOKMc5 et 3A8	42.43%	36.04%	49.32%	36.07%

Cet alignement montre que le taux d'identité entre les chaînes légères des 3 clones SOMa, SOKMc3 et SOKMc5 est de près de 63% pour les séquences nucléotidiques et de 56% pour les séquences protéiques (Tableau III-3). L'ajout du clone 3A8 à cette comparaison, réduit le taux d'identité à 42% dans le cas des séquences nucléotidiques et à 36% quand il s'agit des séquences protéiques. Cet effet est également observé dans le cadre de l'étude des chaînes lourdes. Cette observation est cohérente puisque le clone 3A8 provient d'une banque d'espèce différente de celle des 3 autres clones.

Nous avons ensuite focalisé notre attention sur les mutations localisées sur les *frameworks* (FR) versus celles localisées sur les CDRs, d'une part entre les différents scFv sélectionnés dans cette étude (zone colorée en bleu clair), et d'autre part entre le scFv 3A8 issu d'un travail antérieur et d'une autre banque, et nos différents scFv (zone colorée en vert clair) (Tableau III-4). De manière globale, on observe que le taux de mutation au niveau des FR est inférieur à celui des CDR, tous scFv confondus. Ce résultat est cohérent, les CDR correspondant effectivement aux boucles hypervariables.

Tableau III- 4: Taux de mutations au niveau du framework et des CDR pour les 4 scFv.

Clones	Chaîne légère		Chaîne lourde	
	Au niveau du Framework	Au niveau des CDR	Au niveau du Framework	Au niveau des CDR
SOMa et SOKMc3	14%	27%	51%	50%
SOMa et SOKMc5	28%	50%	9%	46%
SOKMc3 et SOKMc5	30%	61%	53%	53%
3A8 et SOMa	40%	70%	44%	83%
3A8 et SOKMc3	45%	75%	45%	80%
3A8 et SOKMc5	46%	100%	33%	80%

Une analyse plus fine suggère que les CDRs de 3A8 sont très différents des CDR des autres scFv, avec un taux de mutation variant de 70 à 100% entre 3A8 et l'ensemble des scFv SOMa et SOKMc, tandis que ce taux est compris entre 27 et 60% environ entre les différents scFv issus de notre sélection. Les CDR exposant les résidus essentiels aux interactions anticorps/antigènes, ces observations présagent que l'on peut s'attendre à différentes solutions d'interactions entre les différents scFv inclus dans cette étude et la MC-LR. Cela confirme non seulement l'intérêt de la sélection par phage display pour élargir l'arsenal diagnostique pour la détection de microcystines, mais également l'intérêt de diversifier les origines des banques pour espérer isoler des candidats aux propriétés différentes.

Pour conclure sur ce travail de sélection, ce projet nous a amené à isoler 85 clones à partir de la banque de scFv à disposition (>10⁹ clones différents), 40 provenant de la stratégie de sélection SOM et 45 de la stratégie SOKM. Une approche de phage-ELISA a permis de retenir les 11 meilleurs clones présentant une potentielle spécificité vis-à-vis de la MC-LR. Ces 11 clones de scFv ont été séquencés et 3 clones en surface de phages ont été retenus : SOMa, SOKMc3 et SOKMc5. Afin de confirmer la fonctionnalité de ces 3 scFv sous forme soluble, mais aussi du scFv 3A8 résultant d'un travail de sélection préalable, chacun des fragments d'anticorps doit être indépendamment cloné, exprimé sous forme soluble et enfin testé par différentes approches pour sa reconnaissance de la MC-LR. Le chapitre qui suit s'attache donc à décrire le clonage, l'expression et la renaturation desdits scFv sous forme soluble.

III.E- Clonage et Production des scFv sous forme soluble.

III.E-1. Clonage

Notre laboratoire possède un savoir-faire en ingénierie des anticorps catalytiques, en particulier sous un format de scFv. Le système d'expression mis en place étant de type procaryote chez *E. coli*, une étape de clonage est nécessaire afin d'exprimer les scFv sélectionnés sous forme soluble. Le principe général de cette étape de clonage consiste à insérer la séquence codante pour chaque scFv dans un vecteur d'expression inductible qui sera ensuite introduit dans *E. coli*. Après transformation, les bactéries sont amplifiées, et les scFv sont exprimés puis extraits.

Le vecteur d'expression utilisé lors de cette production est le plasmide pET9c (Annexe I-10.a). Ce dernier se caractérise par la présence d'un promoteur T7 inductible par l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), ce qui permet ainsi de contrôler l'expression des scFv. Il porte un gène de résistance à la kanamycine qui permet la sélection des bactéries transformées sur un milieu approprié. Ce vecteur de 4339 pb, dérive du vecteur pBR322, un des vecteurs de clonage d'*E. coli* les plus couramment utilisés. Afin de palier à la problématique des codons rares, les séquences nucléotidiques des scFv ont été optimisées grâce au logiciel GENEius [<http://www.geneius.de>], en respect avec les séquences protéiques, pour une meilleure expression dans *E. coli*. De plus, une étiquette polyhistidine (6xHis) a été ajoutée à l'extrémité C-terminale, afin de faciliter la purification des protéines recombinantes. Les détails des séquences optimisées sont illustrés dans l'annexe I-10.b. Ces séquences sont insérées dans le vecteur pET9c entre les sites de restriction *Bam*HI (position 510) et *Nde*I (position 548). La qualité du clonage a été contrôlée par séquençage (MWG-Eurofins, Ebersberg, Allemagne).

III.E-2. Production des scFv

III.E-2.a- Expression par voie cytoplasmique

Un protocole d'expression des protéines recombinantes, et en particulier des scFv, a été mis au point lors de travaux précédents au sein de notre laboratoire afin d'obtenir un compromis idéal entre rendement de production et fonctionnalité de la protéine produite. Après clonage des séquences de scFv dans le vecteur pET9c, des bactéries BL21 compétentes sont transformées par électroporation puis sélectionnées grâce à leur résistance à la kanamycine.

Les clones bactériens exprimant les scFv sont ensuite mis en culture et en phase exponentielle de croissance, l'expression est induite par ajout d'IPTG à 1mM pendant 3h à 28°C. Les protéines totales sont alors extraites en lysant les parois bactériennes par sonication. Les scFv dans leur conformation naturelle étant porteurs de ponts disulfures intrachânes, et le milieu cytoplasmique des bactéries étant réducteur, la protéine hétérologue s'accumule sous forme de corps d'inclusions (Yang *et al.*, 2011). Afin de solubiliser ces derniers, le tampon de lyse utilisé lors de la sonication contient un agent chaotrope qui permet en principe de recueillir le maximum de scFv sous une forme dénaturée.

III.E-2.b- Purification

Les protéines d'intérêt sont ensuite purifiées par chromatographie d'affinité sur des billes d'agarose recouvertes de nickel Ni-NTA (nickel-nitriloacetic acid) capables d'interagir avec l'étiquette (His)₆ présente à l'extrémité C-terminale de la protéine recombinante. Les protéines non-retenues sont éliminées par deux lavages successifs et les scFv sont quant à eux élués grâce à un tampon concentré en imidazole (200 mM) qui entre en compétition avec la queue 6-histidines. À cette étape-là, les scFv sont toujours sous forme dénaturée. La qualité d'expression et de purification est vérifiée par une électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) suivie d'une coloration au Bleu de Coomassie. Ce protocole a été appliqué pour chaque scFv. La figure III-25 présente un bilan de purification caractéristique, obtenu ici avec le scFv SOKMc5.

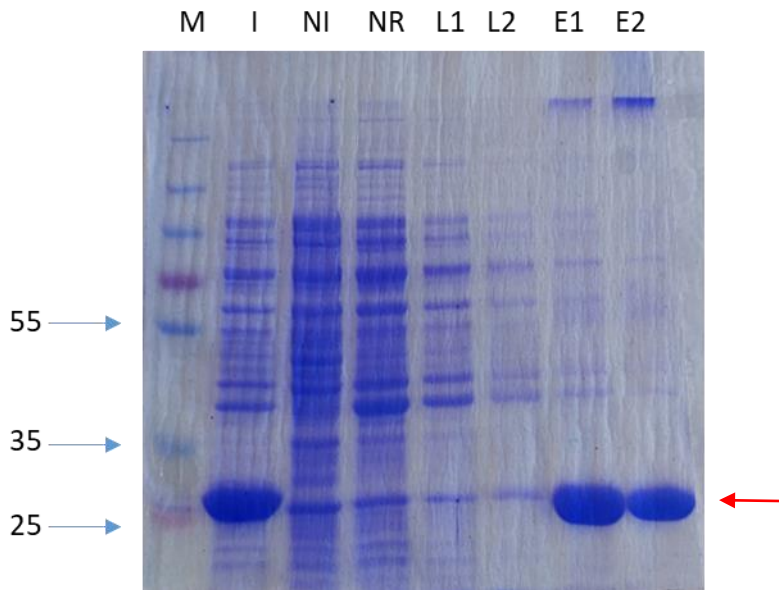


Figure III- 25: SDS PAGE du bilan de purification du scFv SOKMc5 révélé au bleu de Coomassie. M : marqueur de poids moléculaire exprimé en kDa (PageRuler Plus, ThermoFisher scientifique) ; I : Extrait brut induit avec 1mM d'IPTG ; NI : Extrait brut non induit ; Nr : fraction contenant les protéines non retenues ; L1 et L2 : fractions obtenues respectivement après les 2 étapes de lavage ; E1 et E2 : fractions d'élution successives. La flèche rouge indique la localisation de la bande attribuable au scFv SOKMc5.

La fraction de l'extrait brut induit présente une bande intense à la taille attendue pour le scFv (28 kDa), par rapport à la fraction de l'extrait brut non induit. Cette première constatation valide la qualité de l'expression après induction. La présence de cette même bande dans les éluats E1 et E2 permet quant à elle de valider la réussite de la purification. Cependant, une bande de même taille mais de faible intensité est présente dans les fractions non retenues et de lavages, ce qui suggère soit un rendement de purification qui n'est pas optimal, soit la présence dans le lysat bactérien de protéines de taille similaire au scFv. Le protocole précis est détaillé en annexe I-10.c.

Ainsi, ce protocole d'expression nous a permis d'isoler de 4 à 29 mg de scFv solubles avant renaturation à partir d'une culture bactérienne de 1 L (Tableau III-6). Ces valeurs variaient selon la nature du scFv. A noter que le clone 3A8 semble mieux s'exprimer que les autres. Ce rendement nous permet d'envisager les tests de caractérisation décrits ultérieurement.

III.E-2.c Renaturation des scFv purifiés

Après purification, les scFv toujours sous forme dénaturée sont renaturés par des dialyses successives en diminuant progressivement la concentration en urée et leur concentration est ajustée avant renaturation comme le recommandent plusieurs travaux (Tsumoto *et al.*, 1998 ; Padiolleau-Lefèvre *et al.*, 2007 ; Ben Naya *et al.*, 2013). Dans le cas des scFv ici étudiés, nous avons mesuré la concentration des scFv élués par le test BCA (*bicinchoninic acid test*) et l'avons finalement ajustée à 10 μ M.

Le protocole de renaturation est un élément clé pour un repliement correct. L'agent chaotropique utilisé pour la solubilisation des corps d'inclusion est ici l'urée 8M, et la renaturation suppose l'élimination progressive et maîtrisée de ce composé. Plusieurs additifs sont en outre utilisés pour induire un environnement oxydo-réducteur favorable et permettre *in fine* de recouvrir la fonctionnalité de la protéine recombinante :

- La L-Arginine pour limiter la formation d'agrégats
- Le couple glutathion en forme réduite et oxydée pour favoriser la formation des ponts disulfures

- Le tampon Phosphate afin d'éliminer l'arginine et obtenir la protéine à pH neutre.
- La composition des bains de dialyse successifs est répertoriée dans le tableau III-5.

Tableau III- 5: Protocole de Renaturation suivi pour les scFv sélectionnés.

Bain de dialyse	Composition des tampons de dialyse
N°1	Urée 8M+Tris 0.1M pH 8
N°2	Urée 4M + Arginine 0.4M +Tris 0.1M pH 8
N°3	Urée 2M + Arginine 0.4M +Tris 0.1M pH 8
N°4	Urée 1M + Arginine 0.4M +Tris 0.1M pH 8+ Glutathion oxydé 250µM et réduit 2.5mM
N°5	Urée 0.5M + Arginine 0.4M +Tris 0.1M pH 8+ Glutathion oxydé 250µM et réduit 2.5mM
N°6	Arginine 0.4M +Tris 0.1M pH 8
N°7	Tampon phosphate 0.1M pH 7.4

Enfin, un balayage spectral de 220 à 400 nm permet de contrôler la présence d'un pic unique à 280 nm, reflétant la présence de protéine soluble, et surtout l'absence d'un épaulement vers 320nm, reflétant le cas échéant la présence d'agrégats sub-microniques (Umetsu *et al.*, 2003).

Enfin, l'échantillon est soumis à un dosage BCA, réalisé avant et après 10 minutes de centrifugation à 12 000g. La quantité de scFv récupérée après renaturation varie entre 7 et 11 µM (Tableau III-6). Pour rappel, la concentration avait été ajustée avant refolding à 10µM, aux erreurs d'incertitudes près. Les valeurs de 7 à 11 µM sont donc cohérentes. Les valeurs inférieures à 10µM souvent obtenues s'expliquent par le fait que si de la protéine non refoldée est encore présente après renaturation, celle-ci sera éliminée par centrifugation. Le dosage comparatif par BCA permettra non seulement de s'assurer qu'aucune quantité résiduelle de protéine agrégée n'est présente (ou tout au moins que cette quantité est faible), mais également de déterminer la concentration finale de protéine effectivement soluble.

Tableau III- 6: Bilan de la quantité des scFv récupérée après la purification et après renaturation, à partir d'une culture cellulaire de 500 mL.

Clones	Après purification		Après renaturation	
	Concentration (µM)	Rendement (mg/L)	Concentration (µM)	Rendement (mg/L)
SOMa	87.72	23.99	11.1	2.42
3A8	108.94	29.34	10.92	2.32
SOKMc 3	15.53	4.47	7.79	1.71
SOKMc 5	52.76	14.26	9.65	2.14

Une illustration typique de balayage spectral d'un échantillon contenant quelques protéines non repliées avant centrifugation, et ce même balayage spectral sur échantillon après centrifugation est présentée en figure III-26. Outre le léger épaulement vers 320 nm qui disparaît après centrifugation, on observe une absorbance à 280 nm moindre entre l'échantillon avant et après centrifugation, illustrant l'élimination des protéines non repliées (Tsumoto *et al.*, 1998 ; Umetsu *et al.*, 2003 ; Ben Naya *et al.*, 2013).

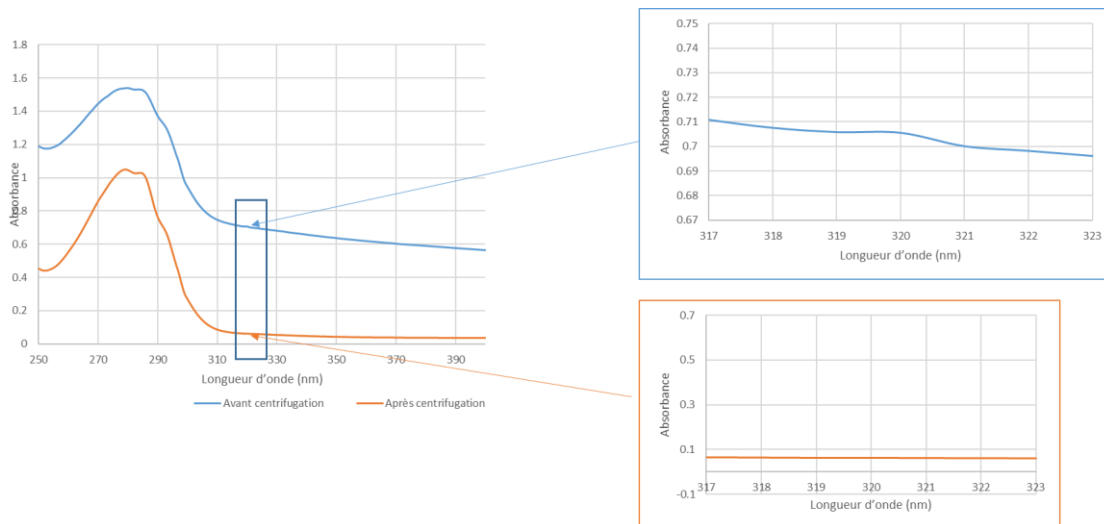


Figure III- 26: Balayage spectral du scFv 3A8 avant et après centrifugation (respectivement en bleu et en orange), montrant le pic du scFv soluble à 280 nm et l'épaule du résidu non renaturé vers 320 nm avant centrifugation.

III.F. Caractérisation biochimique et validation de la fonctionnalité

L'expression d'un scFv sous forme soluble en tampon physiologique ne signifie pas forcément le maintien de sa fonctionnalité. Dans le cadre de notre étude, la confirmation de la capacité de reconnaissance de la MC-LR par les scFv renaturés a été vérifiée par l'application de plusieurs techniques différentes :

- 1- ELISA sandwich direct
- 2- Western Blot
- 3- Etude des interactions protéiques par Résonance Plasmonique de Surface (SPR)
- 4- ELISA de déplacement par compétition.

III.F-3. Confirmation de la capacité de reconnaissance par ELISA sandwich direct

Afin de confirmer la reconnaissance des scFv sélectionnés vis-à-vis de la MC-LR, un ELISA sandwich direct a été réalisé. Le principe repose sur l'immobilisation au fond de la plaque de microtitration de l'OVA-MC suivie de l'incubation avec les différents scFv sélectionnés porteurs de l'étiquette His₆. L'éventuelle formation d'un complexe est ensuite révélée par des anticorps secondaires anti-Histidine couplés à l'HRP (schéma rappelé en encadré de la figure III-27).

Le signal ainsi obtenu, est comparé d'une part à un anticorps commercial MC10E7, et d'autre part à un contrôle négatif, dans lequel l'OVA non conjuguée est immobilisée. Les conditions précises de cette technique sont rappelées en Annexe I-11.a.

Les figures III-27 et 28 illustrent les résultats obtenus pour les 4 scFv et le MC10E7 respectivement.

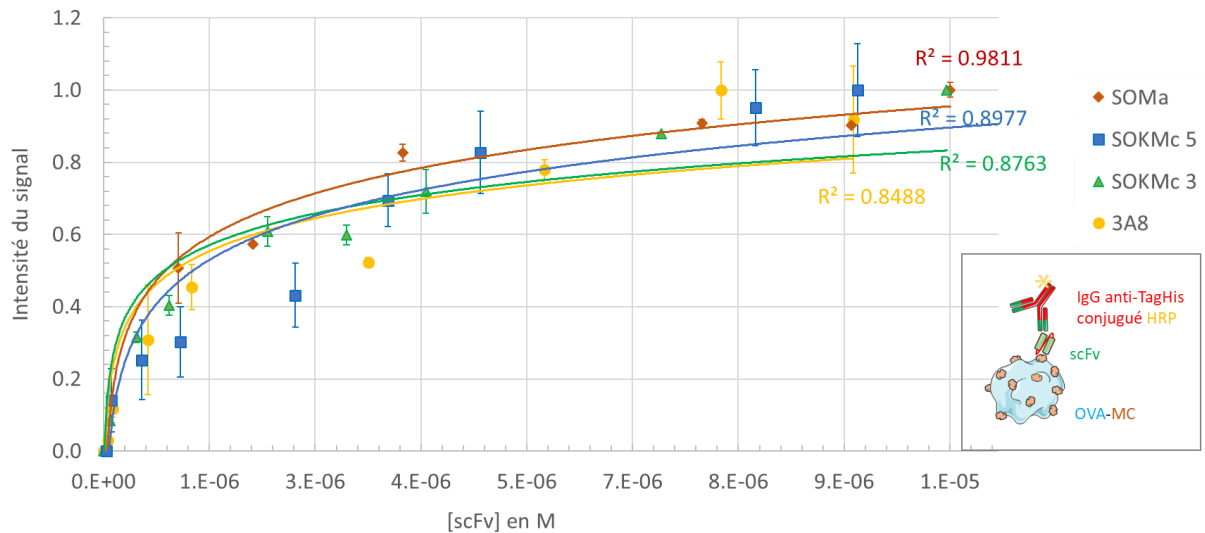


Figure III- 27: Évaluation de la reconnaissance de l'OVA-MC par les différents scFv par ELISA sandwich direct. L'encadré illustre le format de cette expérience.

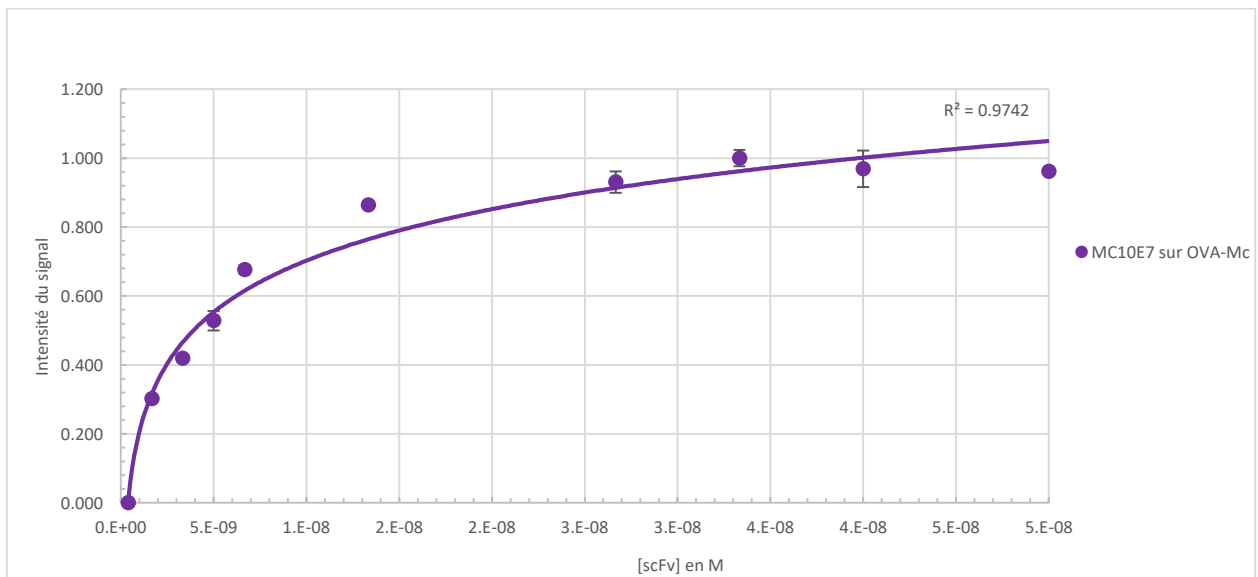


Figure III- 28: Résultat du test ELISA de reconnaissance de l'OVA-MC par l'IgG MC10E7. L'encadré illustre le format de cette expérience.

Les témoins négatifs ont été réalisés sur de l'OVA seule, pour des concentrations en scFv variant de 2 à 4 μM selon les scFv. Les valeurs obtenues sont généralement comprises entre 15 et 30% du signal obtenu sur l'OVA-MC. Mais il est essentiel de noter qu'elles sont peu reproductibles et peuvent être anormalement plus élevées. Ce manque de reproductibilité, associé à une valeur parfois anormalement élevée, peut refléter des problèmes de *refolding* des scFv solubles selon les lots de production. Néanmoins, ces résultats confirment que les scFv sélectionnés en surface de phages sont tous capables de reconnaître la MC-LR une fois produits sous forme solubles, lorsque les conditions de renaturation sont favorables. Si on focalise notre attention sur la première partie des courbes obtenues (Figure III-27), les résultats suggèrent que SOKMc3 pourrait-être le scFv reconnaissant le mieux la MC-LR, suivi respectivement des scFv 3A8, SOMa et SOKMc5. Pour autant, il ne s'agit là que d'une estimation et des investigations qualitatives plus rigoureuses sont nécessaires pour confirmation.

