



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ

I.U.T. de METZ

THESE DE DOCTORAT
Spécialités : Immunologie – Microbiologie

**OBTENTION ET PRODUCTION D'ANTICORPS
MONOCLONAUX POUR LA DETECTION DIRECTE
D'ALCALIGENES EUTROPHUS CH34**

Présentée par
Frédéric MELCHIOR

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - - METZ	
N° inv.	19980915
Cote	S/M ₃ 98/44
Loc	Magasin

Soutenue publiquement le 27 octobre 1998

Devant le jury composé de :

Professeur MERGEAY Max	VITO MOL, Belgique	Rapporteur
Professeur WEISS Etienne	E.S.B.S., Strasbourg	Rapporteur
Docteur FALLA Jairo	I.U.T. de Metz	Examineur
Docteur BAUDA Pascale	Centre des Sciences de l'Environnement, Metz	Examineur
Docteur KLEIN Francis	Lécès-Environnement, Maizière les Metz	Membre invité

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Jairo FALLA pour sa compétence, ses conseils, sa disponibilité et surtout son aide sans laquelle ce travail n'aurait pas été aussi abouti. Je veux aussi le remercier pour sa confiance et pour m'avoir permis de connaître l'aventure de l'ouverture d'un nouveau laboratoire.

Je remercie également le Professeur Etienne Weiss qui a accepté, au pied levé, d'être rapporteur de cette thèse et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Mes remerciements vont aussi au Professeur Max Mergeay qui, par ses nombreux conseils, a permis d'améliorer la qualité de cette recherche.

Je remercie M. Francis Klein d'avoir cru, au nom du Lécès-Environnement, en mon travail et d'avoir permis qu'il se réalise.

Je remercie également le Dr. Pascale Bauda.

Je remercie chaleureusement Philippe Laval-Gilly pour m'avoir apporté un soutien efficace dans les moments difficiles, pour ses conseils diplomatiques, sa disponibilité et son amitié.

J'associe également à ce travail l'ensemble des personnes du département Génie Biologique de l'IUT de Thionville/Yutz pour leur aide et leur gentillesse.

Je remercie le Dr. Yves Lutz, de l'I.G.B.M.C., pour m'avoir initié au difficile travail d'obtention d'anticorps monoclonaux et à ses turpitudes.

Je tiens aussi à remercier la direction du C.N.P.E. Cattenom, et en particulier M. Ropars, pour son aide dans la réalisation de ce manuscrit.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille pour son soutien inconditionnel durant ce travail.

Avant-Propos

Ce travail a été réalisé grâce à des contrats avec les sociétés Lécès-Environnement (Maizière-les-Metz, 57) et SOLLAC Fensch et Orne (Florange, 57). Il a également obtenu le soutien financier des villes de Yutz et Thionville. La Région LORRAINE a aussi été partenaire dans cette recherche en co-finançant une partie de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
AVANT-PROPOS	4
TABLE DES MATIERES	5
ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	14
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1. <i>ALCALIGENES EUTROPHUS CH34</i>	17
1.1. <i>Description générale</i>	17
1.2. <i>Le chromosome bactérien</i>	19
1.3. <i>Résistances aux métaux lourds</i>	20
1.3.1. <i>Le plasmide pMOL30</i>	20
1.3.2. <i>Le plasmide pMOL28</i>	25
2. <i>MÉCANISME DE TRANSPORT DU FER</i>	29
2.1. <i>Généralités</i>	29
2.2. <i>Le sidérophore chez <i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34</i>	30
2.3. <i>Le mécanisme de transport du fer</i>	31
3. <i>LA MEMBRANE EXTERNE</i>	35
3.1. <i>La membrane externe des bactéries à Gram(-)</i>	35

3.2. Méthodes de séparation de la membrane externe.....	38
4. LES ANTICORPS MONOCLONAUX	40
4.1. Fonction et structure des anticorps	40
4.2. Production et isolement d'anticorps polydonaux et monodonaux.....	42
4.3. Anticorps polydonaux contre anticorps monodonaux	45
4.4. Culture des hybridomes	46
4.5. Purification des anticorps monodonaux	48
4.6. Méthodes d'immunisations in vitro - Induction d'une réponse immunitaire primaire.....	50

MATERIELS ET METHODES53

1. CULTURE D'ALCALIGENES EUTROPHUS CH34.....	53
1.1. Matériel biologique.....	53
1.2. Milieu de culture.....	53
1.3. Préparation de la solution SL7.....	54
1.4. Précultures de la bactérie.....	54
2. VÉRIFICATION DE LA PURETÉ DE LA SOUCHE BACTÉRIENNE.....	55
3. CULTURE DES AUTRES SOUCHES BACTÉRIENNES	56
4. TEST AU CHROME AZUROL S (CAS)	57
5. PRÉPARATION DES MEMBRANES EXTERNES.....	58
6. DOSAGE DE MARQUEURS SPÉCIFIQUES ET NON SPÉCIFIQUES DES FRACTIONS BACTÉRIENNES OBTENUES.	58
6.1. Dosage du 2-céto-3-désoxyoctonate	59
6.2. Dosage de la succinate déshydrogénase.....	60
6.3. Dosage des protéines.....	61
6.4. Mesure du poids sec.....	62

7.	ELECTROPHORÈSE SDS-PAGE	62
7.1.	<i>Préparation des deux gels</i>	63
7.1.1.	Gel de séparation	63
7.1.2.	Gel de concentration.....	64
7.2.	<i>Coloration au bleu de Coomassie</i>	64
7.3.	<i>Coloration au nitrate d'argent</i>	64
7.4.	<i>Détermination du poids moléculaire des protéines</i>	66
8.	SOURIS UTILISÉES	66
9.	PRÉPARATION DE L'IMMUNOGÈNE.....	66
10.	LA LIGNÉE SP2/O-AG14	67
10.1.	<i>Composition du milieu de culture</i>	67
10.2.	<i>Conditions de culture</i>	68
11.	PRÉPARATION DES MACROPHAGES INTRAPÉRITONÉAUX	68
12.	PROTOCOLE DE FUSION CELLULAIRE	68
12.1.	<i>Suivi de fusion</i>	69
12.2.	<i>Clonage</i>	70
12.2.1.	Dépôt de la couche nourricière.....	70
12.2.2.	Dépôt de la couche de clonage.....	71
12.2.3.	Repiquage des clones	71
13.	SÉLECTION DES ANTICORPS PRODUITS	72
13.1.	<i>Méthode ELISA</i>	72
13.2.	<i>Détermination de l'isotype des anticorps produits</i>	72
13.3.	<i>Détection des réactions croisées</i>	73
14.	PRODUCTION EN MASSE DES ANTICORPS	75
15.	PROTOCOLE DE PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX.....	76

16. WESTERN BLOT.....	78
17. PROTOCOLE D'IMMUNOFLUORESCENCE.....	80

ETUDE EXPERIMENTALE 82

1. VÉRIFICATION DE LA PURETÉ DE LA SOUCHE.....	82
2. SUIVI DE LA CROISSANCE BACTÉRIENNE - ESSAIS PRÉLIMINAIRES - CHOIX DU MILIEU DE CULTURE.....	83
2.1. Première sélection.....	84
2.2. Deuxième sélection.....	86
3. VÉRIFICATION DE LA PURETÉ DES MEMBRANES EXTERNES OBTENUES.....	90
3.1. Protocole expérimental.....	90
3.2. Résultats et discussion.....	90
4. ETUDE DE LA COMPOSITION EN PROTÉINES DE LA MEMBRANE EXTERNE D'ALCALIGENES EUTROPHUS CH34 PAR ÉLECTROPHORÈSE SDS-PAGE.....	92
4.1. Coloration au bleu de Coomassie.....	92
4.2. Coloration à l'argent.....	94
5. OBTENTION ET PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-ALCALIGENES EUTROPHUS CH34.....	99
5.1. Premier essai de production d'anticorps monoclonaux par immunisation <i>in vivo</i>	100
5.1.1. Protocole d'immunisation.....	100
5.1.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes.....	101
5.2. Deuxième essai de production d'anticorps monoclonaux par immunisation <i>in vivo</i>	102
5.2.1. Protocole d'immunisation.....	102
5.2.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes.....	102
5.3. Troisième essai de production d'anticorps monoclonaux par immunisation <i>in vivo</i>	103

5.3.1. Protocole d'immunisation.....	103
5.3.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes.....	104
5.3.3. Isotypage et spécificité des anticorps obtenus.....	107
5.3.3.1. Isotypage des anticorps obtenus.....	107
5.3.3.2. Spécificité des anticorps obtenus.....	107
5.3.3.3. Vérification de la spécificité de détection d' <i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 par les Acms produits par l'hybridome B5/7.....	111
5.3.4. Résultats de Western Blot.....	113
5.3.5. Utilisation des Acms pour la détection d' <i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 en immunofluorescence.....	115
5.4. Production et purification des anticorps monoclonaux.....	119
6. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE D'IMMUNISATION IN VITRO POUR L'OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX - INDUCTION D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE SECONDAIRE.....	120
6.1. Premier essai <i>in vitro</i>	120
6.1.1. Protocole "d'immunisation".....	121
6.1.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes.....	122
6.2. Deuxième essai <i>in vitro</i>	123
6.2.1. Protocole "d'immunisation".....	123
6.2.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes.....	124
7. APPLICATIONS DES ANTICORPS MONOCLONAUX À LA DÉTECTION D'ALCALIGENES EUTROPHUS CH34.....	128
7.1. Sélection du type de billes.....	129
7.2. Essais de détection d' <i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34.....	130
7.3. Détermination du seuil de détection de ce procédé.....	132

7.4. Spécificité de la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 par ce procédé..... 134

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 136

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 141

ABBREVIATIONS

Ac	: Anticorps
Acm(s)	: Anticorps monoclonal(aux)
AIF	: Adjuvant incomplet de Freund
ATCC	: American type culture collection
BCIP	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
ConA	: Concanavaline A
D.O.	: Densité optique
DCPIP	: 2,6-dichlorophénolindophénol
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
Fab	: Fragment antibody-binding
Fc	: Fragment cristallisable
FME	: Facteur de membrane externe
<hr/>	
HAT	: Hypoxanthine – Aminoptérine - Thymidine
HPLC	: High Pressure Liquid Chromatography
Ig	: Immunoglobuline
IgG	: Immunoglobuline d'isotype G
IL-6	: Interleukine 6
Kbp	: Kilo paire de bases
(k)Da	: (kilo)dalton
KDO	: 3-céto-2-déoxyoctonate
LPS	: Lipopolysaccharide
MC	: Membrane cytoplasmique

ME	: Membrane externe
Milieu TG	: Milieu Tris-Gluconate
NBT	: Nitro blue tétrazolium
Omp	: Outer membrane protein (Protéine de membrane externe)
OMR	: Outer membrane receptor (Récepteur de membrane externe)
P24	: Plaque de culture 24 puits
P6	: Plaque de culture 6 puits
P96	: Plaque de culture 96 puits
PBS	: Phosphate buffer saline
PEG	: Polyéthylèneglycol
PFM	: Protéine de fusion membranaire
PMS	: Phénazine méthosulfate
PVDF	: Polyvinylidenedifluoride
RPMI	: Rosewell park memorial institute
SDH	: Succinate déshydrogénase
SDS	: Sodium dodécyl sulfate
TBS	: Tris buffer saline
TTBS	: Tween 20 – Tris buffer saline
UFC	: Unité formant colonie

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Divers problèmes environnementaux liés à la pollution par les métaux lourds ont été mis en évidence dans différentes régions et notamment en Lorraine. Ces éléments rejetés dans l'environnement proviennent principalement des industries métallurgiques, et provoquent des phénomènes d'accumulation et de toxicité chez les organismes vivants. Les premiers bioindicateurs de ce type de pollution peuvent être les bactéries métallorésistantes lesquelles pourront aussi servir à la décontamination de sols pollués. Ces bactéries devront dans un premier lieu être détectées d'une façon spécifique et rapide. L'utilisation d'anticorps monoclonaux, qui sont spécifiques d'un antigène fait de ces derniers un outil de choix pour la détection.

Le but de ce travail est l'obtention et la production d'anticorps monoclonaux pour la détection directe d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. Cette bactérie à Gram(-) possède deux mégaplasmides, pMOL28 et pMOL30, de résistances aux métaux lourds. pMOL28 code pour les résistances au Ni, Hg, Co, thallium et à l'anion chromate, pMOL30 code pour les résistances au Cd, Zn, Co, Cu, Thallium, et Pb. Il sera nécessaire de potentialiser sur la membrane externe des protéines liées au mécanisme de transport du fer. Cette enveloppe bactérienne sera fractionnée et purifiée, et la surexpression de protéines sera vérifiée en électrophorèse SDS-PAGE. Cette membrane externe servira ensuite à immuniser des souris dans l'optique d'obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. Ces derniers seront utilisés dans la mise au point d'un test rapide de détection.

Parallèlement, une technique plus rapide d'obtention d'anticorps monoclonaux sera développée en recréant *in vitro* les phénomènes liés à la réponse immunitaire chez la souris.

L'analyse bibliographique (Chapitre 2) présente *Alcaligenes eutrophus* CH34 aux niveaux phénotypique et génotypique; le mécanisme de transport du fer chez cette bactérie; l'intérêt de l'utilisation de la membrane externe pour produire des anticorps monoclonaux; enfin les anticorps monoclonaux comme outils dans le cadre de ce travail.

Les résultats obtenus et leur discussion (Chapitre 4) s'articulent, au terme d'une présentation du matériel et méthodes (Chapitre 3), selon quatre axes :

- la séparation de la membrane externe d'*Alcaligenes eutrophus* CH34
- l'obtention et la production d'anticorps monoclonaux produits *in vivo* chez la souris par la méthode proposée par Köhler et Milstein (1975)
- l'obtention d'anticorps monoclonaux par une méthode d'immunisation *in vitro*
- quelques applications données aux anticorps monoclonaux

Les conclusions (Chapitre 5) tentent de montrer l'intérêt des anticorps monoclonaux obtenus pour la compréhension des interactions entre les mécanismes de transport du fer et de résistance aux métaux lourds.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

La bactérie choisie, *Alcaligenes eutrophus* CH34, est intéressante du point de vue de la dépollution des sols car elle possède deux mégaplasmides de résistances aux métaux lourds. La production d'anticorps monoclonaux est un moyen rapide et spécifique de détection de bactéries. Pour cela, sur la membrane externe, la surexpression de protéines impliquées dans le mécanismes de transport du fer est induite. Cette méthode est assez répandue car les protéines sont les principaux immunogènes de la membrane externe, ce qui permet d'obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques.