III.F-1. Western Blot

Pour évaluer la reconnaissance entre la MC-LR et les 4 scFv, un Western Blot a été réalisé selon le format présenté en figure III-29.

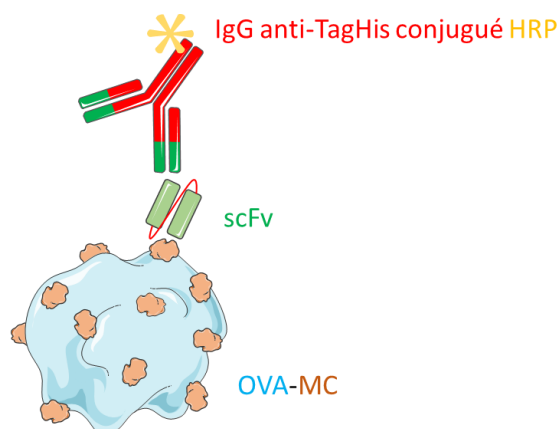


Figure III- 29: Format de révélation du Western Blot effectué pour la validation de la fonctionnalité des scFv sélectionnés contre la MC-LR.

Après migration de l'OVA-MC sur un gel de SDS-PAGE et transfert sur membrane de nitrocellulose, les 4 scFv ont été indépendamment ajoutés. La révélation est assurée par un anticorps secondaire spécifique du Tag-His des scFv, couplé à l'HRP. Un témoin positif a été utilisé en incubant la membrane avec l'anticorps commercial MC10E7 dirigé contre la MC-LR, la révélation étant alors assurée par un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'HRP.

Cette expérience a été répétée à trois reprises et, en dépit d'un balayage de diverses conditions expérimentales, nous n'avons pas été en mesure d'observer une reconnaissance de l'OVA-MC par aucun des 4 scFv. En revanche, le témoin positif avec MC10E7 a fonctionné, indiquant que ni le couplage de la MC-LR à l'OVA, ni même le transfert ne peuvent être remis en cause. Ce résultat pourrait s'expliquer par un problème de fonctionnalité des scFv, qu'il s'agisse d'un souci de renaturation des scFv, ou d'une perte de leur fonctionnalité une fois les scFv solubles (et non plus en surface de phage), ou éventuellement par un souci ponctuel de reconnaissance par l'anticorps secondaire anti-histidine. Un travail de mise au point plus fin est donc nécessaire. Quoiqu'il en soit, au regard de ce résultat, nous avons décidé d'explorer l'approche par SPR afin de s'affranchir d'un quelconque marquage, que ce soit de l'anticorps ou de la cible elle-même.

III.F-2. - Etude des interactions protéiques par SPR.

Comme évoqué dans le 1^{er} chapitre I.E-4.c, la SPR est utilisée pour l'étude des interactions entre deux molécules en temps réel, au niveau d'une interface solide liquide. Cette analyse a été réalisée au sein de notre laboratoire avec le biocapteur BIAcore® T100 (GE-Healthcare). Lors de la mise au point de cette approche, il est nécessaire de choisir quelles molécules joueront les rôles respectifs de ligand et d'analyte, de prévoir quel niveau d'immobilisation sera visé, et enfin si la puce sera régénérée entre chaque injection (mode Steady state ou Kinetic, auquel cas il convient de déterminer quelles seront les conditions de régénération appliquées) ou pas (mode Single cycle kinetic).

III.F-2.a- Choix du format de capture

Nous avons utilisé une puce CM5 (BIAcore, GE-Healthcare) comme support d'immobilisation. Cette puce est la plus polyvalente et la plus couramment utilisée pour l'immobilisation covalente. Elle est

constituée de chaînes de dextrans portant des groupements carboxyles chargés négativement. Ces chaînes de dextrans sont très hydrophiles, flexibles, et possèdent de bonnes capacités de liaison. En outre, ces puces sont assez faciles à activer, permettant *a priori* d'immobiliser la plupart des ligands (Figure III-30).

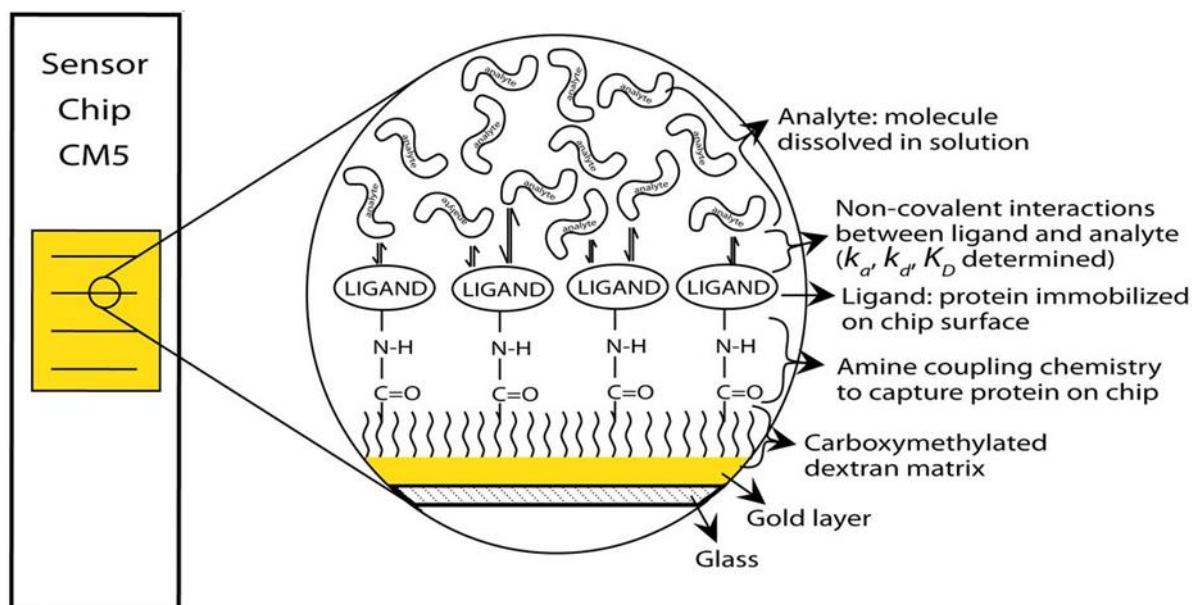


Figure III- 30: Surface d'une sensor chip CM5. Source : Littlechild et al., 2012.

Afin d'étudier l'interaction entre les scFv et la MC-LR, deux formats de capture sont possibles :

- 1- Immobiliser la MC-LR comme ligand. L'avantage de ce format est qu'il permet de fixer la MC-LR sur une piste et d'analyser les différents scFv dans les mêmes conditions. Ce format possède également en théorie une meilleure sensibilité, la MC-LR étant plus légère que les scFv ($Mw_{MC-LR}=995.2 \text{ Da}$ vs $Mw_{scFv}\approx 30 \text{ kDa}$). Néanmoins, au regard de la structure de la MC-LR, ce format s'avère peu judicieux car le seul site NH_2 libre de la MC-LR est localisé au niveau de l'Arginine, et que ce résidu constitue également l'épitope reconnu par les témoins positifs que nous utiliserons par la suite, à savoir les anticorps commerciaux AD4G2 et MC10E7. Impliquer l'arginine dans la liaison covalente au support ne permettra donc pas de laisser l'épitope accessible aux futurs analytes que seront AD4G2, MC10E7, voire peut-être nos scFv.
- 2- Immobiliser indépendamment chaque scFv sur la puce (Figure III-31). Cette approche suppose néanmoins plusieurs limites:
 - i. Utilisation de plusieurs pistes (en l'occurrence une par scFv) ;
 - ii. Sensibilité moindre au regard du rapport des masses moléculaires, pour les mêmes raisons que celles évoquées juste avant ;
 - iii. Et surtout risque de perturber la stabilité et d'altérer la conformation du scFv immobilisé lors de l'étape de régénération de la piste.

Malgré ces limites, cette seconde option reste la plus pertinente puisqu'elle permet l'exposition des scFv sous différentes orientations, ceux-ci possédant plusieurs extrémités NH_2 . La probabilité que le paratope soit masqué par les conditions d'immobilisation se trouve donc réduite.

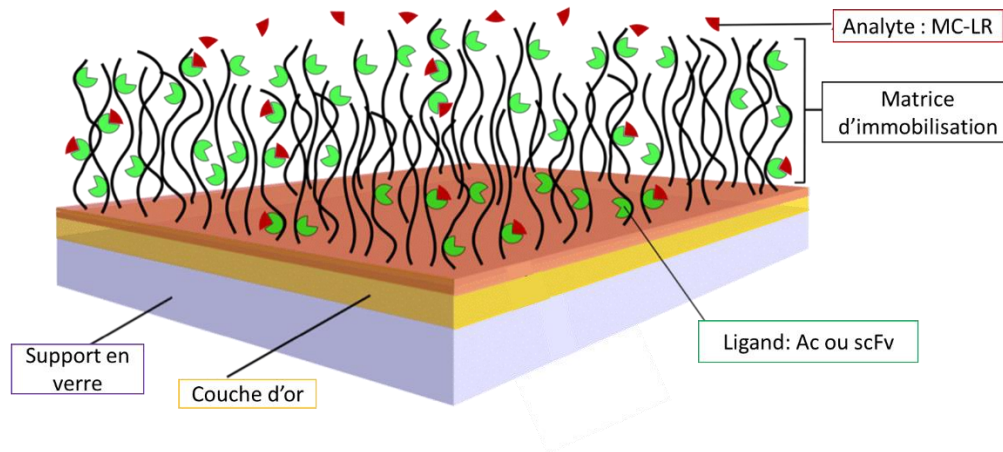


Figure III- 31: Format de capture choisi. Inspiré de : <https://bitesizebio.com/34644/biosensor-chips-surface-plasmon-resonance/> consulté le 25/01/2018.

III.F-2.b- Immobilisation du ligand sur la sensor chip

L'immobilisation du ligand sur la *sensor chip* est la première étape. Elle est indépendante de l'analyse des interactions et consiste en la liaison covalente du ligand à la surface CM5.

Elle comprend trois étapes :

1. Activation des fonctions carboxyliques de la surface par une injection d'EDC (1-Ethyl-3- (3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide et de NHS (N- HydroxySuccinimide). Cela induit la formation d'esters en surface.
2. Injection du ligand et formation des liaisons covalentes via les fonctions amine primaires accessibles sur le ligand.
3. Blocage des sites d'interaction résiduels : L'excès de fonctions NHS-ester est inactivé par une injection d'éthanolamine permettant la neutralisation des groupements COO^- résiduels.

Par ailleurs, l'immobilisation dépend de deux facteurs :

1. Le choix du tampon d'immobilisation

Le tampon d'immobilisation à utiliser doit répondre à des critères précis de pH et de salinité. Le pH doit être compris entre 3.5 et le point isoélectrique (pI) de la protéine à immobiliser afin de favoriser l'attraction du ligand vers la surface de la *sensor chip* par interactions électrostatiques.

- Si $\text{pH} < 3.5$: surface non chargée et absence d'attraction électrostatique.
- Si $3.5 < \text{pH} < \text{pI}$: surface chargée négativement et ligand chargé positivement : le pH favorise alors l'interaction électrostatique.
- Si $\text{pH} > \text{pI}$: ligand et surface chargés négativement : Répulsion électrostatique.

Le pI théorique de chaque scFv a été évalué en fonction de sa séquence (Tableau III-7). Enfin, le mode opératoire stipule que l'immobilisation doit être réalisée dans un tampon faiblement salin, tel qu'une solution d'acétate de sodium 10 mM.

2. Le niveau d'immobilisation

Le niveau d'immobilisation (R_L) du ligand à la surface de la *sensor chip* doit être estimé en fonction du R_{max} souhaité, des masses moléculaires (M_w) de l'analyte et du ligand, et de la stœchiométrie de l'interaction (S_m), par la relation suivante :

$$R_{\max} = \frac{Mw_{\text{analyte}}}{Mw_{\text{Ligand}}} \times R_L \times S_m$$

- Le R_{\max} correspond au niveau de réponse maximum observable lors de l'interaction ligand-analyte.
- La stœchiométrie (S_m) correspond au nombre de site(s) de liaison porté par le ligand. Dans notre cas, lorsque le ligand est un scFv, alors $S_m = 1$, tandis que lorsque le ligand est un anticorps commercial (AD4G2 ou MC10E7), alors $S_m = 2$.
- D'une manière générale, le niveau d'immobilisation R_{\max} pour un BIAcore® T100 doit être compris entre 100 et 200 RU (recommandations opératoires). Donc, dans le cas où le ligand est un scFv ($Mw \approx 28\ 000$ Da) et l'analyte est la MC-LR ($Mw = 995.2$ Da), le niveau d'immobilisation R_L ciblé doit être compris entre 2 800 et 5 630 RU. En revanche, dans le cas où le ligand est une IgG ($Mw \approx 150\ 000$ Da), le R_L ciblé doit être compris entre 7 540 et 15 070 RU.

Tableau III-7: Masses moléculaires et points isoélectriques théoriques des 4 scFv calculés grâce à l'outil ProtParam, disponible sur ExPASy.

Clone	Masse moléculaire (Da)	Point isoélectrique
SOMa	27 206.33	8.76
SOKMc3	27 476.44	8.72
SOKMc5	27 656.66	7.71
3A8	26 590.38	6.65

<http://web.expasy.org/protparam/>

Enfin, notons qu'il est indispensable de comparer les résultats obtenus à une surface de référence. Cette surface de référence est soit une surface non traitée, soit une surface activée à l'EDC/NHS puis bloquée à l'éthanolamine. Dans le cadre de ces travaux, la puce de référence est une puce activée à l'EDC-NHS, bloquée à l'éthanolamine.

III.F-2.c- Notion de régénération.

Différentes options de régénération sont envisageables : Si le ligand est assez stable, alors la puce peut être régénérée entre chaque injection. Cela sous-entend que l'analyte doit être dissocié de sorte à retrouver une surface de capture initiale, mais que le ligand en revanche, lié de manière covalente, doit rester lié à la *sensor chip* et sa fonctionnalité rester intègre, et cela en dépit des injections répétées. Dans ce cas, les conditions de régénération doivent être à la fois suffisamment douces pour ne pas altérer la puce, mais néanmoins suffisamment drastiques pour éliminer complètement les molécules d'analyte encore liées à la surface. Classiquement, une solution acide, glycine HCl 10mM à $\text{pH} \leq 3$, ou inversement une solution basique tel que NaOH (1 à 100mM) sont utilisées.

C'est l'approche que nous avons utilisée lorsque le ligand était l'anticorps commercial AD4G2 ou MC10E7, les IgG étant réputées stables (mode Multiple cycle, Steady state). La solution de régénération utilisée dans ces cas a été NaOH 2.5 mM, injecté à un débit de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ pendant 1 minute. Le protocole détaillé est indiqué en annexe I-11.b.

Si en revanche le ligand est peu stable, alors la puce peut ne pas être régénérée entre chaque injection. Pour cela on utilise le mode « Single cycle kinetic ». Celui-ci permet d'injecter des concentrations croissantes successives d'analyte et tient compte, après chaque injection, du nombre de sites de capture encore disponibles, afin *in fine* de calculer les paramètres cinétiques d'interaction. Cette approche

s'avère tout à fait pertinente lorsque les conditions de régénérations sont difficiles à développer. Les différents essais développés ont montré qu'après régénération, le risque de perdre la fonctionnalité des scFv était important. Pour cette raison, nous avons retenu le mode Single cycle kinetic lorsqu'un scFv était utilisé comme ligand, contrairement à l'approche suivie pour les anticorps entiers (IgG).

III.F-2.d- Résultats de SPR sur les anticorps commerciaux et les scFv sélectionnés.

Analyse des anticorps commerciaux AD4G2 et MC10E7

Une analyse des anticorps AD4G2 et MC10E7 est essentielle. Outre le fait que ces anticorps constituent des témoins positifs de nos expériences, déterminer leurs K_D respectifs permettra de disposer de valeurs de références, dans des conditions expérimentales similaires à celles des scFv sélectionnés. En outre, le format d'immobilisation choisi (à savoir les anticorps ou scFv immobilisés (ligand) *vs* la MC-LR circulante (analyte)) permet de s'affranchir de l'impact de l'avidité éventuellement liée à la bivalence des IgG sur l'estimation de la constante de dissociation à l'équilibre K_D , justifiant ainsi de comparer les scFv et les IgG à valence équivalente.

D'un point de vue expérimental, les anticorps ont donc été injectés sur la puce CM5 à un débit de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ pendant 8 minutes jusqu'à atteindre un niveau d'immobilisation de 20772 RU pour AD4G2 et 20745 RU pour MC10E7. Les R_{max} théoriques pour AD4G2 et MC10E7 sont donc respectivement de 275.6 et 275.3 RU. Puis différentes concentrations de MC-LR, variant de 0 à 10 nM sont injectées à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ pendant 5 minutes. Après chaque injection, la puce est régénérée par injection de 10 μl de tampon de NaOH 2.5 mM à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Les sensorgrammes ainsi obtenus sont traités avec le logiciel BIAeval permettant un ajustement des données expérimentales à un modèle mathématique. Les sensorgrammes présentés dans la figure III-32 montrent les interactions spécifiques de l'AD4G2 et du MC10E7 vis-à-vis de la MC-LR, après soustraction des signaux non spécifiques obtenus sur la piste référence.

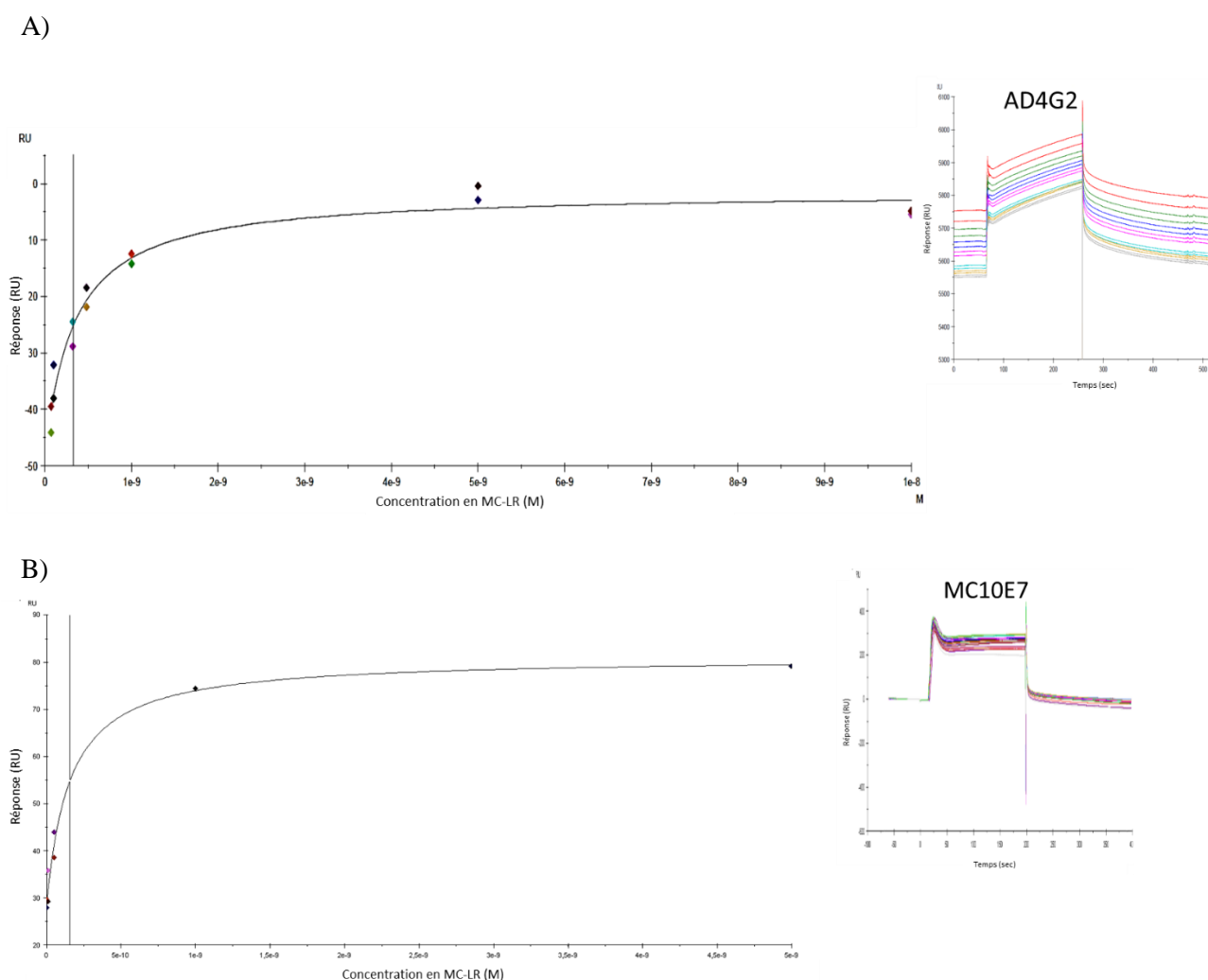


Figure III- 32: Interaction entre la MC-LR et les anticorps commerciaux AD4G2 (A) et MC10E7 (B). Résultats de SPR alignés grâce au modèle « Steady State Affinity ». En encadrés, les sensorgrammes expérimentaux respectifs résultant d'injections répétées de MC-LR à des concentrations variant de 0 à 10nM.

L'analyse de ces résultats a permis de déterminer des K_D de 0.33 nM et de 0.15 nM respectivement pour AD4G2 et MC10E7 (Tableau III-8), suggérant une interaction de forte affinité pour la MC-LR.

A noter que ces valeurs sont conformes ou proches de celles obtenues par Zeck *et al* (2001-A et B), à savoir 0.33 nM et 0.06 nM, respectivement pour AD4G2 et MC10E7 (Chap 2 Tableau II-3). Les valeurs de χ^2 sont faibles et permettent de valider la pertinence du *fitting*. Enfin, les R_{max} mesurés sont de 46.9 et 52.3 RU respectivement, soit inférieurs aux R_{max} théoriques cités précédemment. Ces observations restent fréquentes et ne remettent pas en cause la validité des résultats.

Tableau III-8: Résultats de l'analyse par SPR menée sur les anticorps commerciaux vis-à-vis de la MC-LR, déterminés par le logiciel BIAevaluation en appliquant le modèle « Steady State Affinity ».

IgG	K_D (nM)	R_{max} mesuré (RU)	χ^2
AD4G2	0.33	46.91	8.41
MC10E7	0.15	52.27	7.84

Analyse des scFv sélectionnés

- Cas du scFv 3A8

Comme indiqué dans le paragraphe relatif à la notion de régénération, les scFv sont trop peu stables pour supporter les conditions de régénération sans risquer d'induire une perte totale ou partielle de leur fonctionnalité. Nous avons donc eu recours à la méthode Single Cycle Kinetics afin de nous affranchir des étapes de régénération. Le logiciel BIAcore® T100 Evaluation Software calcule ainsi la constante d'association à partir de cinq injections successives.

50 µg/ml de scFv 3A8 dilués en acétate de sodium 10 mM pH 3.5 ont été injectés sur la puce CM5 à un débit de 3 µl/min pendant 8 minutes, jusqu'à atteindre un niveau d'immobilisation de 3 500 RU, induisant un R_{max} théorique 124 RU. Cinq concentrations croissantes successives de MC-LR ont ensuite été injectées à 10 µl/min pendant 500 secondes (50 - 150 - 300 - 500 et enfin 750 nM). Le protocole détaillé est indiqué en annexe I-11.c. Le sensorgramme obtenu avec 3A8 est présenté en figure III-33. Un traitement de ces données par BIAeval a permis d'obtenir les données référencées dans le tableau III-9, suggérant une affinité de 3A8 pour la MC-LR de l'ordre de 75.5 nM. Ce résultat reflète une bonne affinité, mais est inférieur à ce qui a été observé avec les anticorps de références AD4G2 ou encore MC10E7. Le R_{max} mesuré reste assez proche du R_{max} théorique (respectivement 110.6 RU et 124 RU), mais le χ^2 est pour sa part relativement élevé.

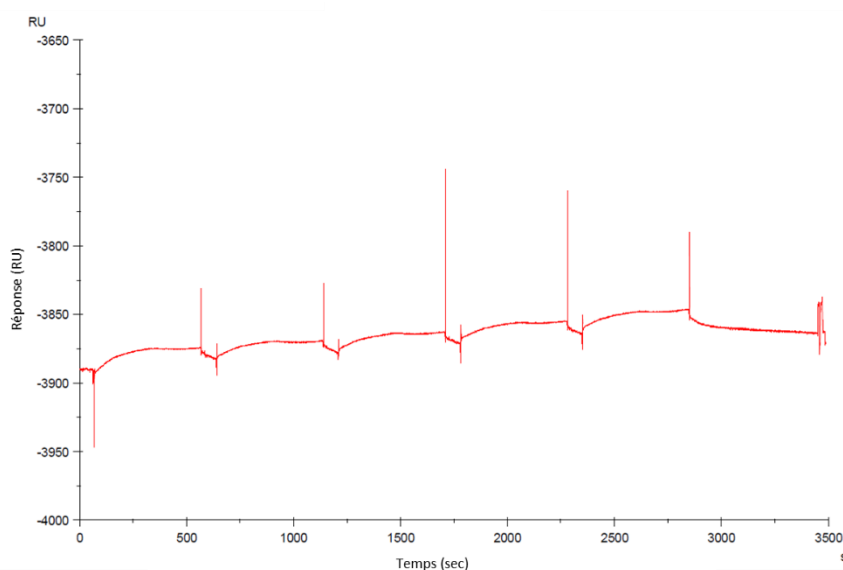


Figure III- 33: Analyse et paramètres d'affinité du 3A8 pour la MC-LR représentés respectivement. A) Sensorgramme expérimental obtenu par la méthode Single Cycle Kinetics.

Tableau III- 9: paramètres obtenus grâce au modèle « Steady State Affinity ».

scFv	K_D (nM)	R_{max} mesuré (RU)	χ^2
3A8	75.5	110.6	394

- Cas des scFv SOMa, SOKMc3 et SOKMc5

Nous avons procédé à plusieurs essais pour immobiliser ces 3 scFv sur une puce CM5, en utilisant les conditions expérimentales appliquées avec succès sur 3A8. Toutefois, ces tentatives se sont révélées

infructueuses. Il y a pour cela deux hypothèses possibles, comme le cofirme le support technique de Biacore® :

- Soit le tampon d'immobilisation choisi, bien que très classique (acétate de sodium 10 mM pH compris entre 3.5 et 8), est inadapté et ne permet pas de créer une quelconque attraction entre la *sensor chip* et le ligand,
- Soit les scFv ici testés sont mal repliés, générant l'exposition inhabituelle de charges ou de zone hydrophobes, induisant à nouveau une non-attraction électrostatique des scFv sur la puce CM5.

Afin de tester la première hypothèse, l'outil « pH-scouting » du système BIACore® a été exploité, en balayant des pH variant de 3,5 à la valeur du pI du scFv concerné. Aucune des conditions testées ne nous a permis d'immobiliser les scFv. En ce qui concerne la salinité du tampon d'immobilisation, les recommandations commerciales préconisent un tampon faiblement salin où la concentration en NaCl doit être inférieure à 50 mM. Notre dernier tampon de dialyse est un tampon phosphate 0,1M, cela ne doit pas en principe impacter la concentration en NaCl. Mais au regard de la littérature, nous avons fait varier le dernier tampon de dialyse de notre procédé de renaturation afin d'avoir directement le scFv dans le tampon d'immobilisation (Devlin *et al.*, 1995). Deux options ont été testées, à savoir (i) une dernière dialyse directement en acétate de sodium 10 mM avec balayage de différents pH (de 3.5 jusqu'au pI du scFv concerné), ou (ii) une dernière dialyse en tampon de course BIACore® (HBS-P). Là encore, aucune des conditions testées n'a permis d'immobiliser les scFv.

Il semble donc que la renaturation des scFv soit en cause dans cette expérimentation. Un travail de fond sur la renaturation s'avère nécessaire. Il implique en particulier une amélioration des conditions de renaturation des scFv et une optimisation de plusieurs facteurs en particulier le pH et la concentration d'arginine et son temps d'action.

III.F-4. Confirmation de reconnaissance par ELISA compétitif

Ce test ELISA s'appuie sur le déplacement d'une interaction pré-établie entre la cible et les fragments d'anticorps par un compétiteur adapté, analogue de la cible. Il convient de noter que ce type d'ELISA est utilisé dans les kits commerciaux d'immunodosage de la MC-LR à partir d'échantillons réels prélevés sur le terrain. Ce constat illustre l'importance de la mise au point de cette approche pour une utilisation potentielle des scFv sélectionnés.

Ici, l'OVA-MC est immobilisée, puis incubée avec les scFv solubles. Le déplacement de cette interaction est évalué en présence de MC-LR libre ajouté à une concentration largement supérieure à celle de la MC-LR couplée à l'ovalbumine. Enfin, le complexe scFv/OVA-MC éventuellement résiduel sur la plaque est révélé par un anticorps anti-His couplé à l'HRP. Le protocole détaillé est indiqué en annexe I-11.d. Une diminution du signal reflète donc la reconnaissance du scFv pour la MC-LR libre. Le principe général est représenté dans la figure III-34.

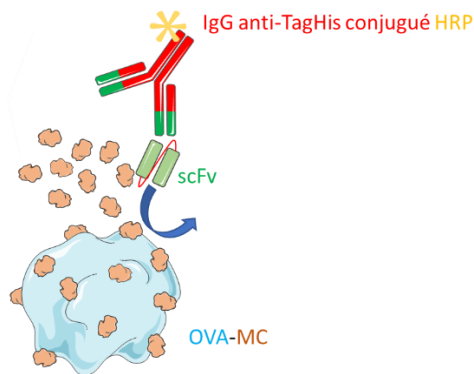
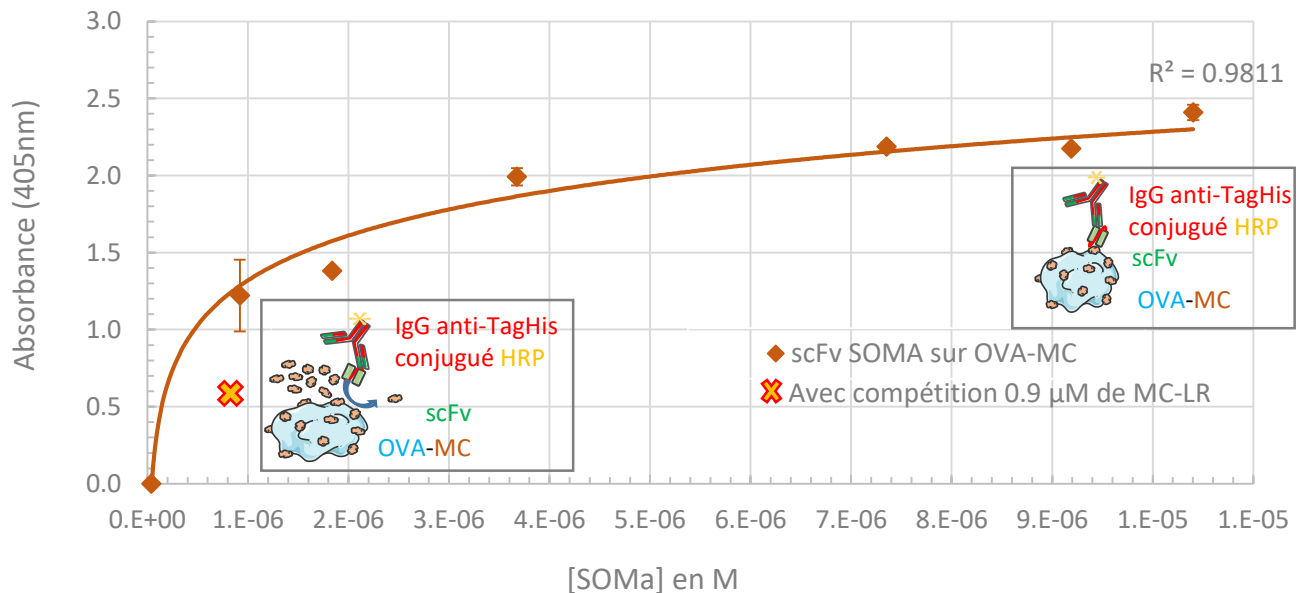


Figure III- 34: Principe de l'ELISA compétitif effectué pour la confirmation de la spécificité de reconnaissance de la MC-LR par les scFv.

Pour réaliser ce test de déplacement, nous nous sommes appuyés sur le test ELISA sandwich direct préalablement présenté, afin de déterminer la concentration fixe nécessaire en scFv pour chaque test de compétition. Celle-ci doit en effet être comprise entre 30 et 50% du signal de saturation obtenu dans l'ELISA sandwich direct décrit dans le paragraphe précédent. L'idéal est de faire varier la concentration en compétiteur (ici la MC-LR libre), mais pour des raisons de quantités limitées et de coût, une unique concentration en MC libre a été utilisée et déterminée de telle sorte qu'elle soit supérieure à la concentration estimée en MC liée à l'Ovalbumine. Les figures III-35.A et B représentent les résultats obtenus respectivement avec les scFv SOMa et SOKMc3, pour lesquels la compétition est validée par diminution du signal sur un point unique.

A)



B)

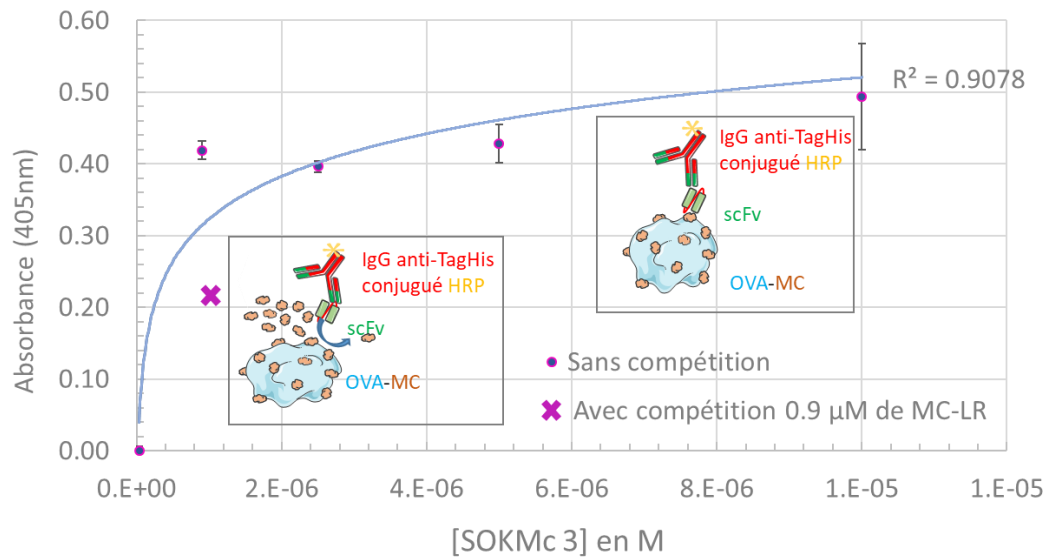


Figure III- 35: Spécificité de la reconnaissance de la MC-LR par les scFv SOMa (A) et SOKMc3 (B) par ELISA compétitif. Les encadrés illustrent les formats expérimentaux.

Cette expérience qui n'a pas encore pu être renouvelée pour les deux autres scFv (3A8 et SOKMc5) semble confirmer la reconnaissance spécifique de la MC-LR par les scFv.

Nous avons souhaité mettre la priorité sur la mise au point d'un test équivalent sur échantillons réels, prélevés sur le terrain par l'équipe du MNHN. Pour cela, nous avons utilisé en première intention l'anticorps commercial AD4G2. Le principe, illustré en encadré de la figure III-36, consiste donc en l'immobilisation de l'OVA-MC au fond d'une plaque de microtitration. L'interaction avec AD4G2 est déplacée de manière dose-dépendante par la présence de MC-LR contenue dans l'extrait brut d'un échantillon prélevé sur le terrain. La révélation est assurée par un anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué à l'HRP.

Vers la caractérisation des fragments d'anticorps sélectionnés contre la MC-LR

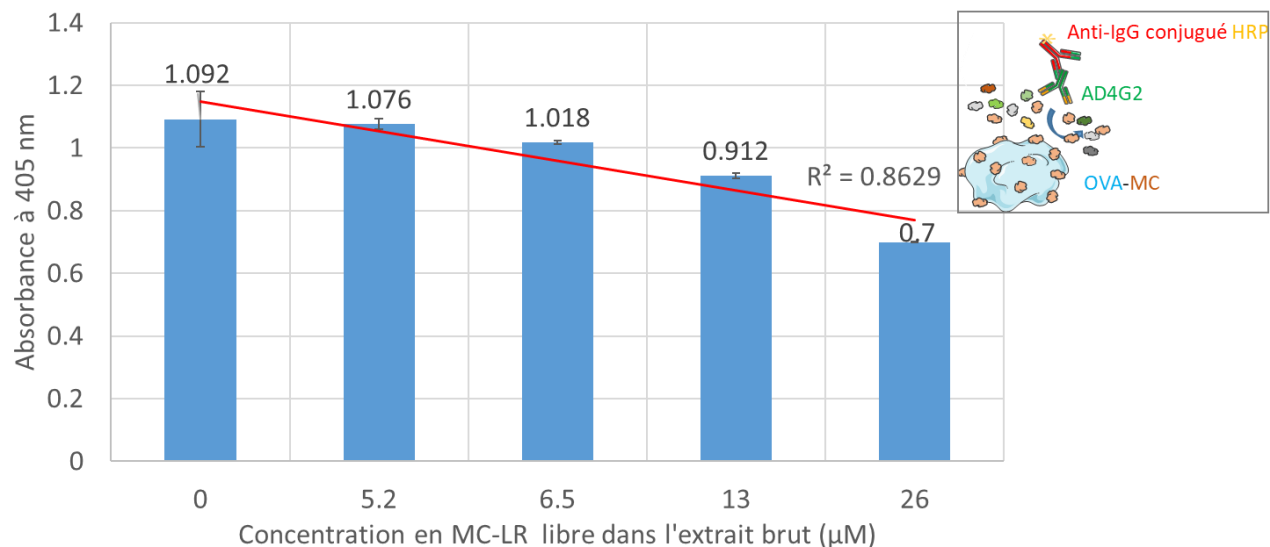


Figure III- 36: Détection par ELISA compétitif de la MC-LR à partir d'un extrait brut, contenant entre autres de la MC-LR libre, prélevé sur le terrain, en utilisant l'anticorps commercial AD4G2. L'encadré illustre le format expérimental.

Le graphique obtenu montre une extinction du signal proportionnelle à la quantité de MC-LR ajoutée dans l'extrait brut, confirmant l'effet de compétition de la MC-LR libre. Un rapide balayage des concentrations de MC-LR suggère en outre qu'une concentration en MC-LR de 13 μM est suffisante pour induire une diminution significative du signal initial.

Pour rappel, l'OMS exige une teneur maximale de 1 $\mu\text{g/L}$ de MC-LR (soit 1 nM). Avec une limite de détection de la MC-LR qui est de 0.07 $\mu\text{g/L}$ (= 0.07 nM), l'anticorps AD4G2 satisfait à ces exigences (fournisseur : Enzo). Dans les conditions expérimentales non-optimisées que nous avons mis en place ici, ce seuil n'est pas atteint. Il est vraisemblable que les conditions de températures, les durées d'incubation, l'immobilisation de la cible, et surtout le choix du marqueur couplé à l'anticorps de révélation méritent d'être améliorés.

IV

Discussion, Perspectives & Conclusion

A- Bilan des résultats

B- Perspectives

C- Conclusion

Comme évoqué dans le présent manuscrit, les cyanobactéries sont des micro-organismes procaryotes qui, sous l'influence de multiples facteurs environnementaux, prolifèrent dans les milieux aquatiques et produisent des cyanotoxines pouvant avoir de lourdes conséquences sur la santé publique, notamment à travers l'ingestion d'eau contaminée. Certaines cyanotoxines sont des hépatotoxines, telles les microcystines (MC), dont il existe au moins 200 variants. Cette étude se focalise sur la MC-LR, un heptapeptide monocyclique, en raison non seulement de sa fréquence, mais aussi de sa forte toxicité.

Au regard des risques associés à la consommation d'eaux contaminées et de l'intérêt porté par les autorités à la qualité de l'environnement, il est aujourd'hui nécessaire de développer une méthode rapide, sensible et fiable pour détecter les microcystines. Les méthodes de détection actuelles sont principalement des méthodes physicochimiques, basées sur des techniques analytiques et biologiques, qui présentent une bonne sensibilité mais nécessitent un personnel hautement qualifié, un matériel coûteux et un traitement préalable des échantillons à analyser. Dans ce contexte, il convient de concevoir des approches innovantes pour détecter les MCs, les différencier, les quantifier et évaluer les risques pour la santé humaine ou animale. Dans ce contexte, les méthodes immunochimiques constituent une approche prometteuse, mais la sélection et l'identification d'anticorps adaptés est délicate. A ce jour, seuls deux anticorps monoclonaux anti-MC, dont la séquence n'est pas publiée, sont disponibles commercialement. Il s'agit de l'anticorps AD4G2 capable de reconnaître toutes les MC sans discrimination, et de l'anticorps MC10E7 de spécificité restreinte aux MC de type R4 (arginine en position 4). L'absence de connaissances relatives à la séquence de ces anticorps commerciaux est une limitation à l'ingénierie des anticorps et préjudiciable à l'analyse et l'interprétation des expérimentations conduites avec ces anticorps, comme le soulignent dans un cadre plus générale l'appel de 112 chercheurs dans la revue scientifique Nature (Bradbury and Plückthun, 2015).

L'objectif de cette étude était donc de produire de nouveaux anticorps de séquence connue contre la microcystine afin de développer des tests d'immunodétection robustes, sensibles et rapides. Pour cela, nous avons exploité la technologie du phage display pour sélectionner des fragments d'anticorps spécifiques de la MC-LR, éventuellement susceptibles de réagir avec l'ensemble des MCs ou, au contraire, avec des sous-groupes plus spécifiques.

IV.A- Bilan des résultats

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons souhaité contribuer à élargir l'éventail des outils utilisés dans la détection des MC, via la sélection d'anticorps ou de fragments d'anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR.

Notre discussion générale des résultats s'articule autour de deux volets : tout d'abord, le processus de sélection des fragments d'anticorps, puis, dans un deuxième temps, la caractérisation de l'activité des molécules sélectionnées et de leur spécificité.

IV.A-1. Sélection d'Anticorps ou de fragments d'Anticorps susceptibles de reconnaître la MC-LR

Il existe principalement deux méthodes pour obtenir des anticorps monoclonaux. La première est la technologie d'hybridomes via l'exploitation du système immunitaire suite à l'immunisation d'un animal avec un antigène spécifique. Ici, la sélection et la maturation d'affinité se déroulent *in vivo* d'une façon naturelle. Cette technique présente plusieurs limitations en raison des difficultés à déterminer un protocole d'immunisation des animaux efficace, en particulier lorsque l'antigène est un haptène peu ou pas immunogène comme c'est le cas avec la MC. L'instabilité des clones est également une limitation

importante car elle peut conduire à la perte de sécrétion avant même que les séquences des anticorps d'intérêt aient été identifiées, conduisant à l'arrêt de leur commercialisation comme nous l'avons constaté récemment avec l'anticorps AD4G2, ou parfois encore conduire à l'incapacité à reproduire des études.

Dans la seconde méthode, la sélection d'anticorps est conduite *in vitro* à partir d'un répertoire de gènes d'anticorps exprimés à la surface d'un bactériophage filamenteux. Cette méthode, dite "technologie du phage display", peut s'avérer plus rapide, plus robuste et moins coûteuse que la technique des hybridomes. Enfin, cette approche s'applique théoriquement aux anticorps de toutes espèces animales, alors que la technologie d'hybridation cellulaire (hybridome) reste limitée à quelques espèces animales (rongeur) et a constamment connu un échec dans le développement d'anticorps humains (Zhang, 2012).

Le principal avantage de la technologie du phage display est l'isolement direct de fragments d'anticorps actifs à partir d'une banque qui peut être naïve mais aussi immunisée, alors que les anticorps issus de la technologie des hybridomes sont obligatoirement obtenus après une immunisation laborieuse, parfois peu efficace comme le soulignent toutes les études conduites sur les adjuvants de vaccination. De plus, lors de l'immunisation, la génération d'anticorps par l'animal est limitée par son système immunitaire alors que le phage display contourne cette limitation et peut être constitué de plusieurs répertoires immuns au sein d'une même banque d'anticorps.

L'un des avantages des banques issues d'organismes immunisés est la maturation par affinité des anticorps ciblés. Ceci conduit à des anticorps ayant une affinité supérieure à celle des anticorps sélectionnés à partir d'une banque d'anticorps naïfs, ou bien, comme c'est le cas dans notre étude, provenant d'une immunisation indépendante de la protéine cible de la sélection, ici la MC-LR (Schirrmann *et al.*, 2011).

Avec les méthodes d'ingénierie moléculaire développées au fil du temps, différentes approches sont apparues pour augmenter la diversité de la banque d'anticorps et par la suite l'affinité des anticorps. Principalement deux stratégies ont émergé pour améliorer l'affinité. Il s'agit des mutations ciblées ou dirigées et des mutations non ciblées, également dites « aléatoires ».

Dans l'approche non ciblée, la mutagenèse se fait par l'intermédiaire de souches de *E. coli* mutantes (par exemple mutD5) ou de réactions PCR peu fidèles, encore appelées "error-prone PCR" (Low *et al.*, 1996 ; McCullum, 2010). Dans cette stratégie, l'affinité de l'anticorps est modifiée en introduisant des mutations dans toutes les régions des domaines variables de l'anticorps, qu'il s'agisse des CDRs ou des régions charpentes (*framework*), ce qui conduit à un élargissement du répertoire d'anticorps.

Les mutations ciblées sont basées sur l'introduction de diversités à des positions pré-déterminées. Dans cette technique, la diversité est, le plus souvent, introduite dans les sites de liaison à l'antigène, principalement dans les régions CDR. Plusieurs auteurs ont cependant montré que des mutations périphériques à ces régions peuvent également influencer sur l'affinité, voire la spécificité de l'anticorps (Ponsel *et al.*, 2011).

Bien que le phage display soit une technique polyvalente, plusieurs limitations lui sont encore associées. La qualité et la diversité des anticorps produits dépendent de l'origine de la banque, de sa diversité ainsi que des procédures de sélection utilisées (Rahbarnia *et al.*, 2016).

De plus, plusieurs études ont montré que l'amplification des banques de phages, qui est une étape essentielle dans la procédure de sélection, diminue leur diversité et limite le nombre de clones isolés lors de la sélection. Cette perte de diversité des banques provient de la compétition entre les clones de phages dans un pool de bactéries dont le taux de croissance va considérablement varier selon les clones de phages. Selon certains auteurs, un phage qui exprime à sa surface des peptides avec une structure

riche en feuillets β sur la protéine pIII s'amplifie plus rapidement que celui exprimant des peptides α -hélicoïdaux (Malik *et al.*, 1996 ; Rodi *et al.*, 2002).

Si l'amplification d'une banque de phages est associée à une perte de diversité, la solution la plus simple consiste à contourner complètement les étapes d'amplification. Cette méthode n'est habituellement pas privilégiée car le taux d'enrichissement sera faible. Elle a toutefois été utilisée avec succès dans plusieurs travaux (Williams and Sharon, 2002 ; Arap *et al.*, 2002).