1. *Alcaligenes eutrophus* CH34

1.1. Description générale

Alcaligenes eutrophus CH34 (ATCC 43123) est une bactérie du sol, isolée en Belgique dans un bassin de décantation d'une usine de zinc (Mergeay *et al.*, 1978)¹. Cette souche bactérienne découverte a pu être classée ainsi grâce à la présence d'enzymes clefs de la lithotrophie, à savoir deux hydrogénases :

- ➔ une soluble, cytoplasmique, réduisant le NADH en NAD et H₂. Ses propriétés étaient identiques à celles trouvées pour cette enzyme chez *Alcaligenes eutrophus* H16 – hydrogène : NAD⁺ oxydoréductase, EC1.12.1.2. (Schneider et Schlegel, 1976)².
- ➔ une liée à la membrane externe, impliquée dans la production d'énergie durant la croissance autotrophique et donc liée à la chaîne respiratoire. Comme l'enzyme précédente, ses propriétés étaient identiques à celles de l'enzyme trouvées chez *Alcaligenes eutrophus* H16. (Schink et Schlegel, 1979)³.

Cependant, des caractéristiques particulières font de cette souche un nouveau membre du groupe *Alcaligenes eutrophus* :

- ➔ un profil électrophorétique des protéines plus proche de celui d'*Alcaligenes eutrophus* JMP134 que de celui d'*Alcaligenes eutrophus* H16 (Sadouk, 1989)⁴
- ➔ une incapacité à utiliser le fructose comme source de carbone (Mergeay *et al.*, 1985)⁵
- ➔ l'absence d'un mégaplasmide conjugatif similaire à pHG1 qui porte les gènes des hydrogénases d'*Alcaligenes eutrophus* H16 (Mergeay *et al.*, 1985)⁵

Récemment, l'étude de marqueurs chromosomiques a permis de reclasser *Alcaligenes eutrophus* en tant que *Ralstonia eutropha* (Yabuuchi *et al.*, 1995)⁶. Mais *Alcaligenes eutrophus* CH34 n'a pas encore été reclassée (Peitzsch *et al.*, 1998)⁷.

Ses caractéristiques phénotypiques et génotypiques principales sont les suivantes :

- ➔ il s'agit d'un bâtonnet unicellulaire droit à Gram négatif de 0,5 μm de diamètre et 0,9 μm de long
- ➔ la bactérie est mobile avec 1 à 4 flagelles péritriches
- ➔ sur gélose nutritive, elle forme des colonies circulaires opaques, de couleur crème-rosée
- ➔ elle possède un métabolisme chimiolithotrophe facultatif (Mergeay *et al.*, 1985)⁵ : la bactérie peut se développer uniquement en ayant H_2 et CO_2 comme sources d'énergie et de carbone, ainsi qu'un métabolisme chimioorganotrophe (Sadouk, 1989)⁴ utilisant une grande variété de composés organiques comme source de

carbone, comme par exemple le gluconate, le succinate, le pyruvate, l'acétate et le benzoate, mais pas le glucose, ni le fructose, ni d'autres carbohydrates (Mergeay *et al.*, 1985)⁵. Elle peut également croître en anaérobiose en présence de nitrate.

→ sa croissance est optimale à 30°C, et on observe une forte mutagenèse est observée à 37°C

→ elle possède deux mégaplasmides qui codent pour des résistances à des métaux lourds (Mergeay *et al.*, 1985⁵; Taghavi *et al.*, 1997⁸) :

- pMOL 28 (180 kilobases) spécifique des résistances au nickel, mercure, cobalt, , thallium (locus *tllA*) et à l'anion chromate.
- pMOL 30 (240 kilobases) spécifique des résistances au zinc, cadmium, mercure, cobalt, cuivre, thallium(locus *tllB*) et plomb.

1.2. Le chromosome bactérien

L'étude de la cartographie du chromosome d'*Alcaligenes eutrophus* (Sadouk et Mergeay, 1993)⁹ a permis de constater sa circularité. Mais peu de loci ont été cartographiés comme l'illustre la Figure 1

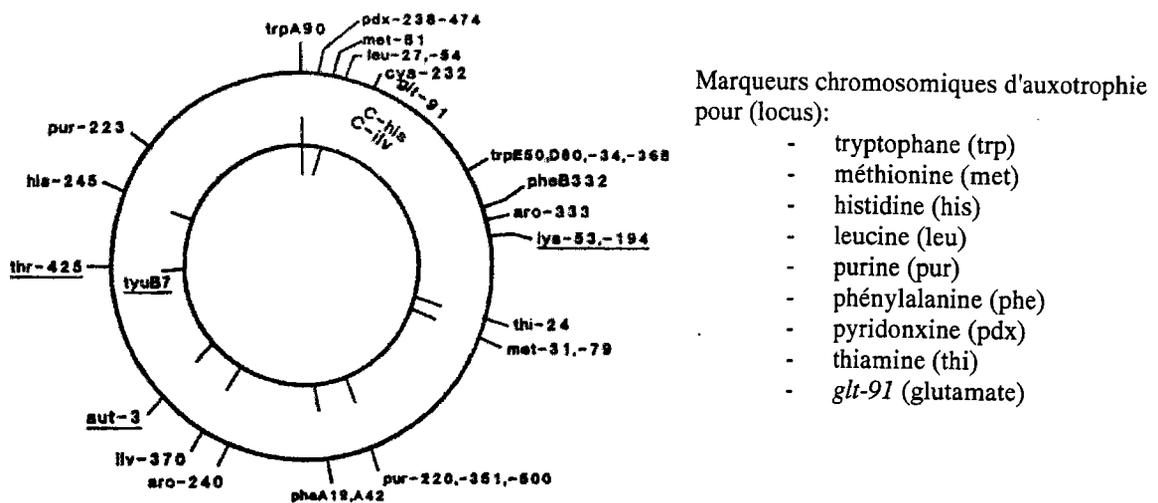


Figure 1 : carte génétique du chromosome d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, d'après Sadouk et Mergeay, 1993⁹.

De plus, comme chez la plupart des bactéries, le chromosome code aussi pour des transports de nutriments indispensables à la physiologie bactérienne. Chacun de ces transports nécessite au moins deux systèmes complémentaires : un système de transport constitutivement exprimé de faible affinité et de grande capacité de transport, et un autre de forte affinité, de faible capacité de transport, très fortement régulé en réponse à une carence en un anion ou cation (Silver et Walderhaug, 1992)¹⁰. Les principaux cations ou anions transportés sont le phosphate, le potassium (cation essentiel), le magnésium, le fer (cation indispensable à la physiologie bactérienne, dont le transport sera étudié ultérieurement dans ce mémoire), le manganèse et le sulfate.

Ces systèmes peu spécifiques de transport peuvent aussi participer à la fixation de métaux lourds. Chez *Alcaligenes eutrophus* 104, souche dérivée d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 mais privée de pMOL28 et pMOL30, le zinc, le cadmium, le cobalt, le nickel et le manganèse sont transportés via le système énergie-dépendant de transport du magnésium et le chromate est pris en charge par le système de fixation du sulfate (Nies et Silver, 1989a)¹¹. La fixation de Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Ni^{2+} est inhibée par 1 mM de Mg^{2+} , par contre quand la concentration de Mg^{2+} est réduite à 100 μM , la fixation de ces métaux est multipliée par sept, voire même par 20 si la quantité de Mg^{2+} est réduite à 10 μM . En ce qui concerne l'anion chromate, sa fixation est compétitivement inhibée par le sulfate et vice-versa.

1.3. Résistances aux métaux lourds

1.3.1. Le plasmide pMOL30

Le plasmide pMOL30 (240 kilo-paire de bases [kbp]) est un des deux plasmides contenus chez *Alcaligenes eutrophus* CH34. Il confère les résistances au cadmium, zinc, cobalt, cuivre (locus *cop*), plomb (locus *pbr*), thallium (locus *tllB*) et au mercure. Les CMI, plus faibles concentrations en sel de métal pour lesquelles aucune UFC n'est observée, sont de

20, 12 et 2,5 mM pour le Co, le Zn et le Cd respectivement (Mergeay *et al.*, 1985)⁵. Les premières études menées sur ce plasmide ont montré que les résistances au Cd, Zn et Co se trouvaient sur un fragment EcoRI de 9,1 kbp (Nies *et al.*, 1987)¹². En effet, quand ce fragment était transféré chez *Alcaligenes eutrophus* 104, il conférait à cette souche le même degré de résistance que si pMOL30 y avait été transféré. Ce fragment est nommé opéron *czc*. Les résistances sont basées sur un flux sortant de cations par l'intermédiaire d'un antiporteur chimiosmotique cations/H⁺ (Nies, 1992)¹³. Ces systèmes sont inductibles (Nies et Silver, 1989b)¹⁴ car lorsque les cellules sont préincubées en présence de concentrations non toxiques de cations de métaux lourds – par exemple 100 μM Zn²⁺ ou 50 μM Cd²⁺ – comme inducteurs, l'activité de flux sortant de cations est augmentée et la phase de latence en présence de fortes concentrations en métaux lourds est réduite (Nies, 1992)¹³.

L'organisation des gènes au niveau de l'opéron *czc* a pu être élucidée (Figure 2). Il code pour huit protéines : trois qui interviennent directement dans le mécanisme d'efflux [CzcA, CzcB et CzcC], cinq qui permettent la régulation du transport [CzcR, CzcS, CzcD, CzcI et CzcN] (Nies, 1992¹³ ; Diels *et al.*, 1995¹⁵ ; van der Lelie *et al.*, 1997¹⁶).



Figure 2 : Organisation des gènes de l'opéron *czc*, d'après van der Lelie *et al.*, 1997¹⁶.

➔ Le mécanisme de flux sortant de cations : CzcA est la protéine centrale de ce mécanisme. En effet, en son absence, aucune résistance n'est exprimée (Nies *et al.*, 1989)¹⁷. Elle agit comme un antiporteur chimiosmotique cation / H⁺ et son profil d'hydropathie permet de prédire qu'il s'agit d'un polypeptide possédant 12 segments transmembranaires (Diels *et al.*, 1995)¹⁵. Elle appartient, en accord avec la définition, à la famille des protéines RND

(Resistance / Nodulation / Division) (Saier *et al.*, 1994)¹⁸. Mais CzcA seule ne permet qu'un faible niveau de résistance aux cations. Par contre, dès qu'elle est associée à CzcB, il y a apparition de l'efflux de Zn^{2+} quasiment aussi efficace que lorsque le système est complet (Nies *et al.*, 1989)¹⁷. CzcB possède des motifs riches en histidine qui sont considérés comme les sites de fixation du zinc (Rensing *et al.*, 1997)¹⁹. Ces motifs ne sont pas essentiels pour la détoxification de ce cation, cependant ils sont requis pour l'expression complète de l'efflux. L'analyse de la séquence de CzcB montre qu'il pourrait s'agir d'une protéine de membrane cytoplasmique qui appartiendrait à la famille des protéines de fusion de membrane [PFM] (Dong et Mergeay, 1994)²⁰. Une localisation périplasmique de cette protéine est probable (Rensing *et al.*, 1997)¹⁹. Ce n'est que lorsque CzcC est ajoutée aux deux premières protéines que le système acquiert toute sa spécificité (Nies *et al.*, 1989)¹⁷. CzcC possède des homologies de séquence et des similitudes de topologie avec les protéines de la famille des facteurs de membrane externe [FME] (Dong et Mergeay, 1994)²⁰. Mais comme pour CzcB, sa localisation est périplasmique (Rensing *et al.*, 1997)¹⁹. Toutefois CzcA et CzcC ne catalysent pas l'efflux de Co^{2+} et Cd^{2+} quand CzcB est absente. Ainsi CzcC semble modifier la spécificité du système en agissant peut-être sur CzcB (Nies *et al.*, 1989)¹⁷. Le dernier modèle proposé pour ce système de flux sortant est illustré par la Figure 3, la protéine hypothétique de membrane externe appelée 'OmpY' permettrait le passage des cations de la membrane externe vers l'espace extracellulaire.

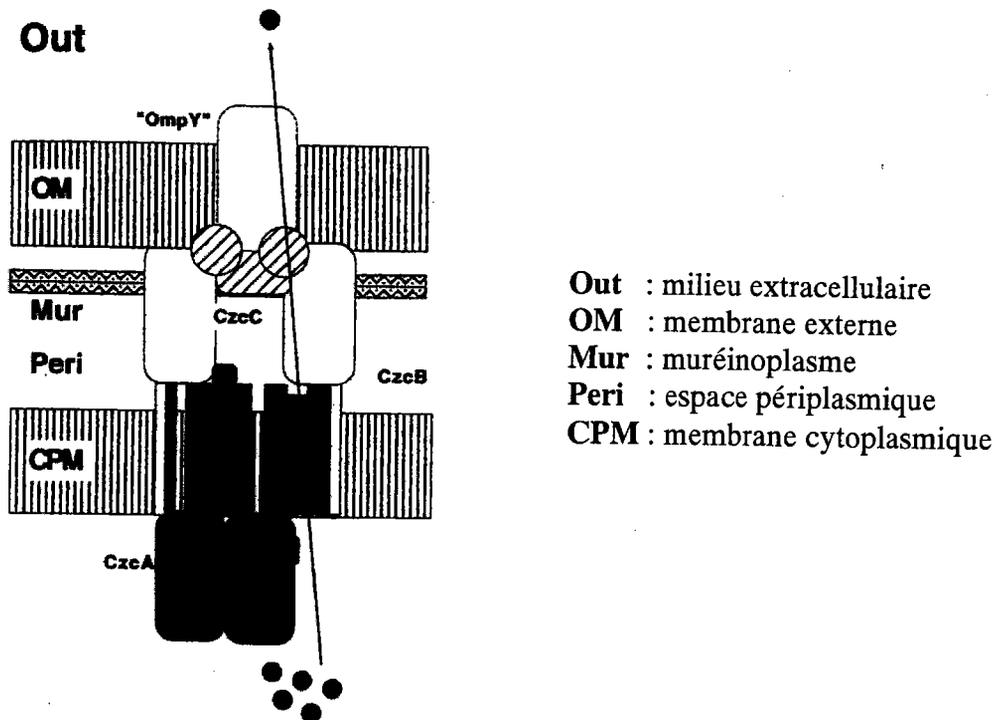


Figure 3 : Modèle du mécanisme de flux sortant de Cd, Zn et Co codé par l'opéron *czc*, d'après Rensing *et al.*, 1997¹⁹.