Avec l'avènement du séquençage de nouvelle génération (NGS), l'analyse des répertoires des banques est devenue possible. Cette méthode est particulièrement utile pour les formats scFv, permettant le séquençage de plusieurs régions CDR des domaines V_H et V_L afin de construire le scFv le plus affin (Reddy *et al.*, 2010 ; Xu and Davis, 2000).

De nos jours, des plateformes automatisées peuvent permettre le processus de sélection par phage display. La procédure automatisée offre alors la possibilité de sélectionner des anticorps à partir d'une même banque, et contre de nombreux antigènes en parallèle. Ces plateformes robotiques, associées à un logiciel d'analyse et de stockage de données, permettent la sélection, l'analyse des données de liaison et des séquences d'ADN à chaque cycle de sélection (Ch'ng *et al.*, 2018).

L'objectif principal de cette étude étant de sélectionner de nouveaux anticorps spécifiques de la MC-LR, nous avons retenu deux approches complémentaires. La première a consisté à isoler un anticorps entier par la technologie des hybridomes, la seconde à isoler un fragment d'anticorps (scFv) par la technologie du phage display.

IV.A-1.a- Sélection d'anticorps par la technologie des hybridomes

En raison de sa nature et de sa faible masse moléculaire (995 Da), la MC-LR est peu ou pas immunogène (Flaherty, 2012). Pour cette raison, son utilisation comme cible nécessite une étape préalable de couplage à une protéine porteuse. Dans le cadre de ce travail, la MC-LR a été couplée à la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), choisie en raison de son caractère immunogène élevé. L'agent de couplage était l'EDC capable de lier une extrémité carboxylique de l'un à une extrémité amine de l'autre des deux composés (Alvarenga *et al.*, 2014).

Consécutivement à l'immunisation de souris par la MC couplée à la KLH (KLH-MC) et à l'hybridation cellulaire pour la génération d'hybridomes, deux clones sécréteurs d'anticorps monoclonaux ont été retenus (E1 et E4). Les sérums pré-immun et immun ont également été recueillis pour servir de contrôle. Après analyse de leur fonctionnalité par la technique ELISA, les clones E1 et E4 n'ont révélé aucune spécificité pour la MC-LR. Selon Nelson *et al.*, (2000), certains hybridomes sont instables et susceptibles de perdre leur capacité à sécréter l'anticorps. Récemment, Bradbury *et al.* ont également rapporté la capacité de certains clones à synthétiser plusieurs chaînes d'anticorps dont certaines ne sont pas fonctionnelles (Bradbury *et al.*, 2018). Les immunosérums obtenus ayant montré une grande réactivité avec la MC-LR, ce résultat confirme l'efficacité du protocole d'immunisation mis en œuvre qui pourra être reproduit avant d'effectuer une nouvelle fusion dans des conditions qui pourraient mériter l'utilisation d'une nouvelle lignée de cellules myéломateuses et une optimisation du protocole.

IV.A-1.b- Sélection des fragments d'anticorps sous forme de scFv par la technologie du phage display

La sélection des phages spécifiques à la MC-LR a été effectuée sur un support solide. Afin d'optimiser la qualité de la sélection et de l'adsorption de la cible (Cuccuru *et al.*, 2012), la MC-LR a été couplée à une protéine porteuse : soit l'ovalbumine (OVA), soit la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Ce

couplage a été contrôlé par trois approches distinctes (ELISA, SDS-PAGE et Western Blot) préalablement aux étapes de sélection.

La sélection de fragments d'anticorps par la technologie du phage display a longtemps été comparée à la recherche d'une aiguille dans une botte de foin. Ici 81 clones ont été isolés à partir d'une banque riche de plus de 10^9 entités. Deux stratégies de sélection différentes ont été appliquées : SOM et SOKM, désignant respectivement la Sélection contre l'OVA-MC et la Sélection contre l'OVA et la KLH conjuguées à la MC.

A l'issue des cinq tours successifs de sélection dans la stratégie SOM, un enrichissement des phages spécifiques à la MC-LR a été observé par Phage ELISA lors des 3 premiers cycles de sélection positive des phages exprimant des scFv spécifiques à l'OVA-MC. La diminution observée dans le profil d'enrichissement au niveau du 4^{ème} cycle correspond à la pression de sélection appliquée pour garder les clones les plus affins. Néanmoins, ce profil a augmenté au cours du 5^{ème} cycle où une sélection négative a été effectuée pour éliminer les phages spécifiques à la protéine porteuse OVA. 36 clones ont été isolés à partir des deux derniers tours. Ces clones sont appelés SOMa (le « a » reflète l'élution acide appliquée), suivi d'un chiffre correspondant à chaque clone.

En ce qui concerne la stratégie SOKM, une diminution d'enrichissement a été observée au cours des 3 cycles effectués. La diminution entre le premier et le second tour est justifiée par le changement de la protéine porteuse de la MC-LR supposant l'élimination des phages spécifiques à l'OVA seule. En revanche, au niveau du troisième tour, alors qu'un taux d'enrichissement plus élevé par comparaison avec le tour de sélection précédent était attendu, nous avons constaté une diminution du signal. Celle-ci est peut-être liée à un manque de stabilité de la protéine cible, dans les conditions expérimentales utilisées. 45 clones ont été isolés à partir de la stratégie SOKM. Ces clones sont appelés SOKMa, SOKMc et SOKMd selon le mode d'élution utilisé (acide, compétition avec la MC, ou compétition avec AD4G2), suivi d'un chiffre correspondant à chaque clone.

Afin de déterminer les clones les plus affins pour la MC-LR en surface de phages, un phage ELISA a été effectué. Après analyse des résultats, 11 clones ont été finalement retenus. Dans le but d'étudier les fragments scFv libres, c'est-à-dire sous forme soluble puisque non-fusionnée à un phage, il est essentiel d'analyser leurs séquences et de les cloner dans des bactéries non-suppressives. Concernant la sélection SOMa, l'analyse des séquences a montré que tous les 4 clones produisent des scFv codés par des séquences nucléotidiques identiques, bien qu'ils proviennent chacun d'isolats bactériens différents. En outre, cinq autres clones provenant de la sélection SOKM, n'ont pas été conservés puisque les séquences des domaines V_H ou V_L correspondants se sont avérés non fonctionnels. Enfin, concernant la sélection SOKMc, deux derniers clones avec un format classique de scFv ont également été retenus, aboutissant à un nombre final de trois scFv distincts, *a priori* fonctionnels.

Ainsi, la sélection par phage display a permis d'isoler trois clones de scFv à partir d'une banque exprimant un milliard de scFv différents, tandis que la technologie des hybridomes a permis de sélectionner des anticorps polyclonaux spécifiques à la MC-LR après immunisation de deux souris avec la KLH-MC. Cependant, la sélection par phage display nécessite moins de temps et de ressources que la technologie des hybridomes. Cinq cycles de sélection ont été effectués avec la stratégie SOM et trois cycles avec la stratégie SOKM. Selon Heng *et al.*, il n'est pas recommandé d'effectuer plus de quatre cycles de sélection afin de maintenir la diversité de séquence parmi les phages liés à la cible (Heng *et al.*, 2007). Des cycles supplémentaires pourraient aboutir à la sélection de phages qui infectent mieux ou sont mieux élus plutôt que les phages spécifiques à leurs cibles (Kay *et al.*, 2001). À la fin d'un processus de sélection, plusieurs paramètres peuvent être utilisés comme indicateurs afin d'évaluer le degré de réussite de la sélection. Parmi ceux-ci :

- *L'allure de la courbe d'enrichissement* : A pression de sélection constante, la courbe d'enrichissement devrait avoir une évolution croissante (Eldridge and Weiss, 2015). Ceci est le cas avec la stratégie SOM où les signaux de phage-ELISA sur la population globale augmentent à chaque tour de sélection et où la pression de sélection est maintenue constante (Figures III-10 et 12). En revanche, dans le cas de la stratégie SOKM, l'allure de la courbe d'enrichissement est décroissante. Ce profil peut s'expliquer par une adsorption peu efficace dans les conditions expérimentales utilisées car s'il y a moins de protéine-MC fixée au fond du puits, alors le signal peut diminuer puisque moins de phages seront retenus (Figure III-12).

- *La redondance des séquences des clones retenus* : Cet effet a été observé dans le cas des SOM où le séquençage a révélé 4 clones ayant la même séquence nucléotidique, bien que provenant de clones bactériens différents. Cette redondance montre que la pression de sélection exercée a favorisé l'enrichissement d'une séquence particulière, illustrant son intérêt dans la reconnaissance de la cible (Derda *et al.*, 2011), la réalisation de plusieurs tours de sélection (> 4) améliore la capacité de liaison des phages sélectionnés, mais présente l'inconvénient de réduire la diversité des séquences.

Enfin, un 4^{ème} scFv a été ajouté à notre étude, provenant d'un scAb (single chain Antibody) le 3A8, déjà sélectionné à partir d'une banque humaine naïve semi synthétique, et caractérisé par l'équipe d'Andrew Porter (McElhiney *et al.*, 2002).

Afin de confirmer la fonctionnalité de ces 4 scFv en dehors du système phagique, chacun d'eux a été produit en système procaryote par voie cytoplasmique, suivi d'un protocole de renaturation déjà optimisé au sein de notre laboratoire. Cette stratégie a été choisie au regard (i) de la relative simplicité de la production chez les bactéries, et (ii) du rendement de la voie cytoplasmique, reconnu pour être plus élevé que la voie périplasmique (Ben Naya *et al.*, 2012). Le tableau IV-1 résume les différentes caractéristiques de ces deux voies.

Tableau IV- 1: Caractéristiques des voies d'expression périplasmique et cytoplasmique.

Voie périplasmique	Voie cytoplasmique
<ul style="list-style-type: none"> - Les protéines sont sécrétées dans le périplasma, localisé entre la membrane externe et la membrane plasmique de la bactérie. - Le périplasma constitue un milieu oxydant favorable au repliement des protéines. - Afin d'adresser la protéine vers le périplasma une séquence signal est ajoutée en N-ter de la protéine (Ritz and Beckwith, 2001). - La co-expression de protéines chaperonnes peut être exploitée pour optimiser le repliement de la protéine (Padiolleau-Lefèvre <i>et al.</i>, 2006). 	<ul style="list-style-type: none"> - Les protéines sont sécrétées dans le cytoplasme de la bactérie. - Peut entraîner une agrégation dans le cytoplasme et la formation de corps d'inclusions. - Les corps d'inclusions sont traités afin de les rendre solubles, généralement au moyen d'agents chaotropiques induisant la dénaturation des protéines recombinantes. - Les étapes permettant de recouvrer leur activité sont très délicates et nécessitent de nombreuses mises au point souvent très spécifiques de la protéine produite.

Une fois les scFv exprimés sous forme soluble, leur fonctionnalité envers la MC-LR a été validée par différentes approches.

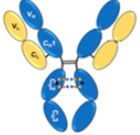
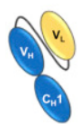


IV.A-2. Validation de la fonctionnalité des scFv

Des techniques complémentaires ont été utilisées afin de valider la fonctionnalité des scFv pour la MC-LR. Tout d'abord, un ELISA sandwich avec les scFv produits sous forme soluble, ainsi qu'un Western blot ont été appliqués. Toutefois les résultats se sont révélés peu reproductibles, ce manque de reproductibilité pouvant être justifié par une renaturation incorrecte des scFv. Le protocole de renaturation utilisé par le passé a permis un refolding de qualité sur nos précédents scFv, mais il peut ne pas être adapté dans le cas particulier des scFv sélectionnés lors de ce travail. Une autre possibilité pourrait être une gêne ou un encombrement stérique. Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature où la liaison de plusieurs anticorps à proximité les uns des autres pourrait masquer les épitopes et inhiber la liaison des anticorps de détection, affectant *in fine* le signal mesuré (Janssen *et al.*, 2015).

En dépit du manque de reproductibilité évoqué, certains résultats obtenus par ELISA sont en faveur d'une interaction entre les scFv sélectionnés et la cible MC-LR. Pour confirmer ce résultat et affiner la caractérisation, nous avons utilisé la technique de résonance plasmonique de surface qui permet une étude cinétique de l'interaction entre le fragment d'anticorps et sa cible.

Afin de disposer de valeurs de références, nous avons commencé par la détermination des affinités des anticorps commerciaux AD4G2 et MC10E7 pour la MC-LR. Alors que les valeurs de K_D obtenues pour ces anticorps commerciaux ont montré leur cohérence avec celles publiées dans la littérature (Weller, 2013), celle du scFv 3A8 ($K_D = 75.5$ nM) traduit une interaction spécifique et une bonne affinité pour la MC-LR qui demeure toutefois plus faible que celle des anticorps commerciaux. Comparée aux autres formats de 3A8 (tableau IV-2) la valeur du K_D obtenue pour le scFv est comprise entre les 2 populations de scFv 3A8 dimérisés couplés à la phosphatase alcaline (scFv (3A8-AP)₂). Enfin, il faut noter que le résultat de RPS publié par Alvarenga *et al* (2014) a été obtenu dans des conditions expérimentales reflétant non pas seulement l'affinité, mais aussi l'avidité du scFv (3A8-AP)₂. En effet, lors de ce travail, le ligand immobilisé à la *sensorchip* est l'OVA-MC, tandis que le scFv (3A8-AP)₂, qui est bivalent, est l'analyte circulant. Dans de telles conditions, l'avidité est prise en compte, contrairement aux conditions de notre étude, où le scFv 3A8 est le ligand immobilisé, et est en outre monovalent.

Tableau IV- 2: Caractéristiques de l'AD4G2 et des différents formats de 3A8.

	K _D	IC ₅₀	Limite de détection	Référence
IgG AD4G2 	0.33 nM	0.33 nM	0.07 nM	Zeck <i>et al.</i> , 2001-B
scAb 3A8 	nd	4.5 nM	0.8 nM	McElhiney <i>et al.</i> , 2002
scFv 3A8 dimérisé et couplé à la phosphatase alcaline 	Population 1 : 0.22 nM <hr/> Population 2 : 8.73 μM	2.98 μM	0.25 μM	Alvarenga <i>et al.</i> , 2014
scFv 3A8 	75.5 nM	nd	nd	-

nd : non déterminé

En revanche, même si plusieurs essais ont été effectués dans différentes conditions expérimentales, les trois autres scFv n'ont pu être immobilisés correctement sur une puce CM5. Deux hypothèses peuvent être posées pour expliquer cet échec :

- La première repose sur une mauvaise renaturation des scFv (cf chap.III.F-2.d). Pour la vérifier, il convient d'approfondir la recherche d'un protocole de renaturation efficace en testant différentes conditions de dénaturation/renaturation.
- La seconde hypothèse est liée à la méthode même d'analyse et le choix du ligand immobilisé sur la puce. Mitchell et Wu (2010) ont discuté la difficulté à détecter de petites molécules (de taille inférieure à 2 kDa) due (i) au manque de précision de la mesure et (ii) à l'encombrement stérique généré par l'anticorps, beaucoup plus volumineux que son partenaire d'interaction de petite taille. Même si on a réussi à analyser le 3A8, ces facteurs peuvent expliquer nos difficultés à détecter l'interaction entre les 3 scFvs restants et la MC-LR. Dans cet article, Mitchell et Wu proposent plusieurs solutions, comme l'utilisation des puces à monocouches auto-assemblées (SAM) pour immobiliser de petites molécules à la surface du capteur, ou l'utilisation d'espaceurs chimiques pour optimiser l'immobilisation des antigènes à la surface du capteur. Toutefois le choix de l'espaceur est contraint par sa longueur et le site de conjugaison qui ne doit pas chevaucher l'épitope (Mitchell and Wu, 2010).

Un test ELISA compétitif s'ajoute à la liste des méthodes utilisées pour valider la fonctionnalité des quatre scFv. Le compétiteur dans ce test est la MC-LR qui entre en compétition avec l'OVA-MC immobilisée pour se lier au scFv. L'avantage de cette approche est d'utiliser un compétiteur libre en

solution sur lequel tous les sites de reconnaissance possibles sont accessibles avec toutefois l'inconvénient d'être très consommateur d'un matériel rare. La compétition a été validée par diminution du signal sur un point unique avec les scFv SOMa et SOKMc3. Cette approche n'a pas encore pu être développée avec les deux autres scFvs. Cette expérience laisse toutefois entrevoir la possibilité de détecter la MC-LR dans des prélèvements de terrain en utilisant les scFv sélectionnés. Ici, l'anticorps commercial AD4G2 a été utilisé en première intention. L'extinction du signal est alors observée lors de l'augmentation progressive de la concentration de l'échantillon positif contaminé par la MC-LR. Cet essai valide le test de compétition.

Néanmoins, un écart important a été observé entre la concentration de MC-LR qui a induit une diminution du signal initial et celle de la limite de détection indiquée sur la fiche produit de l'anticorps AD4G2. Cette observation suggère deux hypothèses. La première est une différence dans les conditions expérimentales appliquées. La température et les temps d'incubation peuvent en effet influencer sur la qualité de l'interaction et donc sur les résultats. La seconde hypothèse est liée à la qualité de l'échantillon qui n'a pas subi de traitement préalable, alors qu'on sait que la concentration de chlorophylle et la turbidité de l'eau sont des éléments susceptibles d'interférer (Audet-Lecouffe, 2013).

IV.A-3. Modélisation et docking moléculaires

Dans le but d'étudier les interactions entre les scFv et la MC-LR une modélisation 3D et un docking moléculaire ont été effectués en collaboration avec Pr. Bernard Offmann (Université de Nantes, CNRS UMR 6286). Cette méthode a été appliquée à l'anticorps 3A8. Elle est en développement pour les trois autres scFvs. La modélisation tridimensionnelle du scFv 3A8 a été effectuée avec le logiciel Rosetta qui permet de modéliser la structure tridimensionnelle des régions variables des anticorps à partir des séquences des chaînes lourdes et légères (Figure IV-1).

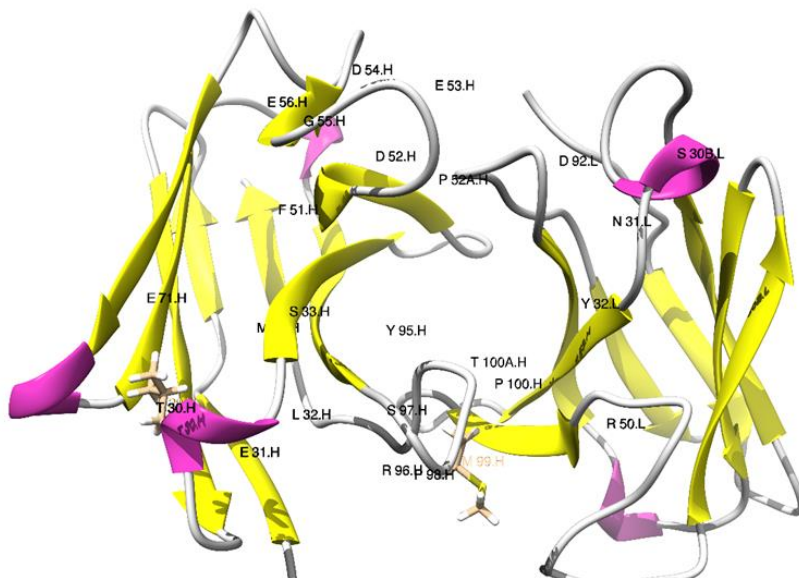


Figure IV- 1: Modélisation 3D du scFv 3A8

A partir du modèle 3D des domaines variables de 3A8, nous avons tenté d'identifier des motifs structuraux du scFv susceptibles d'interagir avec la MC-LR (Figure IV-2). Le docking moléculaire utilisé ici est une approche *in silico* qui permet l'étude de la liaison protéine-ligand. Elle vise à prédire la géométrie 3D du complexe ainsi formé. Kuntz et ses collègues ont rapporté les premières tentatives de docking moléculaire au début des années 1980 et depuis lors, la méthodologie a continué d'évoluer (Kuntz *et al.*, 1982, Gioia *et al.*, 2017).

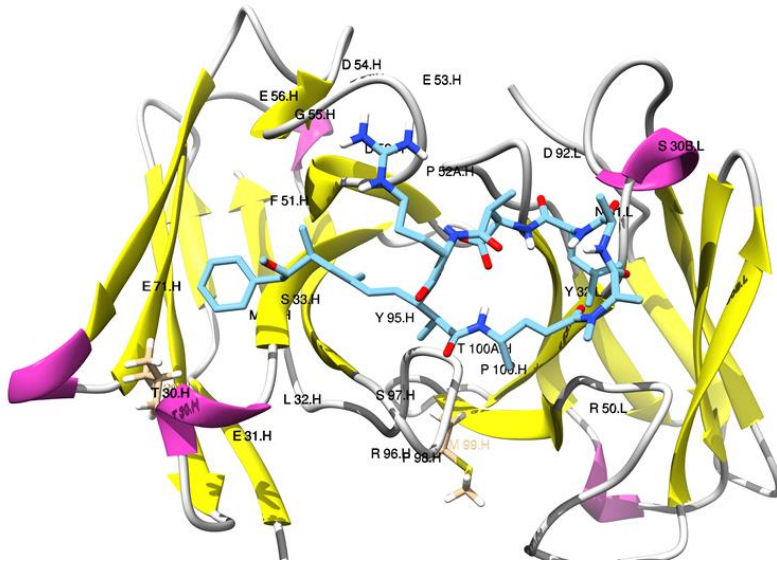


Figure IV-2: Modélisation 3D du scFv 3A8 avec superposition avec la MC-LR.

Le logiciel de docking utilisé est l'Autodock Vina version 1.1.2 et les images ont été générées à l'aide du logiciel CHIMERA dont la qualité des prédictions a précédemment été validée sur plusieurs modèles (Trott and Olson, 2010 ; Shamsara, 2018). L'analyse des résultats a mis en évidence quatre résidus susceptibles d'interagir avec la MC-LR : l'asparagine L31, la phénylalanine H51 et les acides glutamiques et aspartiques H53 et H54 de l'anticorps 3A8, la nomenclature de numérotation utilisée étant ici celle de Kabat (Abhinandan and Martin, 2008).

La phénylalanine H51 de l'anticorps 3A8 établit une liaison de stacking π - π avec le noyau aromatique terminal ADDA de la MC-LR.

Les acides glutamique H53 et aspartique H54 établissent quant à eux des liaisons hydrogène via leurs atomes du squelette (leur fonction C=O des liaisons peptidiques) avec l'arginine en position 4 de la MC-LR (Figure IV-3).

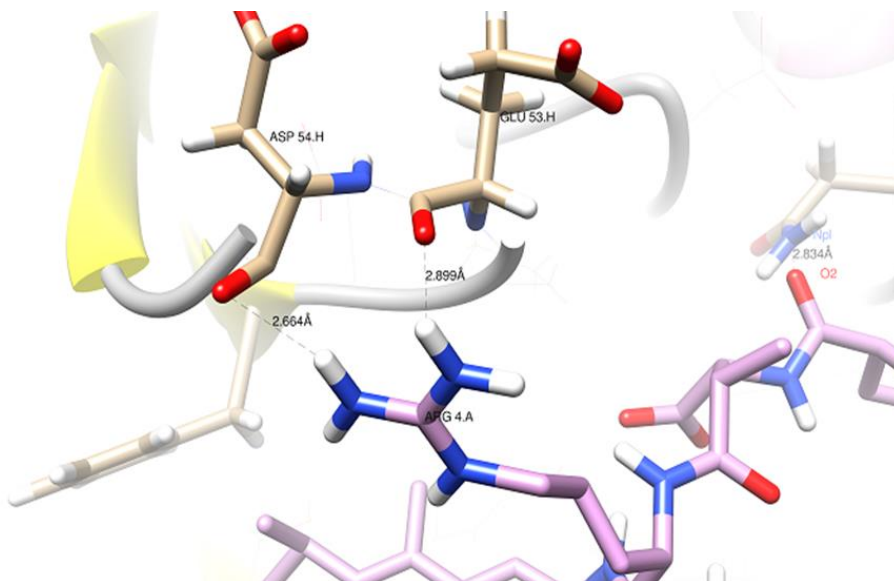


Figure IV-3: Représentation du docking moléculaire, effectué entre le scFv 3A8 et la MC-LR, qui montre les acides glutamique et aspartique respectivement en position 53 et 54 de V_H du 3A8 établissant des liaisons hydrogène avec l'arginine en position 4 de la MC-LR.