Si le mécanisme de flux sortant de cations est la réponse principale face à de fortes concentrations en métaux lourds, dans le cas du zinc, *Alcaligenes eutrophus* CH34 synthétise une métalloprotéine de 20 kDa (Remacle et Vercheval, 1991)²¹. Il n'existe aucune preuve de l'implication de cette protéine dans la résistance au zinc.

↪ La régulation du mécanisme de flux sortant de cations : pour obtenir une bonne régulation de l'expression de *czc*, au moins deux systèmes de régulation semblent exister, basés sur le même principe, à savoir une protéine de membrane qui joue le rôle de "senseur" interagissant avec une seconde protéine plus hydrophile (van der Lelie *et al.*, 1997)¹⁶.

Le premier système est composé de la protéine CzcD qui est une protéine liée à la membrane externe et dont la présence est requise pour l'induction de *czc*, quand le système CzcABC est

complet, la délétion du gène *czcD* induit la perte de l'induction du système par le zinc (Nies, 1992)¹³. CzcN est une protéine liée à la membrane externe, donc seul CzcI peut jouer le rôle de deuxième protéine du système, mais ses fonctions et sa localisation restent inconnues (van der Lelie, 1997)¹⁶. Ce mécanisme est activé par des concentrations de Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} inférieures à 50 μM et va induire l'expression de l'opéron *czc*.

Le deuxième système de régulation est composé de CzcR et CzcS. CzcS a été identifiée comme étant une histidine kinase qui joue le rôle de "senseur", CzcR étant l'activateur synthétisé en réponse (van der Lelie *et al.*, 1997)¹⁶. CzcR est une protéine qui contient trois sites potentiels de liaison au métal, son activité est modulée par Zn^{2+} et sa présence est essentielle pour l'expression complète des résistances (Nies, 1992)¹³.

Les fonctions et la localisation de CzcN sont inconnues, seul son profil d'hydropathie permet de prédire qu'il s'agit d'une protéine transmembranaire (Diels *et al.*, 1995)¹⁵.

→ quatre étapes d'induction du système de flux sortant codé par *czc* ont été proposées (Van der Lelie *et al.*, 1997)¹⁶. Dans la première étape, seules des traces de zinc, cadmium ou cobalt sont présentes, il y a une faible transcription du système CzcD / CzcI, aucune transcription de *czcABC* et aucune expression de *czcRS*. Dans cette situation, CzcD surveille l'apparition de cations dans le périplasme. Quand des cations apparaissent dans le périplasme (deuxième étape), CzcD va interagir avec CzcI et l'opéron *czcABC* est faiblement exprimé. Quand les concentrations intracellulaires de cations augmentent (troisième étape), l'expression de *czc* est activée sous l'action de CzcR et CzcS. Dans la quatrième étape, les concentrations cytoplasmiques des cations sont à nouveau faibles, mais une transcription de base de *czc* reste stimulée par la présence des cations dans le périplasme via CzcD et CzcI.

→ La résistance au mercure est prise en charge par un transposon nommé Tn4380 (Diels *et al.*, 1985)²².

1.3.2. Le plasmide pMOL28

Le plasmide pMOL28 [180 kbp] (Figure 4) est le second plasmide que contient *Alcaligenes eutrophus* CH34. Il code pour les résistances au nickel, cobalt, zinc, thallium (locus *tllA*), mercure et à l'anion chromate (Mergey *et al.*, 1985)⁵. Les opérons *cnr* (codant pour les résistances aux Ni, Co et Zn) et *chr* (codant pour la résistance à l'anion chromate) sont adjacents, mais séparés et portés par un même fragment de 30 kbp (Peitzsch *et al.*, 1998)⁷. Tout comme dans le cas de *czc*, ces trois résistances sont inductibles (Siddiqui *et al.*, 1988)²³. Les CMI pour ces métaux sont de 3 mM, 5 mM et 0,2 mM pour Ni, Co et l'anion chromate respectivement (Siddiqui *et al.*, 1989²⁴ ; Peitzsch *et al.*, 1998⁷).

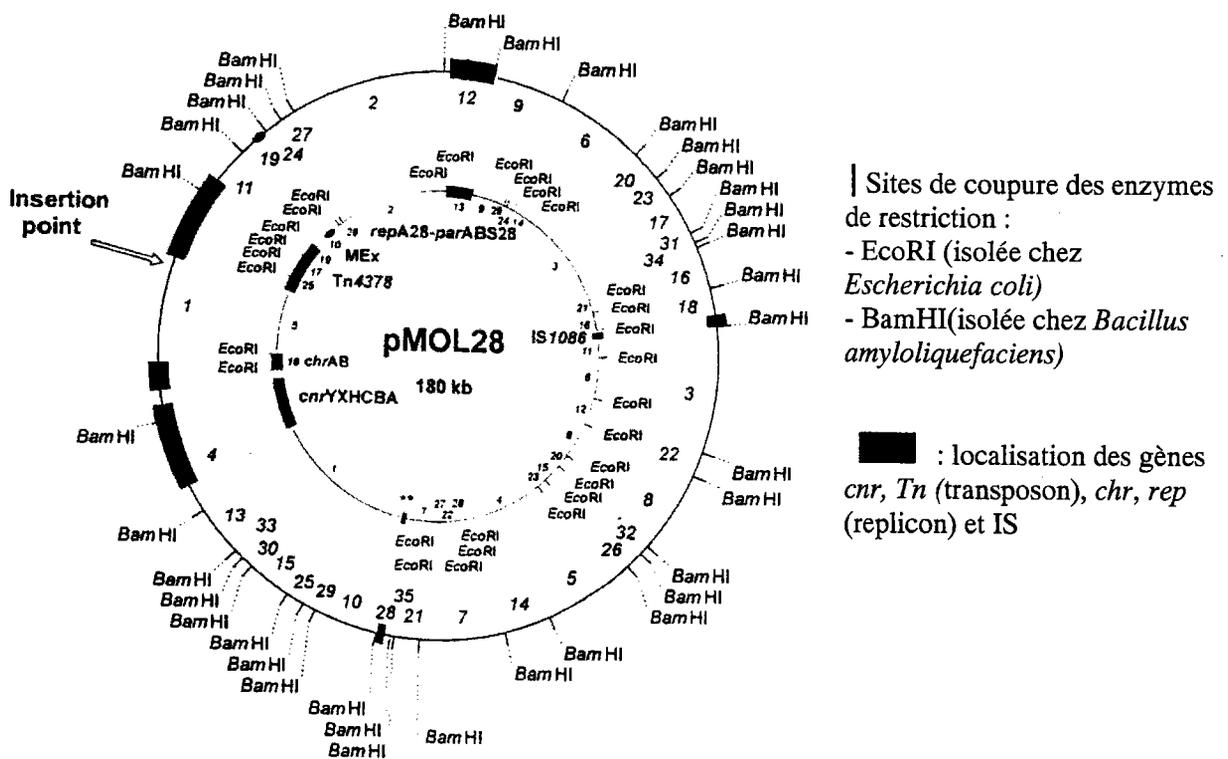


Figure 4 : Carte physique et de restriction du plasmide pMOL28, d'après Taghavi *et al.*, 1997⁸.

→ Résistance à l'anion chromate : cette résistance est codée par l'opéron *chr* et est portée par un fragment *Eco*-RI de 2,6 kbp (Nies *et al.*, 1990)²⁵. Cet opéron code pour 3 protéines : ChrA (31,5 kDa) qui fonctionne en tant que pompe pour le flux sortant de cet anion, ChrB (21 kDa) qui jouerait un double rôle en tant que protéine de régulation et partie intégrante du système d'efflux, enfin la troisième protéine ne semble pas intervenir dans ce système (Nies *et al.*, 1990)²⁵. Cette résistance se traduit par la réduction de l'accumulation de chromate. Récemment, une inter-relation entre ce flux sortant et la concentration en sulfate du milieu a été montrée (Peitzsch *et al.*, 1998)⁷. En effet, dans des conditions de carence en sulfate, le chromate est transporté rapidement dans la cellule où il est réduit sous une forme moins toxique. Par contre lorsque la concentration en sulfate est suffisante, le chromate n'est pas réduit car le système de réduction du sulfate est réprimé, ainsi il s'accumule à des concentrations toxiques. Dans ce cas, le système de flux sortant de chromate est induit pour baisser la concentration intracellulaire de cet ion. ChrA serait donc une "soupape de sécurité" pour le chromate, ce qui explique la grande spécificité de l'induction.

→ La résistance au mercure est prise en charge par un transposon nommé Tn4378 (Diels *et al.*, 1985)²².

→ L'opéron *cnr* : les résistances au Ni et au Co sont portées par deux fragments de pMOL28, un fragment nommé EK1 de 8,5 kbp et un fragment *Hind*III de 13,5 kbp appelé HK1, EK1 étant contenu dans HK1 (Siddiqui *et al.*, 1989)²⁴. Ces résistances sont inductibles, puisque, dans le cas du Ni, lorsque les bactéries sont précultivées dans des concentrations non toxiques du métal (0,03 à 0,5 mM), il y a expression complète de la résistance et disparition de la phase de latence lors de la remise en culture dans 3 mM de Ni (Siddiqui et Schlegel,

1987)²⁶. Ces résistances se font par un système de flux sortant de cations énergie-dépendant (Sensfuss et Schlegel, 1988)²⁷.

L'étude du fragment EK1 a permis de mettre en évidence que l'opéron *cnr* codait pour 7 protéines CnrA (115,5 kDa), CnrB (40 kDa), CnrC (44 kDa), CnrH (11,6 kDa), CnrY, CnrR et CnrX (Liesegang *et al.*, 1993)²⁸. Il y a une forte homologie entre les opérons *czc* et *cnr* (Figure 5) : CnrC et CzcC sont identiques à 30% au niveau des acides aminés et sont toutes deux des protéines hydrophiles, CnrB et CzcB partagent 28,5% d'homologie et CnrB est essentielle pour la résistance au nickel, CnrA et CzcA partagent 48,5% d'homologie, CnrH a un effet activant sur la résistance au nickel (Liesegang *et al.*, 1993)²⁸. Ainsi, tout comme CzcA, CnrA serait la protéine de membrane cytoplasmique du système. Avec cette homologie de séquence entre les protéines produites par *cnr* et celles de *czc*, Dong et Mergeay (1994)²⁰ ont prédit une similitude dans la topologie des deux systèmes de flux sortant. CnrH serait un activateur de ce système d'efflux. Quant à CnrX, cette protéine est riche en résidus histidine qui sont capables de se lier au Ni (Schmidt et Schlegel, 1994)²⁹. CnrY interviendrait également dans la régulation de ce mécanisme pour maintenir une concentration bénéfique de métal dans la cellule (Schmidt et Schlegel, 1994)²⁹. Ceci répond au cas particulier du Ni qui intervient dans la formation de l'hydrogénase cytoplasmique d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. En effet, une concentration de 1 à 3 μ M de NiCl₂ est nécessaire pour obtenir un taux optimum de formation de l'hydrogénase cytoplasmique, au-dessus de ces concentrations, il y a inhibition de cette formation (Siddiqui *et al.*, 1988)²³.

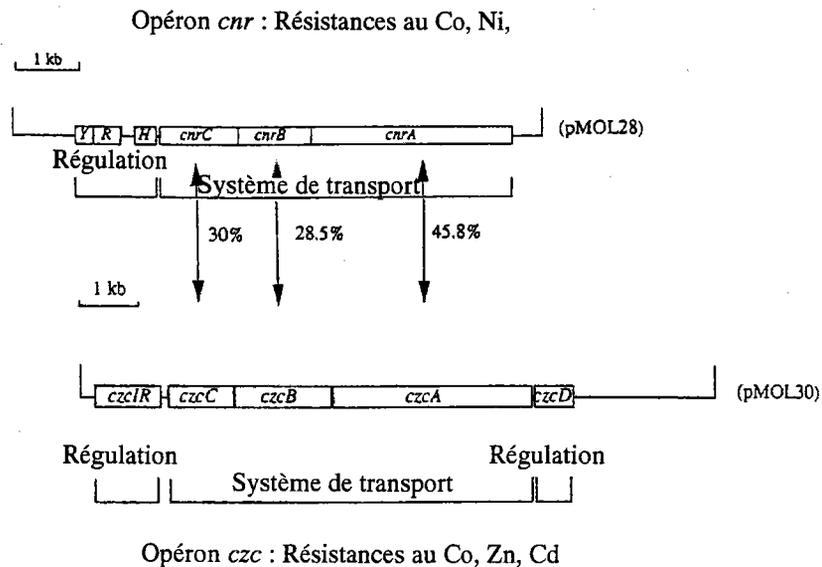


Figure 5 : Organisation des opérons *czc* et *cnr*, homologies entre ces deux systèmes (d'après Collard *et al.*, 1994³⁰)

Une relation entre la résistance au Zn et la régulation de *cnr* a été montrée chez *Alcaligenes eutrophus* CH34 (Collard *et al.*, 1993)³¹. En effet, lorsque la résistance au Ni est induite, d'une faible résistance au Zn apparait. Ce phénomène ne s'applique pas à l'anion chromate.

Le deuxième système de flux sortant de cobalt, appelé CobA, qui est codé par *cnr* est différent de celui codé par *czc*, mais ils concourent tous les deux à la résistance à cet ion (Nies *et al.*, 1989)¹⁷.

Alcaligenes eutrophus CH34 présente donc un intérêt au niveau de l'environnement car la présence des deux mégaplasmides peut en faire un bon bioindicateur de pollution par les métaux lourds, mais aussi un intérêt au niveau de l'étude morphologique des antigènes de la membrane externe impliqués dans les résistances aux métaux lourds, dans le transport de cations essentiels comme le fer et de la réponse immunitaire induite par cette bactérie.