Selon ce modèle, l'asparagine L31 de la chaîne légère établirait une liaison hydrogène avec la leucine en position 2 de la MC-LR (entre l'oxygène du C=O de la leucine et l'azote de la chaîne latérale de l'asparagine) (Figure IV-4).

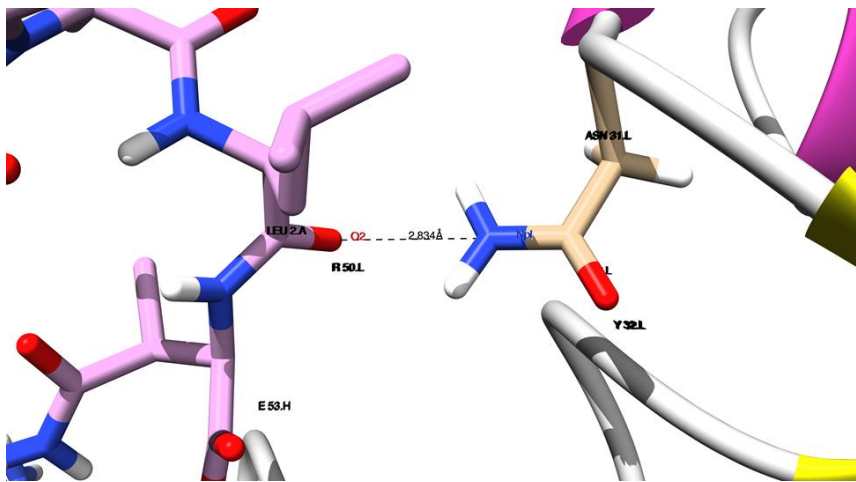


Figure IV- 4: Représentation du docking moléculaire, effectué entre le scFv 3A8 et la MC-LR, qui montre le résidu asparagine en position 31 de V_L du 3A8 établissant une liaison hydrogène avec la leucine en position 2 de la MC-LR.

La projection de ce résultat sur les autres scFv montre que la phénylalanine H56 de 3A8 est remplacée dans les trois autres clones par un résidu d'isoleucine (Ile). Cet acide aminé partage avec la phénylalanine un caractère d'hydrophobicité marqué et pourrait constituer un site d'interaction avec la MC-LR.

La même analyse a été effectuée sur les 3 autres acides aminés qui, dans le cas de l'anticorps 3A8, entrent en interaction avec la MC-LR. Cette fois-ci, les deux résidus acides (Glu H53 et Asp H54) sont respectivement remplacés par des résidus neutres, polaires ou non, dans SOMa (Gly H53 et Ser H54) et SOKMc5 (Tyr H53 et Gly H54). Ces substitutions non-conservatives du point de vue du caractère chimique ne permettent pas d'établir une corrélation.

Une corrélation est également difficile à établir entre l'Asn L31 du scFv 3A8 et les résidus d'acides aminés présents à cette position dans les autres scFvs (Arg L31 pour SOKMc3, et Val L31 pour SOKMc5.). Seul SOMa présente en position L31 un résidu (Ser) dont le caractère est proche de celui observé sur le scFv 3A8. Ce résultat montre les limites de cette approche *in silico* pour prédire une corrélation de l'interaction des différents scFvs avec la MC-LR. Ces conclusions restent à confirmer par des analyses de docking qui seront effectuées ultérieurement sur les trois autres clones d'anticorps.

IV.B- Perspectives

Dans le cadre de cette étude, nous souhaitons produire des anticorps spécifiques de la MC-LR afin de développer de nouvelles méthodes de détection. La mise au point des stratégies de sélection constituait un prérequis essentiel et trois scFv (SOMa, SOKMc 3 et SOKMc5) ont été isolés. La fonctionnalité de ces scFv a été testée par plusieurs techniques, bien que leur caractérisation biochimique fine reste à finaliser. Au cours de cette étude, sont également apparues de nouvelles perspectives.

La première concerne la voie des anticorps monoclonaux produits par la technologie des hybridomes. Le protocole d'immunisation mis en place s'est révélé efficace même si le criblage après fusion cellulaire n'a pas abouti, soit en raison d'une fusion imparfaite, soit parce que le nombre de clones criblés était insuffisant. Ces deux hypothèses devront être levées à l'avenir.

Concernant la seconde approche (le criblage de banque de phages), les résultats obtenus montrent un possible problème de repliement des scFv produits dans le cytosol, dénaturés puis renaturés *in vitro*. Cette stratégie, même si elle présente de nombreux avantages, reste délicate, longue et fastidieuse (Ortega *et al.*, 2013). Elle soulève différentes questions. La première interrogation est relative à l'optimisation des codons. L'optimisation des codons consiste à modifier la séquence nucléotidique du gène (ici celui du scFv sélectionné) tout en conservant la séquence traduite en acides aminés, et cela dans le but d'optimiser la transcription et la traduction de la protéine recombinante en évitant l'emploi d'ARNt rares (Šnajder *et al.*, 2015). Shaoliang Hu a comparé, dans un article publié en 2013, l'expression d'un scFv en présence et en absence d'une optimisation de la séquence nucléotidique (Hu *et al.*, 2013). Cette étude a révélé que même si la séquence peptidique est conservée après optimisation de la séquence codante, des modifications de la solubilité de la protéine hétérologue produite sont possibles, impactant le repliement, et donc, *in fine*, la liaison à l'antigène. Les résultats présentés dans cet article suggèrent que les mutations silencieuses influencent la fonction des protéines en jouant un rôle dans le repliement de la structure primaire. Finalement, la modification du repliement peut altérer la spécificité de la protéine recombinante (Komar, 2009 ; Kimchi- Sarfaty *et al.*, 2007). Ainsi, les données indiquent que la vitesse de traduction de certains codons varie selon la séquence nucléotidique due à l'abondance d'ARNt correspondant au codon proposé. Cette cinétique de traduction serait à l'origine de chaînes polypeptidiques présentant des structures secondaires différentes, susceptibles d'impacter l'activité du scFv (Saunders and Deane, 2010). Il convient néanmoins noter que ces observations résultent d'un travail mené lors d'une expression périplasmique du scFv étudié. Dans notre étude, l'expression était cytoplasmique, requérant un traitement par un agent chaotrope des corps d'inclusion afin de solubiliser les scFv produits. Les éventuelles structures secondaires qui se forment *in vivo* auraient donc dûes être déstabilisées, avant d'en rétablir de nouvelles *in vitro*. Mais ce processus de renaturation reste complexe et pas entièrement compris (Jäger and Plückthun, 1999). Il n'est pas impossible que le traitement par les agents chaotropiques n'ait permis qu'une dénaturation partielle des structures secondaires les plus stables formées *in vivo*. Ceci aurait eu pour conséquence d'impacter la qualité du repliement. Pour lever ce doute, il serait intéressant de comparer les structures secondaires des scFv solubilisés (c'est-à-dire en solution chaotrope) ou refoldés (c'est-à-dire en tampon phosphate après renaturation), avec ou sans optimisation des séquences nucléotidiques. Cela permettrait de conclure quant à l'éventuel impact de l'optimisation des séquences sur la production de protéines hétérologues par la voie cytoplasmique. Ainsi, l'analyse des structures par dichroïsme circulaire pourrait être pertinente. Cette méthode d'analyse se base sur l'utilisation de la lumière polarisée circulaire gauche et droite. Les protéines absorbent la lumière en fonction de l'organisation de leur structure secondaire. La mesure de la différence d'absorption des deux composantes de la lumière permet alors d'obtenir des informations sur la conformation de la protéine d'intérêt (Kelly and Price, 2000).

Une autre interrogation est relative au protocole de renaturation en lui-même. Comme cela a été évoqué dans le chapitre précédent, le protocole de renaturation utilisé a été mis au point lors de travaux précédents. Il s'est révélé efficace sur les scFvs étudiés jusqu'à présent au laboratoire. Il est toutefois reconnu que la renaturation d'un scFv est séquence-dépendante (Knappik and Plückthun, 1995). Un travail de fond sur l'optimisation du protocole de renaturation s'avèrerait nécessaire pour les scFv ici sélectionnés, afin d'identifier les paramètres précis aboutissant à la perte ou au gain de leur fonctionnalité. Cette étude devra donc être conduite à l'avenir.

A propos des méthodologies utilisées pour la validation de la fonctionnalité des scFv, des analyses complémentaires sont également prévues. Dans un premier temps, des expériences de résonance plasmonique de surface seront nécessaires afin d'évaluer d'autres stratégies d'immobilisation et de capture sur d'autres puces. A titre d'exemple, nous envisageons d'utiliser les puces NTA afin de capturer les scFv via leur étiquette histidine. Nous avons d'ores et déjà essayé une capture sur les toutes nouvelles

puces dites Protein L, censées permettre une capture spécifique des scFv sous réserve que ceux-ci disposent d'un site de reconnaissance de la Protéine L. Cette approche n'a cependant pas abouti car les puces Protéine L sont reconnues pour une capture efficace d'un grand nombre de scFvs d'origine humaine (chaîne kappa de type I, III, IV) mais beaucoup plus limité pour les scFv murins. On sait par exemple qu'un résidu de proline en position L8 est requis alors qu'en position L12, comme c'est le cas dans la grande majorité des chaînes kappa humaine de type II, il sera délétère (Lakhrif *et al.*, 2016). Sur la base de travaux récents, il conviendra d'analyser de nouveau les moyens de capture de nos scFv qui sont jusqu'à présent restés trop peu efficaces. Enfin, des expériences complémentaires en ELISA compétitif sont également envisagées, en balayant plusieurs concentrations en compétiteur (microcystine libre). Cette technique devrait permettre d'obtenir les K_D par une approche alternative à la RPS.

D'un point de vue structural, un travail de modélisation et de docking moléculaire a été effectué pour le scFv 3A8. Un travail similaire doit être planifié pour les trois scFv restants afin de proposer les résidus clés qui interagissent potentiellement avec la MC-LR. L'identification définitive des résidus impliqués dans l'interaction nécessitera néanmoins une confirmation biochimique par mutagenèse dirigée des sites actifs putatifs.

Une telle modélisation ouvre également la possibilité d'effectuer des mutagenèses *in silico* afin d'identifier des séquences prédictives d'anticorps d'intérêt. Deux objectifs distincts peuvent être visés : soit l'amélioration de l'affinité vis-à-vis de la MC-LR, soit la modulation de la spécificité des scFv vis-à-vis des variants de la MC, les travaux de Weller suggérant en effet que la plupart des anticorps dirigés contre les microcystines présentent une réaction croisée avec plusieurs types de microcystines (Weller, 2013).

Enfin, un ELISA reposant sur l'anticorps commercial AD4G2 a été mis au point sur un prélèvement de terrain. Un test, basé sur un format similaire, sera mis au point et développé avec les quatre scFv sélectionnés ici. Néanmoins, cette application concrète et directe exige que les difficultés de renaturation rencontrées soient préalablement résolues.

IV.C- Conclusion

Peu d'anticorps spécifiques de la MC-LR ont été développés au fil des années (cf tableau II-3, chapitre II.D). Récemment, la technique du phage display a permis d'en identifier sous la forme de scFv spécifiques de la MC-LR (McElhiney *et al.*, 2002, Murphy *et al.*, 2015). Cette technique est la plus utilisée dans la production des fragments d'anticorps spécifiques vis-à-vis de n'importe quel antigène. Dans cette liste non exhaustive des anticorps dirigés contre la MC, vient s'insérer ce projet de thèse qui vise à produire de nouveaux anticorps et fragments d'anticorps contre la MC-LR.

A la lumière des résultats obtenus, cette technique a permis d'isoler trois scFv spécifiques de la MC-LR. Un quatrième, obtenu lors d'une étude antérieure a été ajouté (McElhiney *et al.*, 2002).

La caractérisation des quatre scFv a permis de mettre en évidence leur capacité de reconnaissance vis-à-vis de la protéine cible. Néanmoins d'autres études seront menées par la suite afin d'optimiser la caractérisation de ces scFv et de contribuer ultérieurement à la mise au point d'un outil d'immunodétection fiable et sensible de la MC-LR.

Bibliographie

Références bibliographiques

Abhinandan KR, Martin AC. 2008. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. *Mol Immunol*. **Vol 45**:3832-9.

Ács A, Kovács A, Csepregi J, Törő N, Kiss G, Győri J, Vehovszky A, Kovács N, Farkas A. 2013. The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicon*. **Vol 70**: 98–106.

Aguate E, Gago-Martinez A, Leao J, Rodriguez-Vazquez J, Menard C and Lawrence J. 2003. HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. *Talanta*. **Vol 59**: 697-705.

Ahmad Z, Yeap S, Ali A, Ho W, Alitheen N and Hamid M. 2012. ScFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*. doi: 10.1155/2012/980250

Alvarenga L, De Moura J and Billiald P. 2017. Recombinant Antibodies: Trends for Standardized Immunological Probes and Drugs. 97-121. In *Current developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications*. Elsevier.

Alvarenga LM, Muzard J, Ledreux A, Bernard C, Billiald P. 2014. Colorimetric engineered immunoprobe for the detection and quantification of microcystins. *J Immunol Methods*. **Vol 406** :124-130.

An J and Carmichael W. 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon*. **Vol 32**: 1495–1507.

Arap W, Kolonin MG, Trepel M, Lahdenranta J, Cardó-Vila M, Giordano RJ, Mintz PJ, Ardeli PU, Yao VJ, Vidal CI, Chen L, Flamm A, Valtanen H, Weavind LM, Hicks ME, Pollock RE, Botz GH, Bucana CD, Koivunen E, Cahill D, Troncoso P, Baggerly KA, Pentz RD, Do KA, Logothetis CJ, Pasqualini R. 2002. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat. Med*. **Vol 8**: 121-127.

Audet-Lecouffé J. 2013. Etude portant sur la recherche d'une procédure alternative pour la détection des cyanobactéries et des cyanotoxines. Mémoire présenté en vue d'obtention du grade de maître en environnement, Université de Sherbrooke. 106 p.

Azevedo S, Carmichael W, Jochimsen E, Rinehart K, Lau S, Shaw G and Eaglesham GK. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*. **Vol 181–182**: 441-446.

Babica P, Bláha L and Maršálek B. 2006. Exploring the natural role of microcystins – a review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology*. **Vol 42**: 9–20.

Barbas CF III, Burton D, Scott J and Silverman G. 2001. *Phage Display A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.

Bateman K, Thibault P, Douglas D and White R. 1995. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. *J.Chromatogr*. **Vol 712**: 253-268.

- Ben Naya R, Matti K, Guellier A, Matagne A, Boquet D, Thomas D, Friboulet A, Avelle B, Padiolleau-Lefèvre S. 2012. Efficient refolding of a recombinant abzyme: structural and catalytic characterizations. *Appl Microbiol Biotechnol*. **Vol 97** :7721-7731.
- Bláha L, Cameán AM, Fessard V, Gutiérrez-Praena D, Jos A, Marie B, Metcalf J, Pichardo S, Puerto M, Törökné A, Vasas G and Žegura B. 2017. Bioassay Use in the Field of Toxic Cyanobacteria. 272–279. In *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. 1st ed John Wiley and sons.
- Boland M, Smillie M, Chen D and Holmes C. 1993. A unified bioscreen for the detection of diarrhetic shellfish toxins and microcystins in marine and freshwater environments. *Toxicon*. **Vol 31**: 1393-1405.
- Bradbury A and Marks J. 2004. Antibodies from phage antibody libraries. *Journal of Immunological Methods*. **Vol 290**: 29– 49.
- Bradbury A, Plückthun A. 2015. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature*. **Vol 518**:27-29.
- Bradbury A, Trinklein N, Thie H, Wilkinson IC, Tandon AK, Anderson S, Bladen CL, Jones B, Aldred SF, Bestagno M, Burrone O, Maynard J, Ferrara F, Trimmer JS, Görnemann J, Glanville J, Wolf P, Frenzel A, Wong J, Koh XY, Eng HY, Lane D, Lefranc MP, Clark M, Dübel S. 2018. When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *MAbs*. **Vol 27**:1-8.
- Bratkovic T. 2010. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell. Mol. Life Sci*. **Vol 67**: 749–767.
- Brooks W and Codd G. 1988. Immunoassay of hepatotoxic cultures and water blooms of cyanobacteria using *Microcystis aeruginosa* peptide toxin polyclonal antibodies. *Environ. Technol*. **Vol 9**: 1343-1348.
- Brown A.M. and McFarlin D.E. 1981. Relapsing Experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse. *Laboratory Investigation*. **Vol 45**: 278-284.
- Buratti FM, Manganeli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, Funari E. 2017. Cyanotoxins. Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol*. **Vol 91**:1049-1130.
- Cabrera K, Lubda D, Eggenweiler H, Minakuchi H, Nakanishi k. 2000. A new monolithic-type HPLC column for fast separations. *Journal of High Resolution Chromatography*. **Vol 23**: 93–99.
- Carmichael W, and Falconer IR. 1993. Disease related to freshwater algal blooms. 187–210. In: Callow JA, *Advances in botanical research*, Academic Press.
- Carmichael WW, Azevedo S, An J., Molica R, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR and Eaglesham GK. 2001. Human fatalities from cyanobacteria, chemical and biological evidence for cyanotoxins, *Environ. Health Perspect*. **Vol 109**. 663–668.
- Catherine A, Bernard C, Spoof L, Bruno M. 2017. Microcystins and nodularins-*Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. 109–126. In *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. 1st ed John Wiley and sons.

- Chen K, Liu M, Zhao G, Shi H, Fan L and Zhao S. 2012. Fabrication of a Novel and Simple Microcystin-LR Photoelectrochemical Sensor with High Sensitivity and Selectivity. *Environ. Sci. Technol.* **Vol 46**: 11955–11961.
- Chevalier P, Pilote R, Leclerc J. 2001. Risques à la santé publique découlant de la présence de cyanobactéries (algues bleues) toxiques et de microcystines dans trois bassins versants du Sud-Ouest québécois tributaires du fleuve Saint-Laurent. Unité de recherche en santé publique (Centre hospitalier de l'Université Laval) et Institut national de santé publique. Rapport consulté sur le site <http://meteopolitique.com/Fiches/eau/Cours-d-eau-Lacs/algues/documentation/cyanobacterie/a003.pdf> le 16-11-17.
- Chianella I, Lotierzo M, Piletsky S, Tothill I, Chen B, Karim K and Turner A. 2002. Rational Design of a Polymer Specific for Microcystin-LR Using a Computational Approach. *Anal. Chem.* **Vol 74**: 1288-1293.
- Ch'ng ACW, Hamidon NHB, Konthur Z, Lim TS. 2018. Magnetic Nanoparticle-Based Semi-Automated Panning for High-Throughput Antibody Selection. *Methods Mol Biol.* **Vol 1701**:301-319.
- Chow C, Panglish S, Mole J, Drikas M, Burch M, Gimbel R. 1997. A study of membrane filtration for the removal of cyanobacterial cells. *J Water SRT - Aqua.* **Vol 46**: 324-334.
- Chu F, Huang X, Wei R and Carmichael W. 1989. Production and characterisation of antibodies against microcystins. *Appl. Environ. Microbiol.* **Vol 55**: 1928-1933.
- Codd G, Morrison L, Krienitz L, Ballot A, Pflugmacher S, Wiegand C, Kotut K. 2003. Susceptibility of flamingos to cyanobacterial toxins via feeding, *Vet. Record.* **Vol 7**: 722–723.
- Crissman J and Smith G. 1984. Gene-III protein of filamentous phages: Evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology.* **Vol 132**: 69-75.
- Cuccuru MA, Dessì D, Rappelli P, Fiori PL. 2012. A simple, rapid and inexpensive technique to bind small peptides to polystyrene surfaces for immunoenzymatic assays. *J Immunol Methods.* **Vol 382**:216-219.
- Derda R, Tang SK, Li SC, Ng S, Matochko W, Jafari MR. 2011. Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification. *Molecules.* **Vol 16**:1776-803.
- Devlin CM, Bowles MR, Gordon RB, Pond SM. 1995. Production of a paraquat-specific murine single chain Fv fragment. *J Biochem.* **Vol 118**: 480-487.
- Devlin S, Meneely J, Greer B, Campbell K, Vasconcelos V, and Elliott C. 2014. Production of a broad specificity antibody for the development and validation of an optical SPR screening method for free and intracellular microcystins and nodularin in cyanobacteria cultures. *Talanta.* **Vol 122**: 8–15
- Drikas M. 1994. Removal of cyanobacterial toxins by water treatment processes. 30–44. In: Toxic cyanobacteria — a global perspective. Adelaide, South Australia. Australian Centre for Water Quality Research, Salisbury, Australia. Rapport consulté sur le site file:///C:/Users/User/Downloads/paper04_bluegreenalgae.pdf le 20-11-2017.

- Duy T, Lam P, Shaw G, Connell D. 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue green algal) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. **Vol 163**: 113–186.
- Eldridge GM, Weiss GA. 2015. Identifying reactive peptides from phage-displayed libraries. *Methods Mol Biol*. **Vol 1248**:189-99.
- Elgert K. 1998. Antibody structure and function. 57-78. In *Immunology: Understanding the Immune System*. John Wiley & Sons, Inc
- Falconer IR. 1993. Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs.165–175. In: I.R. Falconer: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press.
- Fischer WL, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol*. **Vol 203**:257-263.
- Flaherty D K. *Immunology for Pharmacy*. Missouri. Mosby, inc., an affiliate of Elsevier Inc. 2012. 255 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06947-2.10049-5>.
- Foulds I, Granacki A, Xiao C, Krull U, Castle A, Horgen P. 2002. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5'-nuclease PCR. *J. Appl. Microbiol*. **Vol 93**: 825–834.
- Gilroy D, Kauffman K, Hall R, Huang X and Chu F. 2000. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ. Health Perspect*. **Vol 108**: 435-439.
- Gioia D, Bertazzo M, Recanatini M, Masetti M, Cavalli A. 2017. Dynamic Docking: A Paradigm Shift in Computational Drug Discovery. *Molecules*. **Vol 22**. pii: E2029.
- Graille M, Harrison S, Crump MP, Findlow SC, Housden NG, Muller BH, Battail-Poirot N, Sibaï G, Sutton BJ, Taussig MJ, Jolivet-Reynaud C, Gore MG, Stura EA. 2002. Evidence for plasticity and structural mimicry at the immunoglobulin light chain-protein L interface. *J Biol Chem*. **Vol 277**:47500-47506.
- Gregson R and Lohr R. 1982. Isolation of peptide hepatotoxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Comp. Biochem. Physiol*. **Vol 74**. 413-417.
- Harada K, Ogawa K, Kimura Y, Murata H, Suzuki M, Thorn P, Evans W and Carmichael W. 1999. 1a Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chem. Res. Toxicol*. **Vol 4**: 535-540.
- Harada K. 1993. Occurrence of Four Depsipeptides, Aeruginopeptins, Together with Microcystins from Toxic Cyanobacteria. *Tetrahedron Letters*. **Vol. 34**: 6091-6094.
- Harris JR and Markl J. 1999. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. **Vol 30**: 597-623.
- Havens K. 2008. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. 733-747. In: *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer.
- Heng C, Mohd Noor S, Yee TS and Othman R. 2007. Biopanning for Banana streak virus Binding Peptide by Phage Display Peptide Library. *Journal of Biological Sciences*, **Vol 7**: 1382-1387.