Cependant, les techniques d'identification de cette souche bactérienne sont lentes et fastidieuses. Il s'agit de la culture dans des milieux sélectifs et de l'utilisation de tests biochimiques comme la galerie API 20NE (Bio-Mérieux). Ceci empêche donc un suivi en continu de la présence d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 et, le repiquage sur différents milieux, peut induire la perte de certaines caractéristiques phénotypiques. Ainsi, la mise au point d'un test de détection basé sur des anticorps monoclonaux (Acms) permettra une détection rapide et spécifique de cette souche bactérienne.

2. Mécanisme de transport du fer

2.1. Généralités

Le fer est le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre. Cependant dans des conditions aérobies et à un pH proche de la neutralité, il existe sous la forme de composé minéral insoluble de type oxyhydroxyde de formule générale FeOOH (Guérinot, 1994)³², ce qui réduit sa biodisponibilité. Cependant, le fer est un nutriment essentiel pour le développement bactérien car il intervient dans des processus allant de la respiration à la synthèse des ribonucléotides (Guérinot, 1994)³². Les bactéries ont ainsi mis au point des stratégies pour fixer le fer et se protéger de ses effets toxiques. Pour optimiser la fixation du fer libre, les bactéries excrètent une protéine de faible poids moléculaire (< 1000 Da) chélatant spécifiquement le fer et appelée sidérophore (Silver et Walderhaug, 1992)¹⁰. Leur constante d'affinité pour les ions ferriques varie de 10^{20} à 10^{30} (Neilands, 1994)³³. Du point de vue chimique, la plupart des sidérophores peuvent être classés en tant qu'hydroxamates, produits par exemple par des bactéries de type *Enterobacter* (Crosa, 1989)³⁴, ou que

catécholes, produits par exemple par *Escherichia coli* (Köster, 1991)³⁵, dont les prototypes respectifs sont le ferrichrome et l'entérobactine (Figure 6).

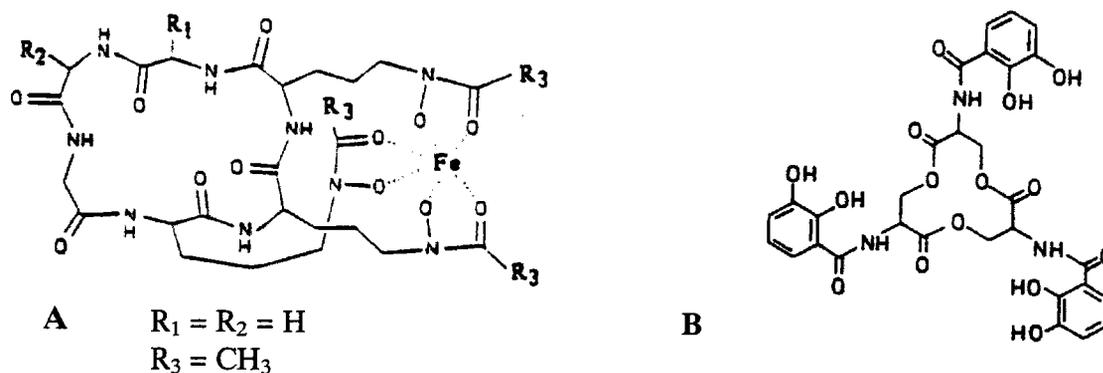


Figure 6 : Structure chimique des molécules de ferrichrome (A) et d'entérobactine (B), d'après Rabsch et Winkelmann (1991)³⁶.

La détection et la caractérisation des sidérophores est réalisée à l'aide de tests colorimétriques. Le test au chrome azurol S (test CAS) permet de détecter tous les types de sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987)³⁷. Pour discriminer la classe de ces protéines, deux essais existent principalement : le test de Csàky permet de détecter spécifiquement les hydroxamates, le test de Arnow permettant de détecter les catécholes (Payne, 1994)³⁸.

2.2. Le sidérophore chez *Alcaligenes eutrophus* CH34

Le transport du fer chez *Alcaligenes eutrophus* CH34 n'a pas encore été très étudié. Le sidérophore, produit par cette bactérie, a été appelé alcaligine E et a été caractérisé comme étant de type phénolate (Gilis *et al.*, 1996)³⁹. Le seul sidérophore connu pour contenir ce type de groupement de fixation du fer est la pyochéline (Figure 7), ou acide 2-(2-(*o*-hydroxyphényle)-2-thiazoline-4-yl)-3-méthyl-4-thiazolidine carboxylique, produit par exemple par *Pseudomonas aeruginosa* (Cox et Graham, 1979)⁴⁰, *Bordetella pertussis* ou

bronchiseptica (Moore *et al.*, 1995)⁴¹. Cependant, les deux protéines semblent présenter quand même des différences laissant penser que alcaligine E serait un nouveau type de sidérophore, mais cela n'a pas encore été confirmé. En effet, la pyochéline est incapable d'induire la fixation du fer chez *Alcaligenes eutrophus* CH34 (Gilis *et al.*, 1996)³⁹.

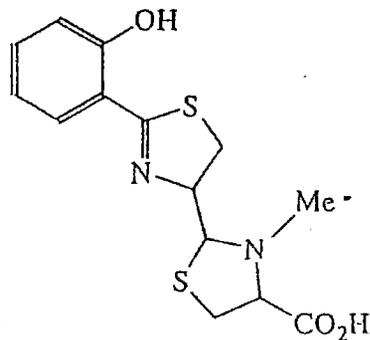


Figure 7 : structure chimique du sidérophore pyochéline produit par *Pseudomonas aeruginosa* (d'après Namiranian *et al.*, 1997)⁴².

La stoechiométrie de fixation du fer pour la pyochéline est de 2 sidérophores pour un Fe(III). Il s'agit d'un composé d'un poids moléculaire de 324 Da avec un faible coefficient de fixation du fer de l'ordre de 5.10^5 (Crosa, 1989)³⁴. Cette faible affinité s'explique par le fait que *Pseudomonas aeruginosa* produit un autre sidérophore, la pyoverdine. En cas de carence en fer, la bactérie produirait en faible quantité les deux types de sidérophores. En final seul le sidérophore le plus adapté serait synthétisé (Gensberg *et al.*, 1992)⁴³.

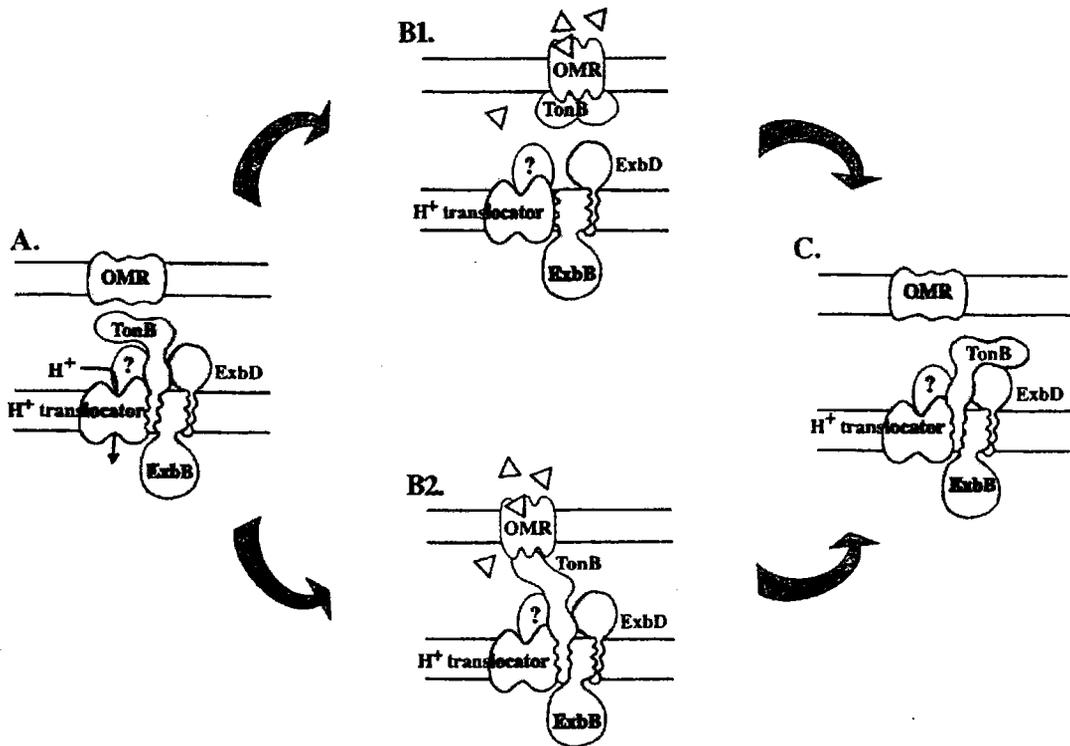
2.3. Le mécanisme de transport du fer

Même si le mécanisme de transport du fer via la pyochéline chez *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas complètement éclairci, l'ensemble des études menées permet de proposer le mécanisme suivant : après la création du complexe fer-sidérophore, ce dernier vient se fixer sur une protéine de la membrane externe (OMP) de 75 kDa, nommé FpvA (Poole *et al.*, 1993)⁴⁴, qui est le récepteur spécifique de la pyochéline (Ankenbauer, 1992)⁴⁵. Il

semble cependant qu'une deuxième OMP de 14 kDa (Sokol et Woods, 1983)⁴⁶ soit requise pour le transport efficace de la pyochéline (Guérinot, 1994)³².

Chez *Alcaligenes eutrophus* CH34, l'excrétion du sidérophore s'accompagne de l'expression sur la membrane externe (ME) de protéines régulatrices du transport du fer (Gilis *et al.*, 1996)³⁹. Leur poids moléculaire est de 85,3, 77,8 et 74,5 kDa. La protéine de 85,3 kDa, codée par le gène *aleB*, semble être le récepteur spécifique du sidérophore. L'analyse de la séquence de cette protéine montre de fortes similarités avec des récepteurs d'autres souches bactériennes, par exemple IutA, le récepteur de l'aérobactine chez *Escherichia coli*, ou FpvA, le récepteur de la pyochéline. Cette analyse a aussi montré la présence de sites de fixation de TonB, protéine importante pour l'internalisation du complexe fer-sidérophore.

Cette dernière est initiée par un changement de conformation du récepteur, et ce transport actif se fait par un apport énergétique grâce à la protéine TonB (Jaskula *et al.*, 1994)⁴⁷. TonB permet aux bactéries à Gram(-) de conserver le rôle protecteur de la ME sans en subir la contrainte principale, à savoir : l'impossibilité de faire passer à travers la ME des nutriments supérieurs à 600 Da de par son asymétrie (Postle, 1990)⁴⁸. La manière dont TonB interagit dans tous les cas avec le récepteur du complexe fer-sidérophore a été élucidée (Letain et Postle, 1997)⁴⁹. Comme l'illustre la Figure 8, cette protéine permet la transduction d'énergie entre le ME et la membrane cytoplasmique (MC). Elle se charge en énergie dans la MC par interaction avec de nombreuses protéines (étape 1), puis la protéine va se fixer sur la ME soit en se dissociant complètement de la MC (étape B1), soit en restant partiellement associée avec celle-ci (étape B2). TonB est ensuite régénérée au niveau de la MC par interaction avec ExbD et ExbB (étape C) et le cycle recommence. En fait, ce serait le changement de conformation du récepteur du complexe fer-sidérophore qui déclencherait l'ensemble du cycle, TonB interagissant alors directement avec le récepteur de ME (Moeck et Coulton, 1998)⁵⁰.



OMR : récepteur spécifique du complexe fer-sidérophore

? : protéine de l'espace périplasmique intervenant dans le transport

Figure 8 : Modèle du mécanisme de transport de l'énergie par TonB, d'après Letain et Postle (1997)⁴⁹.

Des études récentes (Britigan *et al.*, 1997⁵¹ ; Britigan *et al.*, 1998⁵²) ont montré que la fixation du fer sur la pyochéline catalysait la formation de radicaux hydroxyles (OH[·]) lors d'infections, chez l'homme, par *Pseudomonas aeruginosa*. Ce phénomène induisait des dommages aux cellules humaines.

La passage vers la MC demande la présence d'une protéine de l'espace périplasmique, de plusieurs protéines de la MC et d'une protéine polaire liée à la MC contenant deux régions caractéristiques des protéines de liaison aux nucléotides (Guérinot, 1994)³². Une protéine de 90 kDa environ de l'espace périplasmique, intervenant dans le transport du fer, a été identifiée chez *Pseudomonas aeruginosa* (Ankenbauer, 1992)⁴⁵.

L'ensemble des gènes qui interviennent dans ce transport est régulé négativement par la protéine Fur, elle se fixe étroitement aux opérateurs de l'ADN en présence de fer mais pas en son absence (Prince *et al.*, 1993)⁵³.

Après son entrée dans le cytosol, le relargage du fer peut se faire selon deux voies (Crosa, 1989)³⁴ : le complexe fer-sidérophore est dissocié par action d'une estérase spécifique, ou le fer (III) est réduit en fer(II) qui présente une plus faible affinité pour le sidérophore. Ce dernier mécanisme apparaît comme commun à tous les systèmes de fixation du fer. Le sidérophore, quant à lui, est soit détruit, soit recyclé et excrété dans le milieu extracellulaire.

Si les sidérophores présentent une très forte affinité pour le fer, il n'est cependant pas exclu qu'ils fixent d'autres ions métalliques divalents. C'est le cas de la pyochéline, chez *Pseudomonas aeruginosa*, qui est capable de fixer des ions zinc, et dont la stoechiométrie de réaction est 2 sidérophores pour 2 ions (Namiranian, 1997)⁴². Une étude précédente menée par Visca *et al.* (1992)⁵⁴, chez la même bactérie, a montré que la pyochéline pouvait fixer d'autres métaux de transition comme Cu(II), Co(II), Mo(VI) et Ni(II) avec une affinité appréciable. Cette équipe a aussi montré que la régulation de la synthèse du sidérophore pyochéline était sous la dépendance de ces métaux. En effet, Fe(III) et Co(II) à 10 μ M ou Mo(VI), Ni(II) et Cu(II) à 100 μ M répriment l'expression de pyochéline et réduisent l'expression de OMP de 75, 68 et 14 kDa. Cette même interaction a été montrée pour le sidérophore d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. En effet, l'ajout du sidérophore dans un milieu de culture enrichi en cadmium modifie la biodisponibilité de ce métal pour la bactérie (Gilis *et al.*, 1998)⁵⁵.

Cette analyse suggère que le mécanisme de transport du fer chez les bactéries serait un système suffisamment spécifique pour permettre l'utilisation des protéines de la ME,

impliquées dans ce transport, comme immunogènes pour la production d'Acms dirigés contre *Alcaligenes eutrophus* CH34.

3. La membrane externe

Lors de la réponse immunitaire contre une bactérie à Gram(-), les premiers antigènes (Ag) rencontrés par les anticorps (Ac) se trouvent sur la ME. Ainsi cette enveloppe prend toute son importance dans le processus de production d'Acms.

3.1. La membrane externe des bactéries à Gram(-)

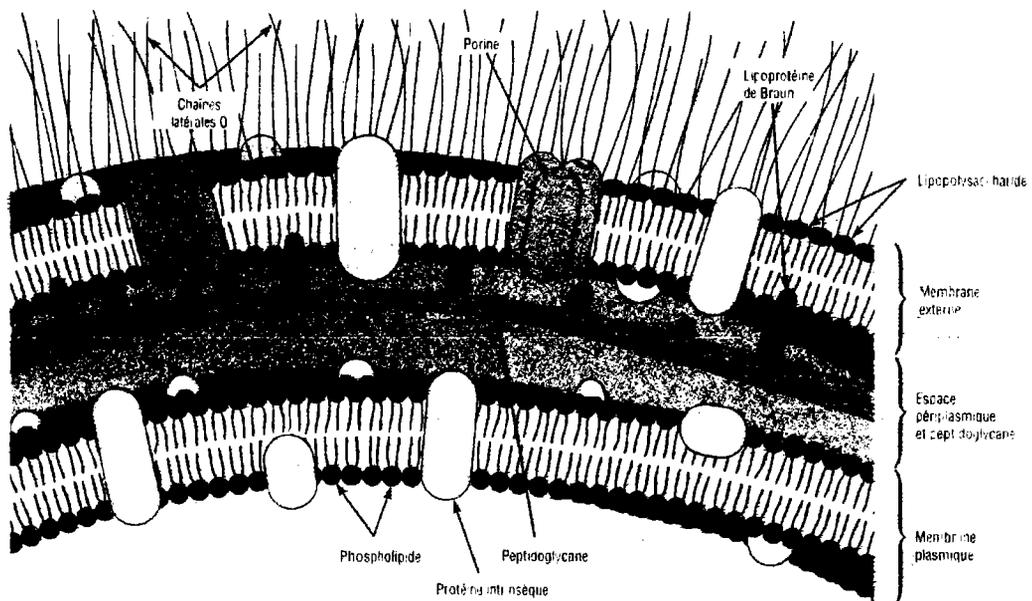


Figure 9 : Représentations des enveloppes des bactéries à Gram (-), d'après Prescott *et al.* (1995)⁵⁶.

Comme le montre la Figure 9, la ME possède une structure membranaire dissymétrique. Elle est composée de 45 à 50% de protéines, de 30 % de lipopolysaccharides (LPS) et de 20 à 25 % de phospholipides (Beveridge, 1981)⁵⁷.

Les protéines sont les immunogènes les plus puissants. Il en existe une grande variété au niveau de la ME. Un petit nombre de ces protéines sont présentes en grande proportion et sont désignées comme protéines "majeures" (Salton, 1987)⁵⁸. Chez *Escherichia coli*, par exemple, elles sont au nombre de quatre (Hindennach et Henning, 1975)⁵⁹. Mais de nombreuses protéines sont aussi présentes au sein de la ME en faible proportion. Leurs rôles sont très variés :

- participer à la résistance aux métaux lourds, comme l'OmpY pourrait le faire chez *Alcaligenes eutrophus* CH34 (Rensing *et al.*, 1997)¹⁹.
- assurer la formation de "pores" pour permettre le passage de solutés hydrophiles ayant un poids moléculaire inférieur à 600 Da (Prescott *et al.*, 1995)⁵⁶,
- permettre la synthèse du flagelle ou l'ancrage de ce dernier dans la ME,
- permettre la sécrétion de protéines vers le milieu extracellulaire (Parsot et Wandersman, 1996)⁶⁰,
- faciliter l'adsorption de métaux comme le font les métallothionéines, par exemple la protéine HMT (Human Metallothionéine)1A, chez les mammifères pour la fixation du cadmium (Sousa *et al.*, 1998)⁶¹,
- permettre la tolérance à des substances comme des solvants, par exemple TolC chez *Escherichia coli* (Aona *et al.*, 1998)⁶²,

De plus, les conditions de culture influencent la composition en protéines de la ME (Domingues *et al.*, 1998⁶³ ; Hostacka et Karelava, 1998⁶⁴). En effet, selon ces conditions, les bactéries vont surexprimer ou réprimer des protéines sur leur ME en réponse à ces stress.

Les LPS sont de puissants antigènes disposés sur la face externe de la ME. Il s'agit de la fraction polysodique du LPS qui porte les spécificités antigéniques O des bactéries. C'est

en effet la nature et le mode de liaison des sucres qui déterminent la spécificité antigénique (Figure 10). Les antigènes O, dépourvus en eux-mêmes de toxicité, permettent le sérotypage des bactéries. (Sendra *et al.*, 1998)⁶⁵. De plus, le lipide A est la fraction la plus active des LPS, responsable de ses effets biologiques et de sa toxicité. Il constitue donc un bon site antigénique.

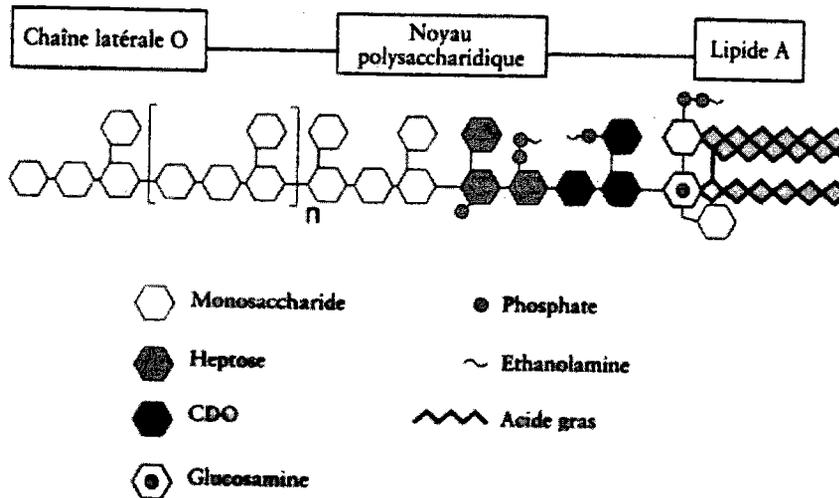


Figure 10 : Représentation schématique de la molécule de lipopolysaccharide (d'après Centoxin, monographie médicale, 1995)⁶⁶.

De nombreuses études ont été menées pour montrer l'implication des protéines de la ME dans le transport du fer. Chez *Escherichia coli* K-12, des protéines de ME interviennent dans ce phénomène (Neilands, 1982)⁶⁷. La même démonstration a été faite chez *Pseudomonas aeruginosa* (Sokol et Woods, 1983⁴⁶ ; Gensberg *et al.*, 1992⁴³), ainsi que chez *Alcaligenes eutrophus* CH34 (Gilis *et al.*, 1996)³⁹ et chez *Salmonella enterica* (Baumler *et al.*, 1998)⁶⁸.

Des Acms ont été utilisés pour étudier le transport du fer au niveau de la ME chez *Vibrio cholerae* (Sciortino *et al.*, 1985)⁶⁹, et chez *Yersinia enterocolitica* (Kooi et Sokol, 1995)⁷⁰.

D'autres travaux ont mené à la production d'Ac polyclonaux ou monoclonaux, principalement dirigés contre des protéines purifiées de la ME. Ces derniers étaient utilisés pour localiser des protéines lors des étapes de caractérisation de celles-ci (Shang *et al.*, 1997⁷¹ ; Mahasreshi *et al.*, 1997⁷²), soit en tant que marqueur de conditions de culture comme la carence en phosphate (Leopold *et al.*, 1997)⁷³.

Ainsi en raison de sa localisation, de sa composition et de son rôle, la ME semble l'immunogène de choix pour l'obtention d'Acms contre des bactéries. Mais le grand nombre d'Ag potentiels dont elle est composée fait que le nombre d'Acs obtenus peut être très important. De plus, la plupart de ces Ag sont communs à de nombreuses souches bactériennes. Les conditions de culture, amenant à la surexpression de certaines protéines spécifiques à chaque souche bactérienne, sont donc importantes à définir.

Afin de pouvoir utiliser la ME comme Ag pour la production d'Acms contre *Alcaligenes eutrophus* CH34, il est nécessaire de séparer cette enveloppe sans contaminations par d'autres fractions de la bactérie et en conservant la structure des protéines.

3.2. Méthodes de séparation de la membrane externe

Les méthodes d'isolement des enveloppes bactériennes sont compliquées par la structure même de la ME et par les fortes variations de structures entre les espèces. En effet, le peptidoglycane est fortement lié à la ME par l'intermédiaire de protéines et il est très difficile de les séparer, ce qui amène des contaminations de la ME. De plus, il faut une méthode très fiable pour pouvoir isoler la ME de la MC.

Les premiers essais utilisaient la lyse cellulaire en utilisant le lysozyme (Repaske, 1958)⁷⁴ ou l'EDTA et le lysozyme (Osborn et Munson, 1974)⁷⁵. Ces méthodes sont peu

respectueuses des structures bactériennes car la ME doit être endommagée pour permettre le passage du lysozyme.

Différentes équipes ont travaillé pour obtenir des ME purifiées et il y a quasiment autant de techniques que de travaux. Ceci montre l'extrême difficulté à obtenir des ME pures et qu'aucune technique, développée jusqu'à présent, ne semble être la panacée. Nous pouvons citer quelques techniques utilisées :

- Miura et Mizushima (1968)⁷⁶, chez *Escherichia coli* K-12, utilisent une lyse osmotique suivie d'une centrifugation en gradient de sucrose
- Forsberg *et al.* (1970)⁷⁷, chez *Alteromonas haloplanktis*, utilisent des solutions de sucrose 0,5M et de NaCl 0,5M, des centrifugations et l'action d'enzymes comme le lysozyme, les Dnases et Rnases
- Yamato *et al.* (1975)⁷⁸, chez *Escherichia coli*, utilisent du lysozyme, de l'EDTA, du SDS, une presse de French, des sonications et des centrifugations
- Mizuno et Kageyama (1978)⁷⁹, chez *Pseudomonas aeruginosa*, utilisent du Na-EDTA, du sucrose 2M, du lysozyme et des centrifugations.
- Anwar *et al.* (1983)⁸⁰, chez *Pseudomonas cepacia*, utilisent du sucrose 20%, du lysozyme, une presse de French et des centrifugations
- Falla *et al.* (1990)⁸¹, chez *Pseudomonas fluorescens*, utilisent du sucrose 0,5M et des centrifugations
- Shang *et al.* (1998)⁸², chez *Borrelia hermsii*, utilisent des vortexages à bas pH dans un tampon hypotonique de citrate et des centrifugations en gradient de sucrose.

Afin de vérifier la pureté des fractions obtenues, la plupart de ces équipes ont dosé des marqueurs spécifiques des enveloppes, à savoir le KDO (3-céto-2-déoxyoctonate), faisant partie de la molécule de LPS de la ME et la succinate déshydrogénase (SDH) pour la membrane cytoplasmique.

Pour ce travail, nous avons choisi la méthode proposée par Forsberg *et al.* (1970)⁷⁷ modifiée par Falla *et al.* (1990)⁸¹ qui est facilement mise en œuvre et ne requiert que peu de matériel. De plus, les ME obtenues présentent un grand degré de pureté. Elle présente donc le meilleur rapport qualité / efficacité, mais elle n'a jamais été appliquée à *Alcaligenes eutrophus* CH34.

4. Les anticorps monoclonaux

4.1. Fonction et structure des anticorps

La réponse immunitaire est un système de protection qui défend son hôte contre des agressions extérieures. Elle se scinde en deux types : la réponse cellulaire assurée par des cellules de type monocytaires, granulocytaires et autres, et la réponse humorale assurée par les Ac. Une infection ou une immunisation induit un ensemble complexe de réactions qui aboutit à la stimulation des lymphocytes B. Ces derniers produisent des protéines appelées Ac qui se lient à l'Ag étranger. Cette liaison induit la destruction ou la neutralisation de l'Ag par phagocytose et activation du complément (Kuby, 1992)⁸³.

Cinq classes d'Ac (ou immunoglobulines (Ig)) existent. Il s'agit des IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Ils diffèrent à la fois par leur rôle physiologique et par leur structure. D'un point de vue structural, les IgG sont une classe particulière d'Ig qui a été très étudiée, sans doute à cause du rôle dominant qu'elles jouent dans la réponse du système immunitaire mature. La plupart des connaissances sur la structure des Ac vient de la cristallographie par rayons X et de l'étude de

la séquence des gènes codant pour les Ig (Kabat *et al.*, 1991)⁸⁴. L'IgG est une protéine en forme de "Y" composée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères liées par des ponts disulfures (Figure 11). Par action d'enzymes, comme par exemple la papaïne, l'IgG peut être fractionnée en deux régions : Fc et Fab (Bach et Lesavre, 1993)⁸⁵. Le fragment Fc (cristallisable) porte les fonctions effectrices de chaque classe ou sous-classe d'Ig. Les deux fragments Fab (antigen-binding) comportent chacun une chaîne légère et une moitié de chaîne lourde. Ils sont capables de se lier spécifiquement à l'Ag grâce à l'association des extrémités NH₂-terminales de chacune de ces chaînes. Cette spécificité de liaison est assurée par la complémentarité entre les trois régions hypervariables, formées de quelques acides aminés, de la boucle V_L et celles de la boucle V_H.

<p>Hinge : région charnière C_L : constante légère V_L : variable légère V_H : variable lourde CH1, CH2, CH3 : boucles constantes des chaînes lourdes</p>

Figure 11 : Structure tridimensionnelle d'une IgG

Afin de remplir leur rôle crucial dans la défense de l'organisme, les Ac doivent être capables de s'adapter facilement. Le système immunitaire devant faire face à une grande variété de substances étrangères (bactéries, virus, toxines,...), les Ac doivent être extrêmement diversifiés pour répondre à ces agressions. A travers un processus complexe de modifications des gènes, les lymphocytes B peuvent produire jusqu'à 10¹⁰ IgG qui diffèrent

dans la composition de leur site de fixation (French *et al.*, 1989)⁸⁶, mais chacun produit un seul siège de reconnaissance.