- Heresztyn T and Nicholson BC. 2001. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay. *Water Research*. **Vol 35**: 3049–3056.
- Herranz S, Bocková M, Marazuela MD, Homola J, Moreno-Bondi MC. 2010. An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water. *Anal Bioanal Chem*. **Vol 398**: 2625–2634.
- Herrington-Symes AP, Farys M, Khalili H and Brocchini S. 2013. Antibody fragments: Prolonging circulation half-life special issue-antibody research. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. **Vol 4**: 689-698.
- Hitzfeld B, Hoger S and Dietrich D. 2000. Cyanobacterial toxins, removal during drinking water treatment, and human risk assessment, *Environ. Health Perspect*. **Vol 108**: 113 – 122.
- Hoger S, Dietrich D, Hitzfeld B. 1999. Effect of ozonation in drinking water treatment on the removal of cyanobacterial toxins. *Toxicol Sci*. **Vol 48**. Rapport consulté sur le site <https://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/110/11/ehp.021101127.pdf> le 30-9-2017.
- Hoogenboom H, Griffiths A, Johnson K, Chiswell D, Hudson P and Winter G. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res*. **Vol 19**: 4133-4137.
- Hu C, Gana N, Chenc Y, Bic L, Zhang X, Song L. 2009. Detection of microcystins in environmental samples using surface plasmon resonance biosensor, *Talanta*. **Vol 80**: 407–410.
- Hu S, Wang M, Cai G, He M. 2013. Genetic code-guided protein synthesis and folding in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. **Vol 288**:30855-61.
- Ikawa M, Wegener K, Foxall T, Sasner J. 1982. Comparaison of the toxins of the blue-green alga *Aphanizomenon flosq-aquae* with the *Gonyaulax* toxins. *Toxicon*. **Vol 20**: 747-752.
- Jäger M, Plückthun A. 1999. Domain interactions in antibody Fv and scFv fragments: effects on unfolding kinetics and equilibria. *FEBS Lett*. **Vol 462**:307-12.
- Janssen L, Sobott F, De Deyn PP, Van Dam D. 2015. Signal loss due to oligomerization in ELISA analysis of amyloid-beta can be recovered by a novel sample pre-treatment method. *MethodsX*. **Vol 2**:112-23.
- Jeong B, Oh M, Park H, Park C, Kim E, Hong S, Kim E. 2017. Elimination of microcystin-LR and residual Mn species using permanganate and powdered activated carbon: Oxidation products and pathways. *Water Research*. **Vol 114**: 189-199.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, Antunes MB, de Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto VS, Azevedo SM, Jarvis WR. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med*. **Vol 338** : 873-8.
- Kaloudis T, Zervou S, Tsimeli K, Triantis TM, Fotiou T, Hiskia A. 2013. Determination of microcystins and nodularin (cyanobacterial toxins) in water by LC-MS/MS. Monitoring of Lake Marathonas, a water reservoir of Athens, Greece. *Journal of Hazardous Materials*. **Vol 263**: 105–115.
- Kaushik R and Balasubramanian R. 2012. Methods and Approaches Used for Detection of Cyanotoxins in Environmental Samples: A Review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. **Vol 43**: 1349-1383.

- Kay, B.K., J. Kasanov and M. Yamabhai, 2001. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods*, **Vol 24**: 240-246.
- Kehoe J and Kay BK. 2005. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev.* **Vol 105**: 4056-4072.
- Kelly S and Price N. 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci.* **Vol 1**: 349-384.
- Kfir R, Johannsen E and Botes D. 1986. Monoclonal-antibody specific for cyanoginosin-la—preparation and characterization. *Toxicon.* **Vol 24**: 543–552.
- Kierny M, Cunningham T and Kay B. 2012. Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms. *Nano Rev.* 3:1, DOI: 10.3402/nano.v3i0.17240.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh J, Kim I, Sauna Z, Calcagno A, Ambudkar S and Gottesman M. 2007. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* **Vol 315**: 525–528.
- Kindt T, Osborne B and Goldsby R. 2007. Overview of the Immune System. 1-23. In *Kuby Immunology, Sixth Edition* W.H. Freeman.
- Knappik A, Plückthun A. 1995. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng.* **Vol 8**:81-89.
- Kohler H and Milstein C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature.* **Vol 256**: 495-497.
- Komar A. 2009. A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends Biochem. Sci.* **Vol 34**: 16–24.
- Kuiper-Goodman T, Ian Falconer I and Jim Fitzgerald J. 1999. Human health aspects. 113-148. In *water: A guide to Natural toxins from Cyanobacteria public health significance, consequences, monitoring and management.* 1st ed E & FN Spon.
- Kuntz, I.D.; Blaney, J.M.; Oatley, S.J.; Langridge, R.; Ferrin, T.E. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **Vol 161**: 269–288.
- Lakhrif Z, Pugnère M, Henriquet C, di Tommaso A, Dimier-Poisson I, Billiald P, Juste MO, Aubrey N. 2016. A method to confer Protein L binding ability to any antibody fragment. *MAbs.* **Vol 8**:379-388.
- Lazzaroni JC, Germon P, Ray MC and Vianney A. 1999. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol Lett.* **Vol 177**: 191-197.
- Lepisto L, Lakti K, Niemi J. 1994. Removal of cyanobacteria and other phytoplankton in four Finnish waterworks. *Algolog Studies.* **Vol 75**:167-181.
- Li X, Cheng R, Shi H, Tang B, Xiao H, Zhao G. 2016. A simple highly sensitive and selective aptamer-based colorimetric sensor for environmental toxins microcystin-LR in water samples. *Journal of Hazardous Materials.* **Vol 304**: 474–480.

- Lin J and Chu F. 1994. In vitro neutralization of the inhibitory effect of Microcystin-LR to protein phosphatase 2A by antibody against the toxin. *Toxicon*. **Vol 32**: 605-613.
- Littlechild SL, Zhang Y, Tomich JM, Conrad GW. 2012. Fibrinogen, riboflavin, and UVA to immobilize a corneal flap--molecular mechanisms. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **Vol 53** :5991-6003.
- Liu H and May K. 2012. Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *mAbs*. **Vol 4**: 17-23.
- Liu L, Xing C, Yan H, Kuang H and Xu C. 2014. Development of an ELISA and Immunochromatographic Strip for Highly Sensitive Detection of Microcystin-LR. *Sensors*. **Vol 14**: 14672-14685.
- Low N.M, Holliger P, Winter G. 1996. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *Journal of molecular biology*. **Vol 260**: 359-368.
- Lv J, Zhao S, Wu S, Wang Z. 2017. Upconversion nanoparticles grafted molybdenum disulfide nanosheets platform for microcystin-LR sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. **Vol 90** : 203–209.
- Ma W, Chen W, Qiao R, Liu C, Chunhui Y, Zhuokun L, Dinghua X, Chi-Fang P, Zhengyu J, Xu C, Shuifang Z, Libing W. ... tous les auteurs ne sont pas référencés. 2009. Rapid and sensitive detection of microcystin by immunosensor based on nuclear magnetic resonance. *Biosensors and Bioelectronics*. **Vol 25**. 240-243.
- Mahmood N and Carmichael W. 1987. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaenafios-aquae* NRC- 525-17. *Toxicon*. **Vol 25**: 1221-1227.
- Malik P, Tarry TD, Gowda LR, Langara A, Petukhov SA, Symmons MF, Welsh LC, Marvin DA, Perham RN. 1996. Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage. *J. Mol. Biol*. **Vol 260**: 9-21.
- Mankiewicz J, Tarczynska M, Walter Z, and Zalewski M. 2003. Natural toxins from cyanobacteria, *acta biologica cracoviensia Series Botanica*. **Vol 45**: 9–20.
- Mbukwa E, Msagati T, Mamba B. 2013. Preparation of guanidinium terminus-molecularly imprinted polymers for selective recognition and solid-phase extraction (SPE) of [arginine]-microcystins. *Anal Bioanal Chem*. **Vol 405**: 4253–4267.
- McCafferty J, Griffiths A, Winter G and Chiswell DJ. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. **Vol. 348**: 552–554.
- McCullum EO, Williams BA, Zhang J, Chaput JC. 2010 Random mutagenesis by error-prone PCR. *Methods Mol Biol*. **Vol 634**:103-109.
- McElhiney J, Drever M, Lawton LA and Porter AJ. 2002. Rapid Isolation of a Single-Chain Antibody against the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR by Phage Display and Its Use in the Immunoaffinity Concentration of Microcystins from Water. *Appl Environ Microbiol*. **Vol 68**: 5288–5295.

- McElhiney J, Lawton L, Porter A. 2000. Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a naive human phage display library. *FEMS Microbiol. Lett.* **Vol 193**: 83–88.
- Menezes C, Elisabete Valério E. and Dias E. 2013. The Kidney Vero-E6 Cell Line: A Suitable Model to Study the Toxicity of Microcystins -Chapter 2. Rapport consulté sur le site <http://dx.doi.org/10.5772/54463> le 20-12-2017.
- Meriluoto J, Spoof L and Codd G. 2017. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. 1st ed John Wiley and sons.
- Metcalf J and Codd G. 2003. Analysis of cyanobacterial toxins by immunological methods. *Chem. Res. Toxicol.* **Vol 16**: 103-112.
- Metcalf J and Codd G. 2012. Cyanotoxins. 651-675. In: Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Springer.
- Metcalf J, Hiskia A, Kaloudis T. 2017. Protein phosphatase inhibition assays. 267–271. In Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. 1st ed John Wiley and sons.
- Mitchell J and Wu Y. 2010. Surface Plasmon Resonance Biosensors for Highly Sensitive Detection of Small Biomolecules, Biosensors, Pier Andrea Serra Editor. InTech, doi: 10.5772/7208.
- Mouchet P, Bonnelye V. 1998. Solving algae problems: French expertise and world-wide applications. *J Water SRT - Aqua.* **Vol 47**: 125-141.
- Mountfort D, Holland P and Sprosen J. 2005. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. *Toxicon.* **Vol 45**: 199–206.
- Mur L, Skulberg OM and Utkilen H. 1999. Cyanobacteria in the environment. 13-43. In water: A guide to Natural toxins from Cyanobacteria public health significance, consequences, monitoring and management. 1st ed E & FN Spon.
- Murphy C, Stack E, Krivelo S, McPartlin DA, Byrne B, Greef C, Lochhead MJ, Husar G, Devlin S, Elliott CT and O'Kennedy RJ. 2015. Detection of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR, using a novel recombinant antibody-based optical-planar waveguide platform. *Biosens Bioelectron.* **Vol 67**: 708-714.
- Murphy K and Weaver C. 2017. An introduction to immunobiology and innate immunity. 1-77. In Janeway's immunobiology. 9th edition. Garland Science.
- Nagata S, Soutome H, Tsutsumi T, Hasegawa A, Sekijima M, Sugamata M, Harada K, Suganama M and Ueno Y. 1995. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. *Natural Toxins.* **Vol 3**: 78-86.
- Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. 2000. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol.* **Vol 53**:111-117.

- Ng A, Chinnappan R, Eissa S, Liu H, Tlili C, Zourob M. 2012. Selection, characterization, and biosensing application of high affinity congener-specific microcystin-targeting aptamers. *Environ. Sci. Technol.* **Vol 46**: 10697–10703.
- Nicholson B and Burch M. 2001. Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines, a report prepared for the National Health and Medical Research Council of Australia, the Water Services Association of Australia, and the Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment. Rapport consulté sur le site https://www.researchgate.net/profile/Michael_Burch/publication/237780613_Evaluation_of_Analytical_Methods_for_Detection_and_Quantification_of_Cyanotoxins_in_Relation_to_Australian_Drinking_Water_Guidelines/links/54d8a47e0cf24647581aed52/Evaluation-of-Analytical-Methods-for-Detection-and-Quantification-of-Cyanotoxins-in-Relation-to-Australian-Drinking-Water-Guidelines.pdf le 20-11-2017.
- Ortega C, Herbet A, Richard S, Kersual N, Costa N, Pèlerin A, Ducancel F, Couraud JY, Navarro-Teulon I, Boquet D. 2013. High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for in vivo ovarian cancer imaging. *J Immunol Methods.* **Vol 387**:11-20.
- Oudraa B, Loudikia M, Sbiyyaa B, Martins R, Vasconcelos V and Namikoshi N. 2001. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake±reservoir (Morocco). *Toxicon.* **Vol 39**: 1375-1381.
- Pacheco A, Guedes I, Azevedo S. 2016. Is qPCR a Reliable Indicator of Cyanotoxin Risk in Freshwater Toxins. **Vol 8(6)**. pii: E172.
- Padiolleau-Lefèvre S, Débat H, Phichith D, Thomas D, Friboulet A, Avalle B. 2006. Expression of a functional scFv fragment of an anti-idiotypic antibody with a beta-lactam hydrolytic activity. *Immunol Lett.* **Vol 103**: 39-44.
- Paerl H and Paul V. 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* **Vol 46**: 1349–1363.
- Paerl H. 2014. Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World. *Life.* **Vol 4**: 988-1012.
- Pan S and C X. 2015. Double-sided magnetic molecularly imprinted polymer modified graphene oxide for highly efficient enrichment and fast detection of trace-level microcystins from large-Volume water samples combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* **Vol 1422**: 1-12.
- Parker C, Stutts W and Degrasse S. 2015. Development and Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantitation of Microcystins in Blue-Green Algal Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **Vol 63**: 10303-10312.
- Paudel MK, Sakamoto S, Van Huy L, Tanaka H, Miyamoto T, Morimoto S. 2017. The effect of varying the peptide linker length in a single chain variable fragment antibody against wogonin glucuronide. *J Biotechnol.* **Vol 251**:47-52.

- Pelander A, Ojanperä I, Lahti K, Niinivaara K and Vuori E. 2000. Visual detection of cyanobacterial hepatotoxins by thin-layer chromatography and application to water analysis. *Water Res.* **Vol 34**: 2643-2652.
- Pflugmacher S. 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol.* **Vol 17**: 407–413.
- Ponsel D, Neugebauer J, Ladetzki-Baehs K, Tissot K. 2011. High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation. *Molecules.* **Vol 16**: 3675-3700.
- Poon G, Priestley I, Hunt S, Fawell J and Codd G. 1987. Purification procedure for peptide toxins from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* involving high-performance thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* **Vol 387**: 551-555.
- Porter R. 1959. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J.* **Vol 73**: 119–126.
- Pyo D, Choi J, Hong J, Oo HH. 2006. Rapid analytical detection of microcystins using gold colloidal immunochromatographic strip. *J Immunoassay Immunochemistry.* **Vol 27**: 291–302.
- Queffeulou Emilie. 2011. Sélection de peptides inhibiteurs de l'activité des protéines STAT5. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, France.
- Queirós R, Silva S.O, Noronhad J.P, Frazão O, Jorge P, Aguilar G, Marques P, Sales M. 2011. Microcystin-LR detection in water by the Fabry–Pérot interferometer using an optical fibre coated with a sol–gel imprinted sensing membrane. *Biosensors and Bioelectronics.* **Vol 26**: 3932–3937.
- Rahbarnia L, Farajnia S, Babaei H, Majidi J, Veisi K, Ahmadzadeh V, Akbari B. 2016. Evolution of phage display technology: from discovery to application. *J Drug Target.* **Vol 25**:216-224.
- Rao P, Gupta N, Bhaskar A, Jayaraj R. 2002. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health, *J. Environ. Biol.* **Vol 23**: 215 – 224.
- Rapala J, E. K. 2002. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta.* **Vol 466**: 213-231.
- Reddy ST, Ge X, Miklos AE, Hughes RA, Kang SH, Hoi KH, Chrysostomou C, Hunicke-Smith SP, Iverson BL, Tucker PW, Ellington AD, Georgiou G. 2010. Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nat Biotechnol.* **Vol 28**: 965-969.
- Ribatti D. 2015. Edelman's view on the discovery of antibodies. *Immunol Lett.* **Vol 164**: 72-75
- Ritz D and Beckwith J. 2001. Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **Vol 55**: 21-48.
- Rodi DJ, Soares AS, Makowski L. 2002. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide phage display libraries. *J. Mol. Biol.* **Vol 322**: 1039-1052.
- Rositano J, Nicholson B. 1994. Water Treatment Techniques for the Removal of Cyanobacterial Toxins from Water 2/94. Salisbury, S.A., Australia: Australian Centre for Water Quality Research.Rapport

consulté sur le site “http://www.experimentjournal.com/expadmin/pdf_files/exp_26.1_1775-1787.pdf” le 30-11-2017.

Runnegar, M.T.C. and Falconer I.R. 1982. The in vivo and in vitro biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis-aeruginosa*. *South African Journal of Science*. **Vol 78**: 363–366.

Salmaso N, Bernard C, Humbert JF, Akçaalan R, Albay M, Ballot A, Catherine A, Fastner J, Häggqvist K, Horecká M, Izydorczyk K, Köker L, Komárek J, Maloufi S, Mankiewicz-Boczek J, Metcalf JS, Quesada A, Quiblier C and Yéprémian C. 2017. Basic Guide to Detection and Monitoring of Potentially Toxic Cyanobacteria. 46-70. In *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. 1st ed John Wiley and sons.

Sassolas A, Catanante G, Fournier D, Martya J. 2011. Development of a colorimetric inhibition assay for microcystin-LR detection: Comparison of the sensitivity of different protein phosphatases. *Talanta*. **Vol 85**: 2498– 2503.

Saunders R and Deane C. 2010. Synonymous codon usage influences the local protein structure observed. *Nucleic Acids Res*. **Vol 38**: 6719–6728.

Schirrmann T, Meyer T, Schütte M, Frenzel A, Hust M. 2011. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules*. **Vol 16**:412-426.

Schroeder H and Cavacini L. 2010. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. **Vol 125**: 41–52.

Shahsavarian M, Chaaya N, Costa N, Boquet D, Atkinson A, Offmann B, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, Friboulet A, Avalle B and Padiolleau-Lefèvre S. 2017. Multitarget selection of catalytic antibodies with β -lactamase activity using phage display. *FEBS J*. **Vol 284**: 634-653.

Shahsavarian M, Le Minoux D, Matti KM, Kaveri S, Lacroix-Desmazes S, Boquet D, Friboulet A, Avalle B and Padiolleau-Lefèvre S. 2014. Exploitation of rolling circle amplification for the construction of large phage-display antibody libraries. *J Immunol Methods*. **Vol 407**: 26-34.

Shahsavarian M. 2015. Genesis of immune diversity and selection of catalytic antibodies: A new investigation. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, France.

Shamsara J. 2018. Correlation between Virtual Screening Performance and Binding Site Descriptors of Protein Targets. *Int J Med Chem*. doi: 10.1155/2018/3829307. eCollection 2018.

Shephard G, Stockenstrom S, de Villiers D, Engelbrecht W, Sydenham E, Wessels G. 1998. Photocatalytic degradation of cyanobacterial microcystin toxins in water. *Toxicon*. **Vol 36**: 1895-1901.

Sidhu S. 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering*. **Vol 18**: 57-63.

Sim A and Mudge L. 1994. Detection of Hepatotoxins by Protein Phosphatase Inhibition Assay: Advantages, Pitfalls, and Anomalies. 100-105. In: *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*, 1st ed The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*. **Vol 14**:41-51.

- Singh DP, Tyagi MB, and Kumar A. 1999. Cyanobacterial toxins. 61-72. In: Cyanobacterial and algal metabolism and environmental biotechnology. Narosa Publishing House.
- Singh S., Srivastava A, Ohb H-M., Ahn C-Y., Choi G., Asthana R. 2012. Recent trends in development of biosensors for detection of microcystin- *Toxicon*. **Vol 60**: 878–894.
- Sivonen K, and Jones J. 1999. Cyanobacterial toxins. 41–111. In: Chorus I, Bartram J, Toxic cyanobacteria in water: A guide to Natural toxins from Cyanobacteria public health significance, consequences, monitoring and management. 1st ed E & FN Spon.
- Smienk H, Dominguez E, Rodriguez-Velasco M, Clarke D, Kapp K, Katikou P, Cabado AG, Otero A, Vieites JM, Razquin P and Mata L. 2013. Quantitative determination of the okadaic acid toxins group by a colorimetric phosphatase inhibition assay: interlaboratory study. *Journal of the AOAC International*. **Vol 96**:77–85.
- Smith GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. **Vol. 228**: 1315–1317.
- Šnajder M, Mihelić M, Turk D, Ulrih NP. 2015. Codon optimisation is key for pernisine expression in *Escherichia coli*. *PLoS One*. **Vol 10(4)**: e0123288.
- Sorouri M, Fitzsimmons S, Aydanian A, Bennett S, Shapiro M. 2014. Diversity of the antibody response to tetanus toxoid: comparison of hybridoma library to phage display library. *PLoS ONE*. **Vol 9**. e106699. doi: 10.1371/journal.pone.0106699.
- Spoof L, Neffling M and Meriluoto J. 2010. Fast separation of microcystins and nodularins narrow-bore reversed-phase columns coupled to a conventional HPLC system. *Toxicon*. **Vol 55**: 954–964.
- Spoof L, Vesterkvist P, Lindholm T, Meriluoto J. 2003. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **Vol 1020**: 105-119.
- Staley J.T, Bryant M.P, Pfennig N and Holt J G. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. **Vol. 3**. Williams & Wilkins.
- Štraser A, Filipic M and Zegura B. 2013. Cyindrospermopsin induced transcriptional responses in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicology In Vitro*. **Vol 27**: 1809–1819.
- Svircev Z, Krstic S, Miladinov-Mikov M, Baltic V, Vidovic M. 2009. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J Environ Sci Health Part C-Environ Carcinogen & Ecotox Rev*. **Vol 27**:36–55.
- Tippkötter N, Stückmann H, Kroll S, Winkelmann G, Noack U, Scheper T, Ulber R. 2009. A semi-quantitative dipstick assay for microcystin. *Anal Bioanal Chem*. **Vol 394**: 863–869.
- Tohidkia MR, Barar J, Asadi F and Omid Y. 2012. Molecular considerations for development of phage antibody libraries. *J Drug Target*. **Vol 20**: 195-208.
- Trifirò G, Barbaro E, Gambaro A, Vita V, Clausi MT, Franchino C, Palumbo P, Floridi F and De Pace R. 2016. Quantitative determination by screening ELISA and HPLC-MS/MS of microcystins LR, LY,

- LA, YR, RR, LF, LW, and nodularin in the water of Occhito lake and crops. *Anal Bioanal Chem.* **Vol 408**: 7699–7708.
- Trott O, Olson AJ. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* **Vol 31**:455-461.
- Tsuji K, Watanuki T, Kondo F, Watanabe M, Suzuki S, Nakazawa H, Suzuki M, Uchida H, Harada K-I. 1995. Stability of microcystins from cyanobacteria. II: Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon.* **Vol 33**: 1619-1631.
- Tsumoto K, Shinoki K, Kondo H, Uchikawa M, Juji T, Kumagai I. 1998. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent--application to a human single-chain Fv fragment. *J Immunol Methods.* **Vol 219** :119-129.
- Umetsu M, Tsumoto K, Hara M, Ashish K, Goda S, Adschiri T, Kumagai I. 2003. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J Biol Chem.* 2003. **Vol 278**:8979-8987.
- Van Appeldoorn M, van Egmond HP, Speijers G, Bakker G. 2007. Toxins of Cyanobacteria. *Mol.Nutr.Food Res.* **Vol 51**: 7-60.
- Van Dorst B, Mehta J, Rouah-Martin E, Blust R, Robbens J. 2012. Phage display as a method for discovering cellular targets of small molecules. *Methods.* **Vol 58**. 56-61.
- Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste B and Massart D. 2001. Guidance for robustness: ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **Vol 24**: 723-753.
- Vasas G, Gásprár A, Surányi G, Batta G, Gyémánt G, M-Hamvas M, Máthé C, Grigorszky I, Molnár E, Borbély G. 2002. Capillary Electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum* by plant test (Blue-Green Sinapis Test). *Analytical Biochemistry.* **Vol 302**: 95–103.
- Vinogradova T, Danaher M, Baxter A, Moloney M, Victory D and Haughey S. 2011. Rapid surface plasmon resonance immunobiosensor assay for microcystin toxins in blue-green algae food supplements. *Talanta.* **Vol 84**: 638–643.
- Welker M, Fastner J, Erhard M and von Dohren H. 2002. Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. *Environmental Toxicology.* **Vol 17**: 367–374.
- Weller M. 2000. Immunochromatographic techniques—a critical review. *Fresen J. Anal. Chem.* **Vol 366**: 635–645.
- Weller M. 2013. Immunoassays and Biosensors for the Detection of Cyanobacterial Toxins in Water. *Sensors.* **Vol 13**: 15085-15112.
- Williams BR and Sharon J. 2002. Polyclonal anti-colorectal cancer Fab phage display library selected in one round using density gradient: centrifugation to separate antigen-bound and free phage. *Immunol. Lett.* **Vol 81**: 141-148.