Un autre attribut important de l'Ac est sa spécificité. Afin de ne reconnaître que les Ag étrangers, les lymphocytes, au niveau de la rate, sont mis en contact avec l'ensemble des Ag du Complexe Majeur d'Histocompatibilité. Cette spécificité est également le résultat de la nature complémentaire du phénomène de fixation Ag-Ac (Pressman, 1957)⁸⁷. En tirant avantage des propriétés chimiques variées de 20 acides aminés, le système immunitaire est capable de générer un grand nombre de sites de fixation de l'Ac (paratope) qui peut s'accommoder de la taille, de la charge et de l'hydrophobicité d'un Ag donné. Le haut degré de complémentarité de la fixation de l'Ac permet une haute affinité pour l'Ag. La constante d'affinité à l'équilibre peut atteindre 10^{-12} M/L (Schutz et Jacobs, 1988)⁸⁸, la moyenne se situant à 10^{-2} M/L.

La capacité d'un organisme à produire des Ac spécifiques d'un Ag fait de ces derniers un merveilleux outil de détection voire de thérapie.

4.2. Production et isolement d'anticorps polyclonaux et monoclonaux

Deux types d'Ac peuvent être utilisés. Le premier type, les Ac polyclonaux (Garvey *et al.*, 1977)⁸⁹ sont obtenus en immunisant des animaux tels que la chèvre, le mouton, la souris, le lapin, voire la poule. Après immunisation, le sang de l'animal est prélevé et les Ac peuvent être purifiés directement à partir du sérum. Comme leur nom l'indique, les Ac polyclonaux proviennent d'une grande variété de lymphocytes B qui diffèrent au niveau du matériel génétique codant pour la production d'Ac. Dans les échantillons d'Ac polyclonaux, une faible proportion de ces Ig (0,1 à 10%) pourra être spécifique de l'Ag avec lequel l'animal a été immunisé.

Le second type d'Ac, les Acms (Goding, 1986)⁹⁰, sont obtenus par un procédé plus complexe. La technologie associée à la production d'Acms (Köhler et Milstein, 1975⁹¹; Köhler et Milstein, 1976⁹²; Galfrè *et al.*, 1977⁹³) est donnée dans la Figure 12. Un mammifère, par exemple une souris, est immunisé par des injections répétées de l'Ag. Les protocoles d'immunisation sont très variables puisque le nombre d'immunisations va de une (Lai *et al.*, 1990)⁹⁴ à six (Bermingham *et al.*, 1995)⁹⁵ injections intrapéritonéales ou sous-cutanées espacées de 15 jours, avant de recevoir un rappel intraveineux 4 jours avant le sacrifice. La rate de la souris est alors prélevée car elle est riche en lymphocytes B. Malheureusement ces cellules ne peuvent être cultivées car leur espérance de survie n'excède pas 72 heures.

Pour pallier ce problème, les splénocytes sont fusionnés, en présence d'un agent de fusion le polyéthylène glycol (PEG), avec des cellules immortelles de myélome pouvant proliférer *in vitro*. Une première sélection, basée sur la survie, est réalisée en ajoutant dans le milieu de culture un agent sélectif le HAT qui contient de l'Hypoxanthine, de l'Aminoptérine et de la Thymidine. Seules les cellules issues de la fusion d'un lymphocyte et d'une cellule de myélome pourront se développer. Les cellules résultantes, appelées hybridomes, sont criblées par différents tests immunologiques dont le test ELISA (Harlow et Lane, 1988)⁹⁶. La réalisation de ces tests permet d'obtenir des hybridomes qui produisent des Ac spécifiques de l'Ag injecté. Comme un hybridome dérive, en principe, d'un seul lymphocyte B, il produit ce qui est appelé un anticorps monoclonal. Des clonages cellulaires sont réalisés pour l'établissement de la lignée cellulaire.

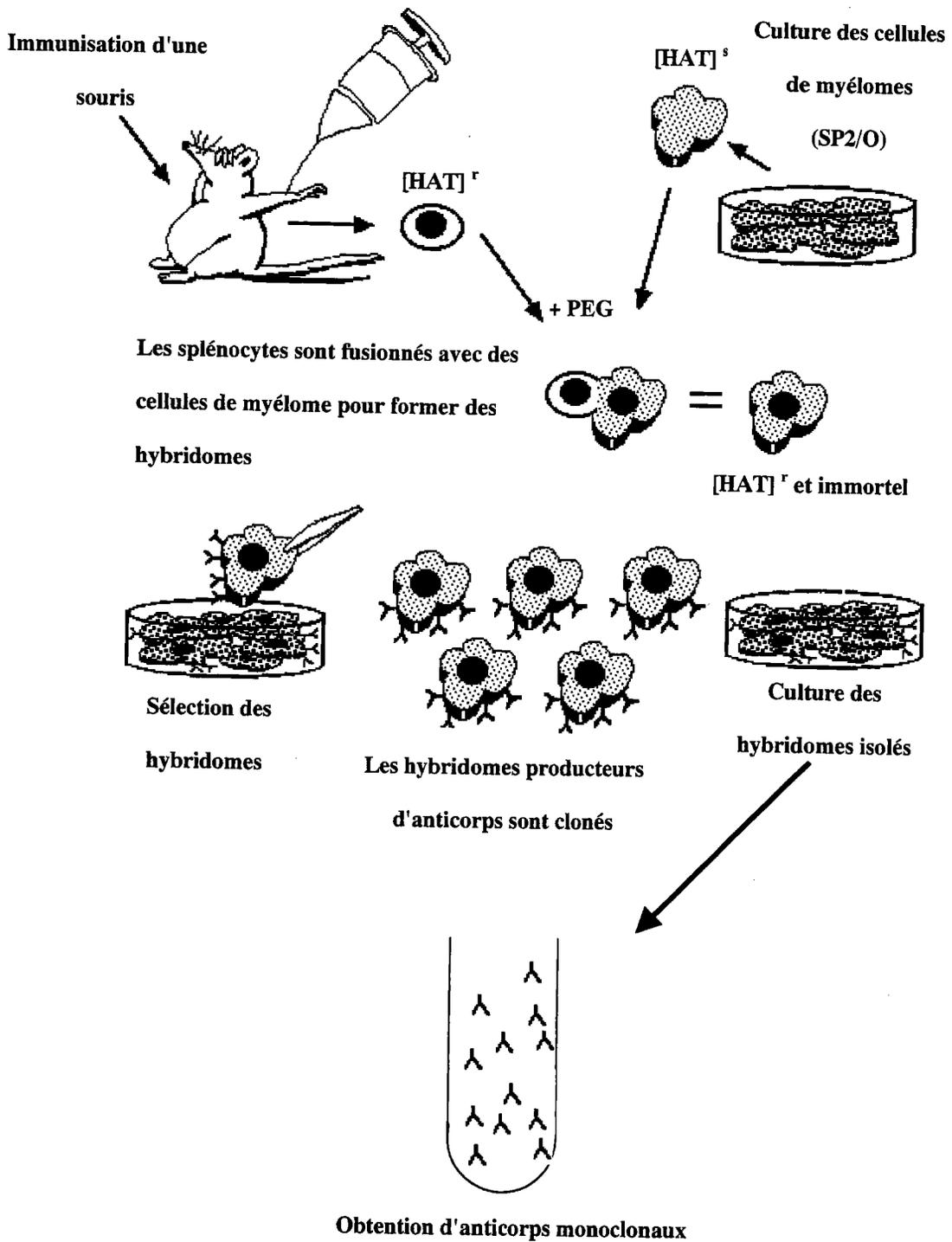


Figure 12 : Schéma résumant le protocole de production d'Acms proposé par Köhler et Milstein (1976)⁹². PEG : Polyéthylène glycol

4.3. Anticorps polyclonaux contre anticorps monoclonaux

S'il n'y a pas de contraintes expérimentales particulières, les Ac polyclonaux et monoclonaux représentent deux sources d'Ac intéressantes, offrant chacune certains avantages. Dans le cas des Ac polyclonaux, les avantages techniques sont clairs. Les Ac polyclonaux sont peu onéreux à produire par comparaison aux Acms. De plus, de grandes quantités d'Ac polyclonaux (environ 10 mg/ml), dont seulement 0,1 à 10 % sont spécifiques, peuvent être produites à partir du sérum d'un animal immunisé. Enfin, les Ac polyclonaux de grande affinité peuvent être isolés après 2 à 3 mois suivant l'immunisation initiale. Ces derniers sont moins spécifiques de la structure de l'Ag. Comme ils contiennent l'ensemble de la population produisant des Ac spécifiques de l'Ag envisagé, cela permet une approche statistique de la réponse immunitaire. Cette approche est beaucoup plus difficile à appréhender avec les Acms.

D'un autre côté, les Acms ont certains avantages sur les Ac polyclonaux. Du fait de leur nature immortelle, les hybridomes peuvent être congelés et remis en culture. Ainsi, pour une lignée d'hybridome donnée, il existe une source constante, reproductible et renouvelable du même Ac en grande quantité. Leur composition définie permet une analyse chimique détaillée au niveau moléculaire. Ce niveau de détail permet également une étude mécanistique de la liaison Ag-Ac.

Pour répondre à la problématique posée par le sujet de ce travail, l'approche par les Acms, qui allient la spécificité de la détection à la reproductibilité de cette dernière, a déjà été utilisée pour déterminer la présence de bactéries ou l'étude de certains mécanismes de transport comme par exemple, la détection de *Clostridium tyrobutyricum* (Gueguen *et al.*, 1990)⁹⁷, contre des protéines de la ME chez *Haemophilus influenzae* type b (Hamel, 1987)⁹⁸, ou pour étudier le transport du fer au niveau de la ME chez *Pseudomonas aeruginosa* (Sokol

et Woods, 1986⁹⁹ ; Smith *et al.*, 1991¹⁰⁰). Les autres domaines d'application des Acms sont par exemple l'approche immunothérapeutique du traitement des cancers (Atkins, 1998)¹⁰¹, l'identification de virus (Sagazio *et al.*, 1998)¹⁰² ou le suivi des stades de développement de bactéries (Walderich *et al.*, 1998)¹⁰³, la détection en recherche fondamentale pour l'identification de gènes impliqués dans la formation de protéines (Jennings *et al.*, 1998)¹⁰⁴.

4.4. Culture des hybridomes

Un fois l'hybridome sélectionné, il est important de produire des Ac en grande quantité. Pour cela, deux approches sont possibles :

- la production *in vivo* par formation de liquides d'ascites
- la production *in vitro* par culture cellulaire

Pour la production d'ascites, l'hybridome est injecté à une souris "pristanée" c'est-à-dire traitée au pristane pour éviter la formation de tumeurs solides. Ces cellules, comme celles de myélomes, ont la possibilité de produire des tumeurs. Par conséquent, après injection, une tumeur liquide va se développer et le liquide proche de la tumeur, l'ascite, va être chargé en Acms. Il suffira de prélever régulièrement ces liquides. Cette technique, si elle permet d'obtenir de grande quantité d'Acms quasiment purs, est très contraignante car elle requiert du personnel qualifié et des locaux adaptés pour recevoir les animaux. De plus, certains pays comme l'Allemagne l'ont déjà interdite sur leur sol.

La production *in vitro* va consister à maintenir en culture les cellules. Les milieux de culture utilisés doivent permettre la croissance et le maintien des fonctions spécifiques des hybridomes. Deux types de milieux de culture sont utilisés :

→ les milieux supplémentés en sérum : ce sont les milieux de base comme le DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) ou le RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute) par exemple. Ces milieux contiennent des acides aminés, des vitamines, une source de carbone (le plus souvent du glucose), et des sels minéraux dissouts dans de l'eau chimiquement pure. Ces milieux ont une composition de base et il est nécessaire de les supplémenter en glutamine, antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) et en sérum qu'il soit de veau foetal (riche en facteurs de croissance et pauvre en Ig), de cheval ou de veau nouveau-né par exemple. La composition de ce dernier n'est pas connue précisément, mais elle comporte en particulier : des sels minéraux, des facteurs de croissance, des Ig, de l'albumine (Glassy *et al.*, 1988)¹⁰⁵.

Le sérum pose deux problèmes qui sont son coût et sa composition variable, ainsi que la présence d'IgG bovines qui peuvent interférer lors de la purification des Acms (Butler et Jenkins, 1989)¹⁰⁶.

→ les milieux définis ont été développés pour la production d'Acms entre autre. Ils ont l'avantage d'être de composition définie et stable permettant surtout de simplifier la purification des Acms car ils contiennent de très faibles concentrations en protéines. Il faut cependant supplémenter en glutamine pour favoriser le développement des hybridomes. Ces milieux sont de plus en plus employés pour la production d'Acms (Gaillard, 1993¹⁰⁷ ; Martial, 1991¹⁰⁸).

Si la culture par formation de liquide d'ascite permet d'obtenir de grandes concentrations en Acms, différents systèmes de production d'Acms *in vitro* existent. Le premier est la culture discontinue en flacons, ce système est utilisé durant toute la phase de sélection des hybridomes. La faible quantité d'Ac obtenue est le principal désavantage de cette

technique. Une fois la sélection réalisée, la culture en fed-batch permet d'obtenir de plus grandes quantités d'AcM car son rendement est 2,5 fois supérieur à celui de la culture discontinue (Reuveny *et al.*, 1986a)¹⁰⁹. Lorsque l'ensemble des conditions de culture de l'hybridome sont maîtrisées, il est possible de passer en système de culture continue en utilisant un cytotuteur couplé à un système de fibres creuses (Knazek, 1972)¹¹⁰ ou de membranes planes (Scheirer, 1998)¹¹¹. Ces systèmes sont les concurrents directs de la production en ascites (Reuveny *et al.*, 1986b)¹¹² car ils permettent d'obtenir plusieurs mg d'Ac par ml de milieu.