- Wilson WD. 2002. Analyzing biomolecular interactions. *Science*. **Vol 295**: 2103-2105.
- Wu C, Liu I, Lu R, Wu H. 2016. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. *J Biomed Sci*. **Vol 19**. 23-28.
- Xie L and Park HD. 2007. Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction. *Aquaculture*. **Vol 271**: 530–536.
- Xu JL, Davis MM. 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity*. **Vol 13**:37–45.
- Yang Z, Zhang L, Zhang Y, Zhang T, Feng Y, Lu X, Lan W, Wang J, Wu H, Cao C, Wang X. 2011. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS One*. **Vol 6** (7): e22981.
- Yribarren AS. 2003. Sélection et caractérisation d'inhibiteurs d'une activité de type bêta-lactamase portée par un anticorps anti-idiotypique : Approche combinatoire par l'utilisation d'une banque peptidique en surface de bactériophage. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, France.
- Zahnd C, Amstutz P and Plückthun A. 2007. Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat Methods*. **Vol 4**: 269-279.
- Zeck, A, Eikenberg A, Weller M and Niessner, R. 2001-A. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine] microcystins. *Anal. Chim. Acta*. **Vol 441**. 1–13.
- Zeck A, Weller M, Bursill D and Niessner R. 2001-B. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against ADDA. *Analyst*. **Vol 126**: 2002–2007.
- Zhang C. 2012. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol*. **Vol 901**:117-135.
- Zhang X, He K, Zhao R, Wang L, Jin Y. 2016. Cloning of scFv from hybridomas using a rational strategy: Application as a receptor to sensitive detection microcystin-LR in water. *Chemosphere*. **Vol 160**:230-236.
- Zhao H and T. J. 2013. A graphene and multienzyme functionalized carbon nanosphere-based electrochemical immunosensor for microcystin-LR detection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **Vol 103**: 38-44.
- Zhao S, Shen P, Zhou Y, Wei Y, Xin X and Hua Z. 2005. Selecting peptide ligands of microcystin-LR from phage displayed random libraries. *Environ Int*. **Vol 31**. 535-541.

Annexes

Liste des annexes

I- 1. Conjugaison de la MC-LR aux protéines porteuses : l'ovalbumine (OVA) et la KLH.....	2
I-2. Dosage protéique à l'Acide Bicinchoninique (BCA)	2
I-3. ELISA	3
I-4. Electrophorèse par SDS PAGE 10 %	3
I-5. Western-Blot.....	4
I-6. Préparation d'anticorps monoclonaux par la technologie des hybridomes.....	6
I-6.a- Immunisation des souris	6
I-6.b- Production d'anticorps monoclonaux	6
I-6.c- Caractérisation immunologique - ELISA	6
I-7. Sélection par Phage Display de scFv dirigés contre la MC-LR.....	6
I-7.a- Préparation de la banque de phages	7
I-7.b- Précipitation des phages	7
I-7.c- Sélection des phages spécifiques à la MC-LR.....	7
I-7.d- Titration des phages.....	7
I-8. Phage-ELISA.....	8
I-9. Séquençage des 11 clones sélectionnés	8
I-10. Clonage et Production des scFv sous forme soluble.....	11
I-10.a- Le vecteur d'expression pET9c	11
I-10.b- Séquences optimisées des scFv	11
I-10.c- Production des scFv sous forme soluble.....	12
I-11. Caractérisation biochimique et validation de la fonctionnalité.....	15
I-11.a- ELISA Sandwich	15
I-11.b- Etude des interactions des anticorps commerciaux avec la MC-LR par SPR	15
I-11.c- Etude des interactions du scFv 3A8 avec la MC-LR par SPR.....	15
I-11.d- ELISA compétitif	15

I- 1. Conjugaison de la MC-LR aux protéines porteuses : l'ovalbumine (OVA) et la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*)

Principe

La conjugaison de la MC-LR à une protéine porteuse s'effectue grâce à l'EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide hydrochloride). Celui-ci réagit avec les groupements carboxyliques et induit la formation d'un intermédiaire (l'ester actif O-acyliso-urée) réagissant à son tour rapidement avec un groupement amine pour former une liaison amide et libérer un produit secondaire, l'iso-urée. Une liaison entre le groupement carboxylique de l'un et le groupement amine de l'autre s'établit ainsi.

Réactifs

Protéines porteuses 0.5 mg (OVA ou KLH Thermo Scientific, # 77120 et 77600 respectivement)

- Tampon de conjugaison : 0.1M MES (acide 2-(N-morpholino) ethanesulfonique Monohydrate) pH 4.5-5 (Thermo scientific # 28390)
- EDC 10 mg (Thermo Scientific # 77149)
- MC-LR 0.5 mg (ABRAXIS MCLR0.5MG)

Protocole

La protéine porteuse et la MC-LR sont dissoutes dans respectivement 50 µL et 125 µL de tampon de conjugaison puis mélangées ensemble (volume final 175 µL). 100 µL d'EDC 10 mg/mL préparés extemporanément sont ajoutés au mélange (dans le cas où la KLH est la protéine porteuse 50 µL d'EDC sont utilisés à la place de 100 µL pour éviter la précipitation du produit). Le mélange est conservé 2 heures à température ambiante.

I-2. Dosage protéique à l'Acide Bicinchoninique (BCA)

Principe

Cette méthode se base sur un dosage colorimétrique à 570 nm pour la détermination de la concentration en protéines. Une gamme étalon d'Albumine de Sérum Bovin (BSA) est préparée en parallèle afin de tracer une courbe étalon et déduire par la suite la concentration en protéines.

Réactifs

- Ampoule BSA : Protein Standard, Micro standard (Sigma, # P0914-5AMP)
- Kit BCA : solution A d'acide bicinchoninique (Sigma, # B9643-1L) et solution B de sulfate de cuivre (Sigma, # C2284-25mL) utilisées en ratio A/B de 50/1.

Protocole

Une gamme étalon d'Albumine de Sérum Bovin (BSA) est préparée en balayant les concentrations de 0 à 1 mg/mL. Le réactif de détection BCA est préparé extemporanément à partir d'une solution A d'acide bicinchoninique et d'une solution B de sulfate de cuivre en respectant le ratio A/B : 50/1.

10 µL de chaque point de gamme et de chaque échantillon sont déposés en duplicats dans une plaque 96 puits, auxquels sont ajoutés 200 µL du réactif BCA. L'absorbance est mesurée à 560 nm après incubation de la plaque pendant 30 minutes à 37°C. L'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 570 nm et est proportionnelle à la concentration massique des protéines.

I-3. ELISA

Principe

Cette méthode se base sur un dosage immuno-enzymatique qui permet l'étude d'interaction entre la MC-LR et les anticorps commerciaux AD4G2 et MC10E7. L'utilisation d'anticorps conjugués à un marqueur enzymatique adaptés permet la révélation.

Réactifs

- Tampon Carbonate d'immobilisation : solution A : Na_2CO_3 0,1 M, solution B : NaHCO_3 0,1 M (30 mL de solution A + 70 mL de solution B), pH 9,6
- PBS 1x : NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHPO_4 10 mM et KH_2PO_4 1,8 mM
- Tampon de saturation : PBS 1x et gélatine en poudre 1%.
- Tampon de lavage PBST : PBS 1x et Tween-20 0,05%.
- Anticorps primaires : AD4G2 (Enzo # ALX-804-585-C100) ou MC10E7 (Enzo # ALX-804-320-C200) dilués au 1/10 000 dans du PBS 1x.
- Anticorps secondaire : Anti-IgG de souris couplé HRP (Abliance # BI2413C)
- Substrat de l'enzyme HRP : ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (Merck Millipore 194434).

Protocole

L'ELISA est réalisé dans des plaques 96 puits Maxisorb (Nunc). L'immobilisation de l'OVA-MC s'effectue après dilution dans le tampon carbonate à 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à raison de 100 μl /puits en duplicats (les conditions de la KLH-MC sont similaires dans le cas d'un ELISA visant à tester le couplage de cette protéine porteuse). La plaque est incubée 2h à 37°C puis lavée 3 fois avec 300 μL de PBST. Entre chaque étape, trois lavages (300 μL) de 5 min sont effectués avec du PBST sous légère agitation.

La saturation est réalisée avec le tampon de saturation (300 μL), 1h à 37°C.

100 μL /puits de l'anticorps primaire sont ajoutés et la plaque est incubée 2h à 37°C.

Ensuite 100 μL /puits de l'anticorps secondaire sont ajoutés et la plaque est incubée 1h à 37°C.

100 μL de la solution d'ABTS sont déposés par puits, puis l' $A_{405 \text{ nm}}$ est lue après incubation de la plaque à l'obscurité, pendant 30 minutes, à température ambiante.

I-4. Electrophorèse par SDS PAGE 10 %

Réactifs :

- Préparation de 2 gels de SDS-PAGE à 1.5 mm d'épaisseur :

	Gel de concentration 5%	Gel de migration 10%
Eau mQ	6,8 mL	8 mL
Acrylamide/bis-Acrylamide 40%	2 mL	6,6 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (gel de séparation)	3 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (gel de charge)	-	5 mL
SDS 10%	120 μL	200 μL
APS (Amonium PerSulfate) 10%	120 μL	200 μL
TEMED	120 μL	200 μL

- Tampon de charge Laemmli 4x :

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	250 mM
Glycérol	25%
SDS	8%
Bleu de bromophénol	0,04%
β -mercaptoéthanol	20%
Eau mQ	qsp 10 mL

- Tampon de migration 1x :

Tris	25 mM
Glycine	192 mM
SDS	0,1%
Eau mQ	qsp 1 L

- Solution de coloration au Bleu de Coomassie :

Bleu de Coomassie R-250	2g
Solution de décoloration	1 L

- Solution de décoloration :

Ethanol	20 %
Acide acétique	10 %

Protocole :

Les échantillons sont préparés par dilution avec le tampon de charge 4x. Le marqueur de masse molaire utilisé est le PageRuler (ThermoFisher # 26616). Après dépôt des échantillons dans les puits (60 μ L maximum), la migration est réalisée dans le tampon de migration sous une tension de 200 V pendant 45 minutes.

Le gel est coloré par incubation dans la solution au Bleu de Coomassie pendant 30 min sous agitation. Il est ensuite décoloré par incubations successives dans plusieurs bains de décoloration sous légère agitation.

I-5. Western-Blot

Réactifs

- Tampon de transfert 1x:

Tris	25 mM
Glycine	192 mM
Méthanol	20%
Qsp eau MQ	1L

- Tampon de saturation : Milk-PBS 2%

Lait en poudre	2 g
PBS 1x	100 ml

- Tampon de lavage : PBST 0,05%
- Anticorps primaires AD4G2 (Enzo # ALX-804-585-C100) ou MC10E7 (Enzo # ALX-804-320-C200)
- Anticorps secondaire Anti IgG de souris couplé HRP (Abliance # BI2413C)
- Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, # 32209)
- Révélateur et fixateur Kodak

Protocole

Après migration électrophorétique, les protéines du gel de polyacrylamide sont transférées sur membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert pendant 1 heure sous une tension de 100 V. Ensuite la membrane est saturée dans le tampon de saturation pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Après chaque étape, la membrane est lavée 5 min sous légère agitation. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire (dilué dans le PBS au 1/10 000^{ème}), puis avec l'anticorps secondaire couplé HRP (dilué dans le PBS à 1/1000) également pendant 1 h à température ambiante et sous agitation. L'activité peroxydase est révélée à l'aide du kit ECL en suivant les recommandations du fournisseur. Après 2 min environ, la réaction produit une lumière détectable sur film autoradiographique.

I-6. Préparation d'anticorps monoclonaux par la technologie des hybridomes

I-6.a- Immunisation des souris

Deux souris (SWISS) ont été immunisées par voie sous-cutanée en utilisant la KLH-MC à 5 µg/mL homogénéisée dans l'adjuvant complet de Freund. Après deux semaines, chaque souris a reçu une nouvelle injection sous-cutanée, comme décrit précédemment, mais en présence d'adjuvant incomplet de Freund. Après dix jours, la réactivité sérique de ces animaux a été testée par ELISA.

Trois injections sous-cutanées supplémentaires ont été effectuées à 20 jours d'intervalle avec 20 µg de chaque antigène émulsionné dans l'adjuvant incomplet de Freund. Une semaine après la dernière injection, du sang a été prélevé et le titre en anticorps spécifiques a été évalué par ELISA sur des dilutions successives du sérum.

L'animal ayant le meilleur titre en anticorps a reçu une dernière injection de 5 µg d'antigène dilué dans 100 µl de PBS, par voie intraveineuse. Trois jours plus tard l'animal a été sacrifié et sa rate prélevée.

I-6.b- Production d'anticorps monoclonaux

Les cellules spléniques ont été fusionnées aux cellules de myélome SP2/0 préalablement mises en culture dans du milieu DMEM 10 (Dulbecco's Modified Eagle Medium mélangé avec du sérum bovin fœtal à 10%). La fusion cellulaire a été réalisée par ajout progressif de PEG 1500 (polyéthylèneglycol). Après centrifugation, les cellules sont mises en culture dans un milieu sélectif HAT (hypoxanthine, aminoptérine et thymidine), réparties dans des plaques 96 puits à raison d'une cellule par puits, et enfin incubées à 37°C sous atmosphère de 5% de CO₂. Quinze jours plus tard, le surnageant prélevé des puits est testé par ELISA. Les lignées cellulaires d'hybridomes positives sélectionnées sont ensuite sous-clonées par la méthode de dilutions limites à raison d'une cellule tous les 3 puits. Vingt jours après le clonage, le test ELISA est répété pour confirmer la présence d'anticorps spécifiques dans le surnageant des cellules hybrides ainsi sous-clonées. Le titre des anticorps mesuré est de 1/20 000, ce qui valide le succès de la stratégie d'immunisation réalisée.

I-6.c- Caractérisation immunologique - ELISA

10 mg/mL de KLH/MC dilués avec du tampon carbonate ont été immobilisés sur les puits des plaques NUNC 96 puits pendant 12 à 16 heures à 4°C. Après l'étape d'immobilisation, les puits sont lavés 3 fois avec du PBST 0,05%, puis saturés avec du PBS contenant 2% de caséine pendant 2 heures à 37°C. Ensuite, la plaque est lavée de nouveau et incubée avec les sérums d'animaux immunisés dilués dans un tampon d'incubation (PBS, 0,25% de caséine, 0,05% de Tween 20). L'anticorps secondaire utilisé est l'anti-Ig G de souris conjugué à la peroxydase (dilué à 1 :4000 dans du tampon d'incubation). La révélation de l'activité enzymatique est assurée grâce à une solution d'orthophénylènediamine (OPD). De l'acide sulfurique est ajoutée 15 minutes plus tard pour arrêter la réaction. Enfin, la lecture d'absorbance est effectuée à 492 nm.

I-7. Sélection par Phage Display de scFv dirigés contre la MC-LR

La procédure de sélection se déroule en plusieurs étapes successives :

I-7.a- Préparation de la banque de phages

Des souches d'*E. coli* sont infectées par les phages exprimant les scFv des quatre banques (souris saines et naïves, souris saines et immunisées, souris sensibles à l'auto-immunité et naïves et enfin souris sensibles à l'auto-immunité et immunisées). Ensuite, elles sont mises en culture dans un milieu liquide 2xYT additionné de 25 µg/mL de chloramphénicol et 1% de glucose, puis incubées à 37 °C sous agitation jusqu'à ce que l' A_{600nm} atteigne 0,5 UDO. Les bactéries ainsi transformées sont infectées par le phage helper M13K07 (New England Biolabs, # N0315S) avec un rapport phage/cellules bactériennes de 1/20, puis incubées à 37 °C pendant 30 minutes sans agitation. Les cellules infectées sont ensuite centrifugées à 3300 g pendant 10 minutes et le culot est alors remis en suspension avec 300 mL de 2xYT contenant 25 µg/mL de chloramphenicol et 25 µg/mL de kanamycine. La culture est menée durant toute la nuit à 30 °C sous agitation.

I-7.b- Précipitation des phages

La culture amplifiée est centrifugée à 3300 g pendant 30 minutes. Le surnageant est mélangé avec une solution de PEG (PEG 8000 avec 2,5 mM de NaCl) de volume égal à 1/5 de celui du surnageant. Le mélange est alors incubé à 4 °C sur de la glace pendant 1 heure puis centrifugé à 10800 g pendant 30 minutes à 4 °C. Le culot contenant les phages est remis en suspension dans 40 mL de H₂O mQ. Cette étape est effectuée deux fois mais la deuxième fois la centrifugation est de 3300 g et les phages sont remis en suspension dans 2 ml de H₂O mQ.

I-7.c- Sélection des phages spécifiques à la MC-LR

La protéine porteuse conjuguée à la MC-LR est directement immobilisée au fond de la microplaque après dilution dans le tampon carbonate à 2,5 µg/mL puis incubation à 37°C pendant 2h. Après lavage des puits avec du PBST et saturation avec la gélatine-PBS 1% pendant 1h à 37°C, les phages, dilués à 5×10^{12} phages dans du PBS, sont mis en contact avec la cible puis incubés 2h sous légère agitation à température ambiante. Les phages non-spécifiques sont éliminés par une série de lavages sous agitation (10 lavages de 5 minutes), tandis que les phages retenus sur la cible sont élués par une solution acide de 0,1 M de glycine-HCl (pH 2,2) incubés à température ambiante pendant 30 minutes sous agitation. La fraction élue est ensuite neutralisée par addition d'une solution basique de Tris-base 2M de volume égal à 11% du volume des phages récupérés.

Les phages élués sont alors quantifiés par titration puis amplifiés par infection bactérienne et soumis de nouveau à un cycle de sélection. Plusieurs cycles successifs sont réalisés, en augmentant éventuellement la pression de sélection (au niveau du 4^{ème} cycle de la 1^{ère} stratégie SOM où la quantité de phages mis en contact avec la cible a été réduite de $5 \cdot 10^{12}$ à $5 \cdot 10^{11}$ phages) ou en alternant avec des cycles de sélection négative (où seuls les OVA sont immobilisés au fond des puits).

En ce qui concerne l'élution par compétition, l'AD4G2 a été dilué à 1/5 000 et les MC-LR libres à 25 µg/mL.

I-7.d- Titration des phages

Les bactéries TG1 sont mises en culture dans du milieu LB jusqu'à ce qu'elles atteignent une A_{600nm} de 0,5 UDO. Les phages récupérés après chaque cycle de sélection sont dilués en cascade dans H₂O mQ à un facteur de 10 allant jusqu'à 10^{-12} . 100 µL de chaque dilution sont utilisés pour infecter 900 µL de la culture bactérienne. Les cellules infectées sont incubées à 37 °C pendant 30 minutes puis mises en culture

jusqu'au lendemain à 37 °C sur un milieu LB agar contenant du chloramphénicol à 25 µg/mL. La quantité des phages infectieux est alors déterminée par le nombre de colonies obtenues.

I-8. Phage-ELISA

La procédure de Phage-ELISA est la même que celle de la sélection jusqu'à l'étape des 10 lavages des phages non spécifiques. Les phages liés spécifiquement sont détectés par un anticorps dirigé contre la protéine majeure du manteau (la protéine pVIII) et marqué à la peroxydase (GE-Healthcare, # 27-9421-01). Cet anticorps est dilué au 1/1 000^{ème} dans du PBS et incubé 1 heure à 37°C. Le substrat de la HRP (ABTS, Merck Millipore, # 194434) est ajouté dans les puits (100µL/puits) et incubé pendant 10 à 15 minutes à l'abri de la lumière avant de lire l'absorbance à 405 nm.

I-9. Séquençage des 11 clones sélectionnés

Les phagemides de chaque clone ont été purifiés à l'aide du kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, #12162) selon le protocole du fournisseur. Les plasmides purifiés ont été envoyés pour séquençage à MWG-Eurofins (Ebersberg, Allemagne), en utilisant des amorces s'hybridant directement sur le vecteur phagique pAK100, en amont et aval du scFv, et dont les séquences sont respectivement :

pAK100back: 5' TGT AGC GCG TTT TCA TCG GC 3'

pAK100for: 5' GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3'

Séquences des 5 scFv possédant des domaines V_H ou V_L non fonctionnels :

Les début et fin de la séquence sont marqués en violet. En vert, la séquence de la région variable de la chaîne légère (V_L), en rouge la séquence du *linker*, en bleu celle de la région variable de la chaîne lourde (V_H), * indique un codon stop, et enfin les nucléotides résiduels provenant du vecteur pAK100 lors du clonage de la banque sont représentés en noir.