4.5. Purification des anticorps monoclonaux

Une fois les Acms produits, il peut être utile, voire indispensable, de les purifier avant de les utiliser. Une des possibilités de purification est la chromatographie à base de protéine G. Il s'agit d'une protéine de l'enveloppe bactérienne des streptocoques du groupe G qui fixe spécifiquement le fragment Fc de nombreuses IgG (Bjorck et Kronvall, 1984)¹¹³. Un procédé similaire antérieur utilise la protéine A issue de *Staphylococcus aureus* (Eliasson *et al.*, 1988)¹¹⁴, mais cette protéine fixe avec moins d'affinité que la protéine G certaines IgG de mammifères (Fahnestock, 1987)¹¹⁵. Le développement de ce type de chromatographie a marqué une avancée importante par rapport aux autres techniques comme la gel filtration, le sulfate d'ammonium, l'acide caprylique, les colonnes d'affinité, l'électrophorèse non dénaturante, ou l'HPLC. L'échange d'ions ou la précipitation peuvent amener des contaminations par des protéines indésirables. Il est important de noter que dans le cas des Ac polyclonaux, la chromatographie à protéine G ne tient pas compte de la sélectivité de fixation et de l'affinité, car la fixation à la protéine G n'est pas influencée par le type d'antigène reconnu. Ainsi, les Ac polyclonaux, purifiés par cette technique, sont représentatifs de la distribution complète des IgG présents dans le sérum. Le Tableau 1 donne les capacités de fixation pour ces deux types d'immunosorbents.

Tableau 1 : Affinités des protéines A et G pour certains anticorps.

Anticorps	Affinité de la protéine A ^a	Affinité de la protéine G ^b
IgG ₁ humaine	++++	++++
IgG ₂ humaine	++++	++++
IgG ₃ humaine	-	++++
IgG ₄ humaine	++++	++++
IgG ₁ de rat	-	+
IgG _{2a} humaine	-	++++
IgG _{2b} humaine	-	++
IgG _{2c} humaine	+	++
IgG ₁ murine	+	++++
IgG _{2a} murine	++++	++++
IgG _{2b} murine	+++	+++
IgG ₃ murine	++	+++

^a d'après Langone (1978)¹¹⁶

^b d'après Bjorck and Kronvall (1984)¹¹³ et Akerstrom et Bjorck (1986)¹¹⁷

Après centrifugation, les surnageants de culture ou les ascites peuvent passer sur une colonne de chromatographie qui contient de la protéine G fixée de manière covalente sur des supports à base d'azalactone activée ou de sépharose par exemple. A pH neutre, les IgG sont fixées et les substances biologiques indésirables, tel que l'albumine ou les acides nucléiques, peuvent être éliminées par lavage. Quand le pH est inférieur à 3, les IgG sont éluées de la colonne (Jungbauer *et al.*, 1989)¹¹⁸. Après neutralisation du pH et concentration de l'éluat par ultracentrifugation, des quantités significatives d'IgG peuvent être obtenues, jusqu'à 10 mg d'IgG humaine par ml de protéine G. Cette méthode de purification se limite à de faibles volumes de surnageant de culture, ne dépassant pas 100 ml par cycle.

L'approche des Acms semble donc pouvoir répondre à notre problématique. En effet, le besoin de spécificité, quant à la reconnaissance de la bactérie, fait de cette technique la meilleure des options, mais il faut également ajouter la reproductibilité donnée à la détection

du fait du caractère monoclonal des Ac produits. Les Acms fourniront une réponse rapide lors d'un test de détection sur le terrain, évitant le recours à la culture de la souche sur des milieux sélectifs afin de l'identifier. Ceci dans l'optique d'utiliser cette bactérie comme bioindicateur de pollution par les métaux lourds. L'utilisation d'un milieu de culture défini, après la sélection des hybridomes, pourra faciliter la purification des Acms par chromatographie sur protéine G par exemple.

4.6. Méthodes d'immunisations *in vitro* - Induction d'une réponse immunitaire primaire

Les travaux portant sur l'immunisation *in vitro* pour la production d'une réponse immunitaire primaire débutent dans les années 60, ce type de réponse se traduisant par la production d'IgM (non spécifiques). Les premiers essais, pour produire des Ac, ont été menés sur des fragments de rate ou des cellules dissociées de rate (Richardson et Dutton, 1964)¹¹⁹ d'animaux préalablement immunisés. La culture de ces cellules mises en présence de l'antigène, des globules rouges, permettait le dosage des anticorps produits par l'apparition de plages de lyse.

Une extension de ces travaux a été proposée par Mishell et Dutton (1966)¹²⁰, qui ont montré qu'une suspension de cellules dissociées de rate de souris, non immunisée, pouvait être stimulée pour produire des Ac. L'Ag utilisé était des globules rouges et la production d'Ac (IgM non spécifiques) était visualisée par la formation de plages de lyse lors de la culture de ces cellules de rate sur un milieu solide contenant l'Ag. La différence de réponse entre l'*in-vitro* et l'*in-vivo* était de l'ordre d'un facteur 100 en faveur de la seconde. Marbrook (1967)¹²¹ puis Mishell et Dutton (1967)¹²² ont montré que la concentration en Ag était importante pour la qualité de la réponse immunitaire, et que 3 à 4 jours après

l'immunisation la réponse primaire était maximale. En fait ce n'est qu'après la disparition complète de l'Ag qu'apparaissent d'Ac (IgM).

Cette méthode a permis de mieux connaître les phénomènes impliqués dans la réponse immunitaire. En effet, Mosier (1967)¹²³ a montré qu'il y avait deux populations cellulaires dans la rate : les lymphocytes et les macrophages. La présence de ces deux types cellulaires étant nécessaire pour obtenir une réponse immunitaire, Mosier et Coppelson (1968)¹²⁴ ont fait la différence entre lymphocytes T et lymphocytes B. L'importance des macrophages dans le développement de la réponse immunitaire primaire *in vitro* a été prouvée par Pierce (1969)¹²⁵, qui a aussi montré le développement de cellules mémoires issues des lymphocytes après immunisation primaire. Ainsi, la réponse Ac observée lors d'une nouvelle administration de l'Ag ayant servi pour la primo-immunisation est plus précoce du fait de l'existence de lymphocytes mémoires qui reconnaissent l'Ag dès la réintroduction dans l'organisme.

Le problème qui a empêché le développement de cette méthode était que les cellules commençaient à mourir au bout de 72 heures. Elle est encore utilisée pour évaluer, lors d'intoxications aiguës, l'impact de substances comme par exemple les composés contenant du fer (Ban *et al.*, 1995)¹²⁶ ou les opioïdes (Eisenstein *et al.*, 1995)¹²⁷ sur la réponse immunitaire primaire non spécifique vis-à-vis des globules rouges de mouton.

Ce type de travail n'a jamais permis d'aboutir à la production d'Acms. En effet, la mortalité des lymphocytes empêchait la réalisation d'immunisations répétées induisant une réponse immunitaire secondaire. C'est cette réponse permettant d'obtenir des Ac plus spécifiques de l'Ag que nous avons cherché à favoriser. Les lymphocytes ainsi obtenus dans notre laboratoire sont issus d'une immunisation prolongée à l'aide d'un mitogène polyclonal. Ils se sont révélés être capables d'être utilisés dans le cadre d'une fusion cellulaire pour l'obtention d'hybridomes producteurs d'Acms d'isotype IgG.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Culture d'*Alcaligenes eutrophus* CH34

1.1. Matériel biologique

La souche utilisée dans cette étude est une souche d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 (ATCC 43123) gracieusement fournie, ainsi que les autres souches bactériennes utilisées, par le Docteur BAUDA Pascale (Centre des Sciences de l'Environnement, Metz, Moselle)

1.2. Milieu de culture

La bactérie est mise en culture dans un milieu minéral minimum appelé milieu Tris-Gluconate (milieu TG) décrit par Mergeay *et al.* (1985)⁵. Sa composition, pour 1 litre, est la suivante :

• Tris de base	6,06 g
• NaCl	4,68 g
• KCl	1,49 g
• NH ₄ Cl	1,07 g
• Na ₂ SO ₄	0,43 g
• MgCl ₂ .6H ₂ O	0,20 g
• CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03 g
• Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,23 g
• Fe ^{III} (NH ₄)-citrate	0,0048 g
• Gluconate de sodium	2,00 g
• Solution SL7	1 ml

Le pH du milieu est ajusté à 7,00 avant autoclavage 20 minutes à 120°C.

1.3. Préparation de la solution SL7

Il s'agit d'un mélange de différents oligo-éléments essentiels pour le bon développement de la bactérie. Cette solution ne peut se conserver que trois mois en la stockant à 4°C. Sa composition, pour 1 litre, est la suivante:

• HCl 25%	5,2 ml
• MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g
• H ₃ BO ₃	0,062 g
• CoCl ₂ .6H ₂ O	0,19 g
• CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0168 g
• NiCl ₂ .6H ₂ O	0,024 g
• Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,036 g

Après préparation, la solution est autoclavée 20 minutes à 120 °C.

1.4. Précultures de la bactérie

Alcaligenes eutrophus CH34 est cultivée dans un milieu TG, complet ou carencé en fer, sous agitation, à 30°C qui est la température optimale de croissance de la bactérie. Cette préculture est réalisée en erlen de 250 ml et servira pour toutes les cultures d'une même série.

Dans le cas où la bactérie doit être cultivée sous forte pression métallique, il est nécessaire d'induire les résistances à ces métaux. Pour cela, sont rajoutés dans le milieu TG, 100 µM de Ni et 100 µM de Zn. Les bactéries sont ensuite cultivées dans le milieu TG supplémenté avec la concentration voulue en métal lourd.

Le milieu d'isolement utilisé est un milieu TG dans lequel de l'agar est ajouté à la concentration de 15 g/l.

2. Vérification de la pureté de la souche bactérienne

La préculture servant pour toute une série de test, il est nécessaire de vérifier la pureté de la souche. Pour cela , après culture sur le milieu d'isolement, on vérifie la taille, l'aspect et la couleur de la colonie. A partir d'une colonie isolée, on procède à un ensemble de vérifications.

- ➔ La coloration de Gram, qui permettra de confirmer le caractère Gram(-) de la bactérie, suivie d'une observation au microscope qui prouvera qu'il s'agit bien d'un bâtonnet unicellulaire. A cela, s'ajoutent les tests KOH et Lana qui vont confirmer la coloration de Gram.
- ➔ Le deuxième groupe de tests est une culture sur milieux solides sélectifs. Il s'agit de milieux TG auxquels sont ajoutés de l'agar (15 g/l) et des éléments sélectifs. Ils se divisent en trois séries :
 - Milieu TG Complet → Bonne croissance de la bactérie
 - Milieu TG complet + 1 mM Ni + 1 mM Zn → Seule *Alcaligenes eutrophus* CH34 se développe
 - Milieu TG + 2 g/l de glucose → Aucune croissance de la bactérie
- ➔ Enfin, une galerie API 20 NE est utilisée. Il s'agit d'un ensemble de tests biochimiques facilitant l'identification de la bactérie. Une colonie s'étant développée sur le milieu sélectif contenant 1 mM Ni et 1 mM Zn permet de préparer la galerie.

Pour les souches dérivées d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, les mêmes tests sont utilisés pour vérifier leur pureté. Dans le cas de la vérification de la présence de mégaplasmes, le Ni et le Zn sont ajoutés dans des milieux différents car ces souches n'ont pas les deux mégaplasmes simultanément.

3. Culture des autres souches bactériennes

Les souches autres que celles du genre *Alcaligenes eutrophus* sont cultivées sur un milieu Stuki-Alexander (1987)¹²⁸ supplémenté ou non en fer à la température de 37°C. Ce milieu est utilisé car il s'agit d'un milieu minimum qui permet de cultiver un grand nombre de souches bactériennes en fonction de la source de carbone ajoutée. La composition de ce milieu est la suivante :

• K ₂ HPO ₄	0,775 g
• KH ₂ PO ₄	0,350 g
• (NH ₄) ₂ SO ₄	0,200 g
• MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
• Source de carbone (gluconate, glucose)	2 g
• Solution d'oligo-éléments	1 ml
• Eau ultrapure	1 litre

Le pH est ajusté à 7 et l'ensemble est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

La composition de la solution d'oligo-éléments est la suivante :

• H ₃ BO ₄	0,100 g
• ZnSO ₄ .4H ₂ O	0,040 g
• (NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,020 g
• MnSO ₄ .7H ₂ O	0,040 g
• CuSO ₄ .5H ₂ O	0,045 g

• FeSO ₄ .7H ₂ O	0,025 g
• Eau ultrapure	1 litre

4. Test au Chrome azurol S (CAS)

Cette méthode de détection des sidérophores est basée sur leur affinité pour le Fer(III) qui est indépendante de leur structure. L'équation suivante résume le principe de cet essai :



Un ligand (par exemple le sidérophore) est ajouté à une complexe fortement coloré de fer. Quand le fer se fixe au sidérophore, la libération du complexe coloré s'accompagne du changement de couleur du milieu réactionnel observable en spectrophotométrie.

6 ml d'une solution d'hexadecyltrimethylamonium bromide (HDTMA) à 10 mM sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml. Un mélange de 1,5 ml d'une solution de Fe(III) (1 mM FeCl₃.6H₂O, 10 mM HCl) et de 7,5 ml d'une solution aqueuse de CAS à 2mM est lentement ajouté sous agitation. Une quantité de 4,307 g de pipérazine anhydre est dissoute dans de l'eau et 6,25 ml d'HCl 12 M sont ajoutés. Cette solution tampon (pH = pK_a = 5,6) est mise dans la fiole jaugée et le volume est amené à 100 ml avec de l'eau ultrapure. La solution de travail est obtenue par ajout d'acide 5-sulfosalicylique à la concentration de 4 mM. Le stockage se fait à l'abri de la lumière.

Pour déterminer la quantité de sidérophores en solution, 0,5 ml de la solution de sidérophores ou du surnageant à tester, contenant au moins 7,5 nmole de cette molécule, sont ajoutés à 0,5 ml de solution de CAS. Une référence est préparée en utilisant exactement les mêmes composants, à l'exception des sidérophores. Après avoir atteint l'équilibre, l'absorbance est mesurée à 630 nm.

5. Préparation des membranes externes

Le protocole utilisé est celui proposé par Forsberg *et al.* (1970)⁷⁷ modifié par Falla *et al.* (1988)⁸¹.