I-9.a- Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOKMa montrant une V_H non fonctionnelle

```

ATG GCG CTG GCC GAA ATT CTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA CTC ATG GCT GCA TCT CCA
M A L A E I L L S Q S P A L M A A S P
GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT CTA AGT TAC ATG TCC TGG
G E K V T M T C S A S S S L S Y M S W
TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC ATC CTG
Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S I L
GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC
A S G V P A R F S G S G T S G T S Y S L
ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TCC TGC CAG CAG TAT CAT
T I S R M E A E D A A T Y S C Q Q Y H
AGT TAC CCA CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGT GGT GGT GGT
S Y P R T F G G G T K L E I K R G G G
GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC CAG GTC
G S G G G G S G G G G S G G G S Q V
CAA CTG CAG CAG CCT GAC ATC TGA GGA CTC TGC GGT CTA TTT CTG TGC AAG ACA AGA
Q L Q Q P D I * G L C G L F L C K T R
CAC CTC AGG CTT TGC TTA CTG GGG CCC AGG GAC TCT GGT CAC TGT CTC TGC GGC CTC
H L R L C L L G P R D S G H C L C G L
GGG GGC CGA ATT CGA GCA GAA GCT GAT CTC TGA GGA AGA CCT GTA GGG TGG TGG CTC
G G R I R A E A D L * G R P V G W W L
TGG TTC CGG TGA TTT TGA TTA TGA AAA GAT GGC AAA CGC TAA T
W F R * F * L * K D G K R *

```

I-9.b- Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOKMc1 montrant une V_L non fonctionnelle

CTT ATC AGA CCG TTT CCC GCG TGG TGA ACC AGG CCA GCC ACG TTT CTG CGA AAA CGC
 L I R P F P A W * T R P A T F L R K R
 CGG CCA TGG CGC TGG CCG AAA TTG TTC TCA CCC AGT CTC AAA AAT TCA TGT CCA CAT
 R P W R W P K L F S P S L K N S C P H
 CAG TAG GAG ACA GGG TCA GCG TCA CCT GCA AGG CCA GTC AGT ATT CAT GGT ACT CAT
 Q * E T G S A S P A R P V S I H G T H
 TTA ATG CAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT
 L M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L
 GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGG ATC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA
 A S N L E S G I P A R F S G S G S R T
 GAC TTC ACC CTC ACC ATT AAT CCT GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT TAC TGT
 D F T L T I N P V E A D D V A T Y Y C
 CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAG CTG AAA
 Q Q S N E D P P T F G G G T K L E L K
 CGT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT
 R G G G G S G G G G S G G G G S G G G
 GGA TCC GAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG GTT GTG AAG CCT GGG GCT TCA
 G S E V Q L Q Q P G A E V V K P G A S
 GTG AAG GTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ATC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG
 V K V S C K A S G Y I F T S Y W M H W
 GTA AAA CAG AGG CCC GGA CAA GGC CTT GAA TGG ATC GGA GTG ATT GAT CCC TCT ACT
 V K Q R P G Q G L E W I G V I D P S T
 AAT CAT ACT AAC AAC AAT CCA AAA TTC AAT GAC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GGC ACA
 N H T N N N P K F N D K A T L T V G T
 TTC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC
 F S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V
 TAT TAC TGT GCA AGA TGG GGC ACT ACG GAG GGC TTT GCG TAT TGG GGC CAA GGG ACT
 Y Y C A R W G T T E G F A Y W G Q G T
 CTG GTC ACT GTC TCT GCG GCC TCG GGG GCC GAA TTC GAG CAG AAG CTG ATC TCT GAG
 L V T V S A A S G A E F E Q K L I S E
 GAA GAC CTG TAG GGT GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT GAT TAT GAA AAG ATG GCA
 E D L * G G G S G S G D F D Y E K M A
 AAC GCT AAT AA
 N A N

I-9.c- Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOKMc2 montrant une V_H non fonctionnelle

ATG GCG CTG GCC GAA ATT CTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA CTC ATG GCT GCA TCT CCA
M A L A E I L L S Q S P A L M A A S P
 GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT CTA AGT TAC ATG TCC TGG
 G E K V T M T C S A S S S L S Y M S W
 TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC ATC CTG
 Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S I L
 GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC
 A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L
 ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TCC TGC CAG CAG TAT CAT
 T I S R M E A E D A A T Y S C Q Q Y H
 AGT TAC CCA CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGT GGT GGT GGT
 S Y P R T F G G G T K L E I K R G G G
 GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC CAG GTC
 G S G G G G S G G G G S G G G G S Q V
 CAA CTG CAG CAG CCT GAC ATC TGA GGA CTC TGC GGT CTA TTT CTG TGC AAG ACA AGA
 Q L Q Q P D I * G L C G L F L C K T R
 CAC CTC AGG CTT TGC TTA CTG GGG CCC AGG GAC TCT GGT CAC TGT CTC TGC GGC CTC
 H L R L C L L G P R D S G H C L C G L
 GGG GGC CGA ATT CGA GCA GAA GCT GAT CTC TGA GGA AGA CCT GTA GGG TGG TGG CTC
 G G R I R A E A D L * G R P V G W W L
 TGG TTC CGG TGA TTT TGA TTA TGA AAA GAT GGC AAA CGC TAA TAA C
 W F R * F * L * K D G K R * *

I-9.d- Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOKMc4 montrant une V_H non fonctionnelle

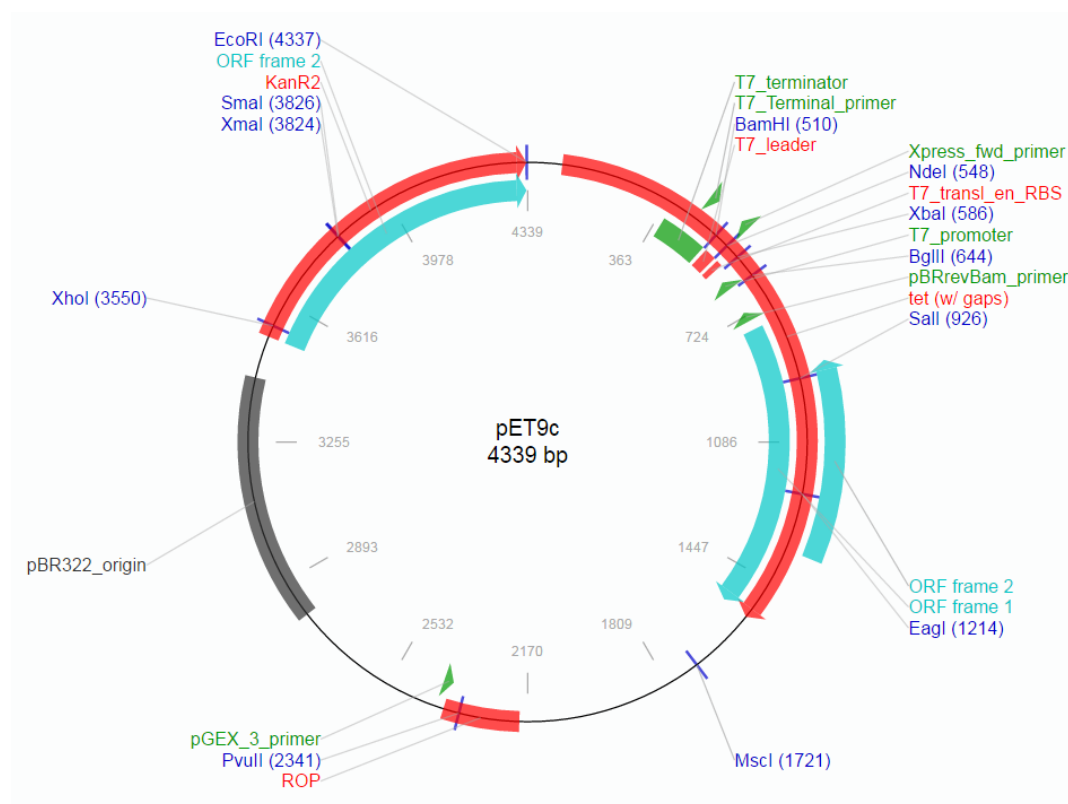
ATG GCG CTG GCC GAA ATT CTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA CTC ATG GCT GCA TCT CCA
M A L A E I L L S Q S P A L M A A S P
 GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT CTA AGT TAC ATG TCC TGG
 G E K V T M T C S A S S S L S Y M S W
 TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC ATC CTG
 Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S I L
 GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC
 A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L
 ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TCC TGC CAG CAG TAT CAT
 T I S R M E A E D A A T Y S C Q Q Y H
 AGT TAC CCA CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGT **GGT GGT GGT**
 S Y P R T F G G G T K L E I K R **G G G**
GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC CAG GTC
G S G G G G S G G G G S G G G S Q V
CAA CTG CAG CAG CCT GAC ATC TGA GGA CTC TGC GGT CTA TTT CTG TGC AAG ACA AGA
Q L Q Q P D I * G L C G L F L C K T R
 CAC CTC AGG CTT TGC TTA CTG GGG CCC AGG GAC TCT GGT CAC TGT CTC TGC GGC CTC
 H L R L C L L G P R D S G H C L C G L
 GGG GGC CGA ATT CGA GCA GAA GCT GAT CTC TGA GGA AGA CCT GTA GGG TGG TGG CTC
 G G R I R A E A D L * G R P V G W W L
 TGG TTC CGG TGA TTT TGA TTA TGA AAA GAT GGC AAA CGC TAA TA
 W F R * F * L * K D G K R *

I-9.e- Séquences nucléotidique et protéique du scFv SOKMc6 montrant une V_H non fonctionnelle

ATG GCG CTG GCC GAA ATT CTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA CTC ATG GCT GCA TCT CCA
M A L A E I L L S Q S P A L M A A S P
 GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT CTA AGT TAC ATG TCC TGG
 G E K V T M T C S A S S S L S Y M S W
 TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC ATC CTG
 Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S I L
 GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC
 A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L
 ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TCC TGC CAG CAG TAT CAT
 T I S R M E A E D A A T Y S C Q Q Y H
 AGT TAC CCA CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGT **GGT GGT GGT**
 S Y P R T F G G G T K L E I K R **G G G**
GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC CAG GTC
G S G G G G S G G G G S G G G S Q V
CAA CTG CAG CAG CCT GAC ATC TGA GGA CTC TGC GGT CTA TTT CTG TGC AAG ACA AGA
Q L Q Q P D I * G L C G L F L C K T R
 CAC CTC AGG CTT TGC TTA CTG GGG CCC AGG GAC TCT GGT CAC TGT CTC TGC GGC CTC
 H L R L C L L G P R D S G H C L C G L
 GGG GGC CGA ATT CGA GCA GAA GCT GAT CTC TGA GGA AGA CCT GTA GGG TGG TGG CTC
 G G R I R A E A D L * G R P V G W W L
 TGG TTC CGG TGA TTT TGA TTA TGA AAA GAT GGC AAA CGC TAA TAA
 W F R * F * L * K D G K R *

I-10. Clonage et Production des scFv sous forme soluble

I-10.a- Le vecteur d'expression pET9c



I-10.b- Séquences optimisées des scFv

I-10.b-1. Séquence optimisée de SOMa

```

ATG GAA ATT GTG CTG ACC CAG AGC CCG GCG ATT ATG AGC GCG AGC CCG GGC GAA AAA
GTG ACC ATG ACC TGC AGC GCG AGC AGC AGC ATT AGC TAT ATG CAT TGG TAT CAG CAG
AAA CCG GGC TTT AGC CCG AAA CTG CTG ATT TAT CGC ACC AGC AAC CTG GCG AGC GGC
GTG CCG GCG CGC TTT AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACC AGC TAT AGC CTG ACC ATT GGC
ACC ATG GAA GCG GAA GAT GTG GCG ACC TAT TAT TGC CAG CAG GGC AGC AGC ATT CCG
CTG ACC TTT GGC GCG GGC ACC AAA CTG GAA CTG AAA CGC GGC GGC GGC GGC AGC GGC
GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC GGC AGC GAA GTG AAA CTG GTG
GAA AGC GGC GGC GGC CTG GTG AAA CCG GGC GGC AGC CTG AAA CTG AGC TGC GCG GCG
AGC GGC TTT ACC TTT AGC GAT TAT TAT ATG TAT TGG GTG CGC CAG ACC CCG GAA AAA
CGC CTG GAA TGG GTG GCG ACC ATT AGC GAT GGC GGC AGC TAT ACC TAT TAT CCG GAT
AGC GTG AAA GGC CGC TTT ACC ATT AGC CGC GAT AAC CGC AAA AAC AAC CTG TAT CTG
CAG ATG AGC AGC CTG AAA AGC GAA GAT ACC GCG ATG TAT TAT TGC GTG CGC GAA GGC
CGC CGC CGC GAA GGC TAT GCG ATG GAT TAT TGG GGC CAG GGC ACC AGC GTG ACC GTG
AGC AGC

```

I-10.b-2. Séquence optimisée de SOKMc3

ATG GAA ATT CTG CTG AGC CAG AGC CCG GCG ATT ATG AGC GCG AGC CCG GGC GAA AAA
 GTG ACC ATG ACC TGC AGC GCG AGC AGC AGC GTG CGC TAT ATG CAT TGG TAT CAG CTG
 AAA AGC GGC ACC AGC CCG AAA CGC TGG ATT TAT GAT ACC AGC AAA CTG GCG AGC GGC
 GTG CCG AGC CGC TTT AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACC AGC TAT AGC CTG ACC ATT AGC
 AGC ATG GAA GCG GAA GAT GCG GCG ACC TAT TAT TGC CAG CAG TGG AGC AGC TAT CCG
 CTG ACC TTT GGC GGC GGC ACC AAA CTG GAA ATT AAA CGC GGC GGC GGC GGC AGC GGC
 GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC GGC AGC GAA GTG CAG CTG CAG
 GAA AGC GGC CCG GAA CTG GTG CGC CCG GGC GTG AGC GTG AAA ATT AGC TGC AAA GGC
 AGC AGC TAT ACC TTT ACC GAT TAT GCG ATG CAT TGG GTG AAA CAG AGC CAT GCG AAA
 AGC CTG GAA TGG ATT GGC GTG ATT AGC ACC TAT TAT GGC AAC ACC AAC TAT AAC CAG
 AAA TTT AAA GGC AAA GCG ACC ATG ACC GTG GAT AAA AGC AGC AGC ACC GCG TAT ATG
 GAA CTG GCG CGC CTG ACC AGC GAA GAT AGC GCG GTG TAT TAT TGC GCG CGC GAT TAT
 GGC AGC CGC GGC TAT TAT GCG ATG GAT TAT TGG GGC CAG GGC ACC AGC GTG ACC GTG
 AGC TGG

I-10.b-3. Séquence optimisée de SOKMc5

ATG GAA ATT CTG ATG ACC CAG AGC CCG AGC AGC CTG AGC GCG AGC CTG GGC GAT ACC
 ATT ACC ATT ACC TGC CAT GCG AGC CAG AAC ATT AAC GTG TGG CTG AGC TGG TAT CAG
 CAG AAA CCG GGC AAC ATT CCG AAA CTG CTG ATT TAT AAA GCG AGC AAC CTG CAT ACC
 GGC GTG CCG AGC CGC TTT AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACC GGC TTT ACC CTG ACC ATT
 AGC AGC CTG CAG CCG GAA GAT ATT GCG ACC TAT TAT TGC CAG CAG GGC CAG AGC TAT
 CCG CGC ACC TTT GGC GGC GGC ACC AAA CTG GAA CTG AAA CGC GGC GGC GGC GGC AGC
 GGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC GGC AGC GGC GGC GGC GGC AGC GAA GTG ATG CTG
 GTG GAA AGC GGC GGC GGC CTG GTG AAA CCG GGC GGC AGC CTG AAA CTG AGC TGC GCG
 GCG AGC GGC TTT ACC TTT AGC AGC TAT GCG ATG AGC TGG GTG CGC CAG ACC CCG GAA
 AAA CGC CTG GAA TGG GTG GCG ACC ATT GGC TAT GAT GGC CCG TAT ACC TAT TAT CCG
 GAT AAC GTG AAA GGC CGC TTT ACC ATT AGC CGC GAT AAC GAT AAC AAC AAC CTG TAT
 CTG CAG ATG AGC CAT CTG AAA AGC GAA GAT ACC GCG ATG TAT TTT TGC GCG CGC GAT
 CAG GCG TAT TAT AGC AAC TAT TAT GCG ATG GAT TAT TGG GGC CAG GGC ACC AGC GTG
 ACC GTG AGC AGC

I-10.b-4. Séquence optimisée de 3A8

ATG GCA GAG GTG CAG CTA CAG CAG TCG GGT GCG GAA GTA AAA AAA CCC GGG GCT TCC
 GTT AAA GTT AGC TGC AAA GTA TCG GGC TAT ACG TTG ACG GAG CTT TCA ATG CAT TGG
 GTC CGT CAA GCC CCG GGT AAA GGC TTG GAG TGG ATG GGT GGC TTT GAT CCG GAA GAT
 GGA GAA ACT ATC TAC GCG CAG AAA TTC CAA GGC CGA GTA ACG ATG ACT GAA GAC ACT
 TCT ACG GAT ACA GCC TAT ATG GAA CTT TCC AGC CTC CGT TCC GAA GAC ACG GCT GTT
 TAT TAC TGT GCG GGA TAC CGC TCT CCG ATG CCT ACA GCG AAC AAG TGG GGC CAG GGC
 ACC CTC GTC ACA GTT AGC TCA GGA GGA GGT AGC GGC GGC GGT GGC TCC GGG GGC
 GGC GGC AGT CTG CAG TCG GTC CTG ACC CAG CCT CCG AGT GCT AGC GGC ACC CCG GGG
 CAA CGG GTG ACC ATT AGC TGT AGC GGC AGT TCA TCA AAT ATT GGT AGT AAT TAC GTG
 TAT TGG TAC CAG CAA CTG CCG GGT ACC GCG CCG AAA TTA TTA ATT TAT CGC AAC AAC
 CAA CGC CCA TCC GGG GTG CCA GAC CGT TTT TCT GGT TCG AAG TCT GGT ACC AGC GCC
 TCT CTG GCA ATC TCG GGT CTG CGT AGT GAA GAC GAA GCG GAT TAT TAT TGC GCC GCA
 TGG GAT GAT AGC CTG GTG TTC GGC GGC GGT ACC AAA CTG ACC GTG CTG GGT CGC

I-10.c- Production des scFv sous forme soluble*I-10.c-1. Induction de l'expression des scFv par l'IPTG***Réactifs**

- Les quatre scFv clonés dans le vecteur pET9c

- IPTG solution mère à 1 M (Sigma-Aldrich, # I5502)
- LB : tryptone 1%, extrait de levure 1%, NaCl 10 mM et kanamycine 50 µg/ml

Protocole

Les bactéries BL21 compétentes sont transformées par électroporation avec le vecteur pET9c/scFv, puis mises en culture sur milieu LB-agar et incubés une nuit à 37°C. Une colonie est isolée et mise en culture dans 50 mL de LB additionné de kanamycine 50 µg/mL pour une nuit sous agitation. La préculture est ensuite diluée au 1/100^{ème} dans du LB contenant de la kanamycine à 50 µg/mL et incubée à 37°C sous agitation à 180 rpm. L'A_{600nm} est mesurée toutes les 30 minutes jusqu'à atteindre 0.6 UDO. L'IPTG est alors ajouté à la préculture à une concentration finale de 1 mM, puis les bactéries sont incubées 3h à 28°C sous agitation. Une culture non induite sera maintenue en parallèle comme contrôle. Après induction, l'A_{600nm} attendue est voisine de 2 à 3 UDO. Les cultures induites et non induites sont ensuite centrifugées à 2 500 g pendant 10 minutes à 4°C, et les culots sont conservés à -20°C.

I-10.c-2. Extraction

Réactifs

- Tampon de re-suspension

Tampon TRIS HCl	0,1 M, pH 8,0
Inhibiteurs de protéases	Un comprimé Complete Mini, Roche pour 10 mL de tampon TRIS

- Tampon de dénaturation

Urée	8 M
β-Mercaptoéthanol	10 mM
Tris	0,1 M, pH 8,0

Protocole

Les culots sont suspendus dans 5 ml le tampon de re-suspension puis soniqués pendant 30 secondes en force 2. Une centrifugation à 6000 g pendant 10 minutes à 4°C est effectuée, les culots sont re-suspendus dans 5 mL de tampon de dénaturation puis incubés 1h à 37°C sous agitation. Une nouvelle centrifugation de 30 min à la même vitesse est réalisée et les scFv sont récupérés à partir des surnageants.

I-10.c-3. Purification

Réactifs

- Tampon de dénaturation utilisé en I-10.c-2)
- Tampon d'éluion

Urée	8 M
β-Mercaptoéthanol	10 mM
Imidazole	200 mM
Tris	0,1 M, pH 8

- Résine Ni-NTA agarose (Qiagen, # 30210)

Protocole

Pour préparer la résine, 1 mL est centrifugé pendant une minute à 4000 g puis le surnageant est éliminé et la résine est reprise avec 1 ml de tampon de dénaturation. Cette étape est répétée 2 fois. Le culot de résine est alors re-suspendu dans le surnageant précédemment obtenu et incubé 1h à température ambiante sous légère agitation. Une centrifugation est effectuée pendant 1 minute à 4000 g et le surnageant est récupéré. Ce surnageant représente la fraction non retenue. Deux lavages successifs sont réalisés avec 1 mL de tampon de dénaturation par centrifugation pendant 1 minute à 4000 g. Pour éluer les scFv purifiés, 500 µL de tampon d'élution sont ajoutés au culot de résine puis incubés pendant 10 minutes à température ambiante sous légère agitation. La résine est alors centrifugée à 4°C pendant 2 minutes à 4000 g, et le surnageant est récupéré soigneusement et constitue la première fraction d'élution E1. Cette étape est renouvelée pour obtenir un deuxième éluat, E2. Enfin, toutes les fractions obtenues sont analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide coloré au de Coomassie.

*I-10.c-4. Renaturation*Réactifs

- Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4

NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M

- Urée (VWR, # 1370309012), L-Arginine 400 mM (Sigma, # W381918), TRIS 0,1 M (Sigma, # T1378), Glutathion oxydé (50 fois plus concentré que le scFv), Glutathion réduit (500 fois plus concentré que le scFv) (Sigma-Aldrich, # G4251 et G4376 respectivement)

Protocole

Après purification, les scFv sont toujours sous forme dénaturée. Afin de permettre leur renaturation et dans le but d'éliminer l'imidazole contenu dans le tampon d'élution, l'éluat est finalement soumis à une série de bains de dialyse en diminuant progressivement la concentration en urée. Le seuil de coupure des membranes de dialyse est de 3,5 kDa (Cellu-Sep T1 Regenerated Tubular membrane, Interchim). Toutes les dialyses sont effectuées à 4°C, pendant 8 à 12h sous légère agitation, sauf dans le cas de la première qui est à température ambiante. Un dosage protéique (BCA) est réalisé au deuxième jour (en l'absence d'imidazole). La concentration du scFv est alors ajustée à 10 µM avec du tampon de dialyse n°1 afin d'initier les étapes de renaturation suivantes avec une concentration maîtrisée de scFv. A la fin du processus de renaturation, l'échantillon est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 g, 4°C. Cette étape permet d'éliminer les éventuels précipités résiduels.

Dialyses	Urée	Arginine 0.4 M	Tris 0.1 M pH 8	Glutathion oxydé	Glutathion réduit	Tampon phosphate 0.1 M pH 7.4
N°1	8 M	+	+	-	-	-
N°2	4 M	+	+	-	-	-
N°3	2 M	+	+	-	-	-
N°4	1 M	+	+	500 µM	5 mM	-
N°5	0.5 M	+	+	500 µM	5mM	-
N°6	-	+	+	-	-	-
N°7	-	-	-	-	-	+

I-11. Caractérisation biochimique et validation de la fonctionnalité

I-11.a- ELISA Sandwich

La procédure de l'ELISA sandwich est la même que l'ELISA effectué dans le cadre de la vérification du couplage (Annexe I-3) mais ici, l'ajout des scFv remplace celui des anticorps AD4G2/MC10E7. Les scFv purs sont en principe à 10 μM et peuvent être dilués d'un facteur variant de $\frac{1}{2}$ à $\frac{1}{10^{\text{ème}}}$ selon les ELISA. L'anticorps secondaire est l'anti-His couplé à l'HRP (Clinisciences, sc-8036 HRP) dilué au $\frac{1}{1000}$ avec du PBS.

I-11.b- Etude des interactions des anticorps commerciaux avec la MC-LR par SPR

Réactifs

- Tampon d'immobilisation des anticorps ou fragments d'anticorps : Acétate de Sodium 10 mM
- Tampon de course : HBS-P pH 7.4 filtré à $0,2 \mu\text{m}$.

Hepes	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05%

Protocole

Pour immobiliser les anticorps commerciaux sur la puce CM5, une dilution a été préalablement effectuée à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le tampon d'acétate de Sodium (10 mM à pH 5,0) avant d'être injectés à un débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 8 minutes jusqu'à atteindre la R_L visée (ici 20 000 RU). Puis différentes concentrations de MC-LR, variant de 0 à 10 nM, sont injectées à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 5 minutes. Après chaque injection, la puce est régénérée par injection de 10 μL de tampon de NaOH 2,5 mM à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Les constantes d'affinité sont déterminées avec le logiciel BIAeval permettant un ajustement des données expérimentales à un modèle mathématique. L'alignement des résultats a été réalisé avec le modèle Steady State Affinity.

I-11.c- Etude des interactions du scFv 3A8 avec la MC-LR par SPR

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de scFv 3A8 dilués en acétate de sodium 10 mM pH 3,5 ont été injectés sur la puce CM5 à un débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 8 minutes, jusqu'à atteindre la R_L visée (ici 3500 RU). Pour l'analyse des interactions avec la MC-LR, la méthode Single Cycle Kinetics permettant l'injection de concentrations croissantes d'analyte sans régénération a été utilisée. Cinq concentrations croissantes successives de MC-LR ont ensuite été injectées à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 500 secondes, à savoir 50 - 150 - 300 - 500 et enfin 750 nM, diluées dans du PBS. De même les résultats sont analysés grâce au logiciel BIAeval.

I-11.d- ELISA compétitif

Pour effectuer l'ELISA compétitif, un protocole semblable à celui de l'ELISA Sandwich a été utilisé. Toutefois, une étape entre les lavages effectués après incubation avec les scFv et l'ajout des anticorps secondaires l'anti His /HRP a été ajoutée. Cette étape correspond à l'ajout de MC-LR libres de sorte qu'elle soit 100 fois supérieure à la concentration estimée en MC liée à l'Ovalbumine immobilisée.

Cette même démarche a été utilisée avec un extrait brut d'un échantillon prélevé sur le terrain. Dans ce cas, l'anticorps commercial AD4G2 a été utilisé à la place des scFv. L'anticorps secondaire était alors l'anti IgG/HRP (Abliance, # B12413C) dilué au $\frac{1}{1000^{\text{ème}}}$.