25 ml de l'eren de préculture servent àensemencer un ballon de 5 litres contenant un milieu TG de composition adéquate. Ce dernier est placé sous agitation à 30°C pendant 72 heures. La suspension bactérienne est récoltée et lavée dans du Phosphate Buffered Saline (PBS), par centrifugation à 3500 Xg pendant 7 minutes.

Les culots précédents sont repris dans une solution de sucrose 0,5M (15 ml par culot), incubés 30 minutes à 25°C, sous agitation. L'ensemble est ensuite centrifugé à 35000 Xg, 20 minutes à 4°C. Les surnageants contenant les membranes externes sont regroupés. Ce protocole est répété quatre fois sur les culots. Les muréinoplastes (bactéries sans membrane externe) sont repris dans du PBS, aliquotés et congelés à -20°C.

Les surnageants sont centrifugés à 73000 Xg, 2 heures à 4°C afin de sédimenter les membranes externes. Ces dernières sont lavées dans 50 ml de PBS et centrifugées à 73000 Xg, 2 heures à 4°C. Le microculot obtenu est repris dans 10 ml de PBS, aliquoté et congelé à -20°C.

6. Dosage de marqueurs spécifiques et non spécifiques des fractions bactériennes obtenues.

Le choix des marqueurs a été fait de manière à évaluer la pureté et le degré de contamination d'une fraction par une autre, mais aussi par leur caractère de spécificité vis-à-vis de chaque fraction.

Le K.D.O. a été choisi comme marqueur spécifique de la membrane externe (Osborn *et al.*, 1972¹²⁹ ; Thorne *et al.*, 1973¹³⁰), la S.D.H. pour la membrane cytoplasmique (Kasahara

et Anraku, 1974)¹³¹, ou le muréinoplaste. Les dosages des protéines et du poids sec, marqueurs non spécifiques, ont aussi été effectués.

6.1. Dosage du 2-céto-3-désoxyoctonate

La quantité de K.D.O. présente chez *Alcaligenes eutrophus* CH34 (membrane externe et muréinoplaste) a été estimée à partir de la méthode proposée par Aminoff (1961)¹³² après minéralisation des échantillons. Le principe du dosage repose sur la réaction entre le K.D.O. et l'acide thiobarbiturique en milieu acide (acide périodique plus acide sulfurique), qui conduit à la formation d'un complexe de couleur rose après une extraction au butanol suivie d'un dosage colorimétrique à 549 nm.

Les échantillons à analyser (1ml) sont minéralisés dans 1 ml de HCl 12N par chauffage pendant 1 heure à 100°C.

Le dosage du K.D.O. est conduit sur 500 µl de minéralisat auxquels sont ajoutés 250 µl d'acide périodique 25 mM à pH1,2 (préparé dans une solution d'acide sulfurique 0,125 N). Après mélange et incubation à 37°C pendant 30 minutes, 200 µl d'arsénite de sodium 2% (préparé dans HCl 0,5 N) sont ajoutés, puis incubés à 37°C. Après cette période, 2 ml d'acide thiobarbiturique 0,1 M à pH9,0 sont ajoutés. La coloration rose attendue se développe après un chauffage de 7,5 minutes dans l'eau bouillante. Au terme de cette réaction, les tubes sont refroidis à température ambiante, puis 5 ml d'un mélange acide-butanol (95 ml butanol + 5 ml HCl 12N) sont ajoutés. Après passage au vortex et un repos de quelques minutes, la phase organique supérieure est prélevée et lue à 549 nm contre un blanc butanol-acide.

L'absorbance lue est traduite en µmoles de K.D.O. en utilisant une courbe étalon préalablement réalisée dans les mêmes conditions, avec une solution standard de K.D.O. (de 0 à 50 µmoles par ml). L'équation de cette droite étalon est :

$$Y = 0,181 X + 0,128$$

(r = 0,990 pour les 6 concentrations)

où

Y = unités absorbance à 549 nm

X = μ moles de K.D.O. / ml d'échantillon

6.2. Dosage de la succinate déshydrogénase

L'activité de la succinate déshydrogénase a été mesurée sur la ME et les muréinoplastes d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 selon une méthode proposée par Nachals *et al.* (1960)¹³³ et adaptée par Kasahara et Anraku (1974)¹³¹.

Le dosage de cette enzyme, présente dans la membrane cytoplasmique des bactéries, est effectué par la mesure de la dégradation de la couleur du 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP) et de la phénazine méthosulfate (PMS) réduits par l'enzyme activée et susceptible d'être détectée par la décroissance de l'absorbance à 600 nm à 25°C pendant 1 minute de réaction.

Dans une cuve pour spectrophotomètre, 500 μ l de tris-HCl 300 mM à pH 8,0, 500 μ l de KCN 24 mM et 500 μ l de succinate de sodium 240 mM sont ajoutés, mélangés et mis à 25°C pendant 5 minutes. Après cette période de préincubation, 500 μ l de la fraction à tester sont ajoutés. L'ensemble est laissé à 25°C pendant 1 minute. 500 μ l de DCPIP 0,25 mM et 500 μ l de PMS 1,2 mM sont ajoutés, dans cet ordre, et laissés au repos 4 minutes. La lecture à 600 nm est ensuite réalisée pendant 1 minute de façon à obtenir 5 lectures à 12 secondes d'intervalle chacune.

La différence d'absorbance entre la première et la dernière lecture est établie et les résultats sont rapportés à la quantité de protéines contenues dans chaque fraction, préalablement dosée.

$$\Delta D.O. = \epsilon L \Delta \text{concentration en S.D.H.}$$

$$\Delta \text{concentration en S.D.H.} = \Delta D.O. / \epsilon L \times \text{mg protéines}^{-1}$$

$$\epsilon = \text{coefficient d'extinction } (2,2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1})$$

$$L = \text{longueur du trajet optique dans la cuve } (\text{cm}^{-2})$$

6.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a aussi été conduit sur les muréinoplastes et les membranes externes d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. La méthode colorimétrique utilisée est celle proposée par Bradford (1976)¹³⁴ qui fait intervenir un colorant (le bleu de coomassie) capable de former un complexe coloré bleu par interaction des groupements anioniques du colorant avec les groupes aminés des protéines. Cette coloration est stable pendant 1 heure et peut être lue à 595 nm.

Les échantillons subissent une extraction dans un solvant organique (dichlorométhane 1/5) pour permettre le dosage de toutes les protéines et éviter les réactions hydrophobes des fractions placées dans un milieu aqueux.

Dans un tube bien nettoyé dans HCl 1% et dans de l'eau déminéralisée, 100 μ l de l'échantillon à tester sont introduits et 900 μ l de réactif de Bradford (Bio-Rad) sont ajoutés. Les tubes sont passés au vortex pendant 30 secondes et lus à 595 nm.

Une gamme étalon a été faite avec des protéines (Sérum Albumine Bovine 1 g/l dans PBS). Tous les dosages ont été effectués en triplicat pour les échantillons à analyser comme

pour la gamme étalon. L'équation de la droite de régression correspondant à la gamme étalon est la suivante :

$$Y = 0,00574 X + 0,00295$$

(r = 0,995 pour 6 concentrations)

où

Y = Absorbance à 595 nm

X = concentration de protéines en µg/ml

6.4. Mesure du poids sec

La technique utilisée est celle décrite dans la norme AFNOR T90.105. Un filtre Millipore 0,45µm, préalablement séché 1 heure à 105°C et pesé, est déposé sur un support relié à une fiole à vide. La pompe à vide étant mise en route, 2 ml de la fraction à tester sont placés sur le filtre. Après 2 à 3 minutes, le filtre est mis à sécher à l'étuve à 105°C pendant 3 heures, puis pesé. La différence de poids du filtre, correspondant au poids sec des 2 ml de fraction, a été finalement exprimée en mg/l.

7. Electrophorèse SDS-PAGE

Il s'agit d'une technique mise au point par Laemmli (1970)¹³⁵. Elle permet la migration de protéines, dissociées les unes des autres par action d'un détergent le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), uniquement en fonction de leur poids moléculaire sous un courant de voltage constant (200 V) pendant 45 minutes. La technique est réalisée en gel discontinu d'acrylamide / Bis-acrylamide 12%, c'est-à-dire que le gel de migration est formé de deux gels superposés :

- le gel de concentration (ou stacking gel) qui est une matrice à larges pores qui va empêcher la convection des protéines. Ces dernières passent facilement de la base

du puits d'électrophorèse à la fin du stacking gel. Les protéines sont bien plus comprimées avant leur séparation que ne le permettrait une méthode mécanique.

→ le gel de séparation (ou running gel) qui va permettre la séparation proprement dite des protéines.

La coloration utilisée sera une coloration au nitrate d'argent qui a une sensibilité de l'ordre de 10 ng, comparativement à la coloration au bleu de coomassie dont la sensibilité est de l'ordre du µg. Afin de pouvoir déterminer le poids apparent des protéines après migration, des standards de poids moléculaire pour coloration à l'argent ont été utilisés. Leur fourchette de poids moléculaire va de 14,4 à 97,4 kDa.

7.1. Préparation des deux gels

Les compositions qui sont données ci-dessous sont valables pour la préparation de deux gels de migration de type mini-gel.

7.1.1. Gel de séparation

1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	2,5 ml
Eau ultrapure (ou distillée)	3,35 ml
Acrylamide / Bisacrylamide 30%	4 ml
SDS 10%	100 µl
Ammonium Persulfate 10% (w/v)	50 µl
Temed	5 µl

Afin de permettre une bonne polymérisation en anaérobiose du gel de séparation, ce dernier est recouvert d'isopropanol. Après polymérisation, le solvant est éliminé par lavage avec de l'eau ultrapure.

7.1.2. Gel de concentration

0,5 M Tris-HCl, pH=6,8	2,5 ml
Eau ultrapure (ou distillée)	6,1 ml
Acrylamide / Bisacrylamide 30%	1,33 ml
SDS 10%	100 μ l
Ammonium Persulfate 10% (w/v)	50 μ l
Temed	10 μ l

Ce gel est coulé sur le premier et des peignes permettent d'y former les puits d'électrophorèse.

7.2. Coloration au bleu de Coomassie

Ce protocole se déroule sous agitation et à la température du laboratoire.

→ Une solution stock de bleu de Coomassie R250 à 1,5 % est préparée dans la solution de décoloration

→ La composition de la solution de décoloration est la suivante :

1 volume d'acide acétique

4 volumes d'eau ultrapure

4 volumes d'éthanol

→ La coloration se fait sur une période de 30 minutes à 1 nuit dans une solution de bleu de Coomassie à 0,15 % diluée dans de la solution de décoloration. Au terme de ce temps, la décoloration se fait dans plusieurs bains contenant la solution en question. Dans le cas où les gels seraient séchés, un rinçage dans de l'eau ultrapure est obligatoire.

7.3. Coloration au nitrate d'argent

Ce protocole est réalisé sous agitation constante et à la température du laboratoire.

→ La fixation se fait dans une solution dont la composition est la suivante :

1 volume d'acide acétique

4 volumes d'eau ultrapure

4 volumes d'éthanol

Les gels sont laissés 20 minutes dans cette solution. Cette solution est conservée car elle servira à arrêter la réaction de développement de la coloration. 3 lavages successifs, de 5 minutes chacun, sont réalisés dans de l'eau distillée.

→ 3 lavages de 20 minutes sont réalisés dans de l'éthanol 50 %. Les deux premiers sont suivis chacun d'un rinçage de 5 minutes dans de l'eau ultrapure, le dernier fait l'objet de trois lavages successifs de 5 minutes dans de l'eau ultrapure.

→ La coloration se fait dans une solution dont la composition est la suivante :

- **Solution 1** : NaOH 0,1 M 840 ml

NH₄OH 28% 56 ml

Ce mélange est conservé à l'abri de la lumière.

- **Solution 2** : AgNO₃ 20 g / 100 ml d'eau ultrapure – A conserver à l'abri de la lumière.

5 minutes avant l'utilisation, 73 ml de la solution 1 et 6 ml de la solution 2 sont mélangés en agitant doucement et le complément à 300 ml est fait avec de l'eau ultrapure. Les gels sont mis 20 minutes dans cette solution. 2 lavages de 5 minutes chacun sont effectués dans de l'eau ultrapure.

→ Le développement de la coloration est réalisé dans la solution suivante :

300 ml eau ultrapure

2 ml acide citrique 2%

0,4 ml formaldéhyde 37%

Les gels sont placés dans cette solution jusqu'à apparition des bandes de protéines. La réaction est stoppée en plongeant les gels dans la solution de fixation. Dans le cas où les gels seraient séchés, il est nécessaire de les plonger dans de l'eau ultrapure avant séchage.

7.4. Détermination du poids moléculaire des protéines

Les poids moléculaires sont déterminés en SDS-PAGE en comparant les mobilités des protéines séparées à celles des marqueurs de poids moléculaires utilisés. La mobilité relative, R_f , est définie comme étant la mobilité de la protéine divisée par la mobilité du front des ions. Comme ce dernier est très difficile à localiser en pratique, les mobilités sont déterminées par rapport au front de migration coloré qui se situe très légèrement en-dessous le front des ions.

$$R_f = (\text{distance parcourue par la bande}) / (\text{Distance de migration du front coloré})$$

Dans chaque gel, un puits reçoit le mélange des standards de poids moléculaires qui vont migrer en parallèle aux protéines étudiées. Le logarithme du poids moléculaire de chaque standard en fonction du R_f donne des résultats suffisamment précis pour évaluer le poids moléculaire de protéines inconnues.

8. Souris utilisées

Ce sont des souris femelles BALB/c âgées de 4 semaines au début du traitement qui ont été utilisées pour l'obtention d'Acms. Pour la préparation des macrophages intrapéritonéaux, la même lignée de souris est utilisée âgées de 11 semaines.

9. Préparation de l'immunogène

Pour les injections intrapéritonéales, les Ag (ME ou bactéries fixées) sont dilués dans de l'adjuvant incomplet de Freund. Les bactéries entières sont fixées dans du formaldéhyde 0,4

%. Selon les essais, 20 µg d'Ag sont ajoutés à 100 µl d'adjuvant, ou 200 µg d'Ag sont dilués dans 500 µl d'adjuvant.

Pour les rappels intraveineux (veine de la queue), l'Ag est dilué dans du sérum physiologique. La quantité injectée allait de 20 µg d'Ag dans 50 µl de diluant à 20 µg dans 100 µl.

Avant injection, les préparations sont mises à 37°C, pour éviter tous problèmes lors de celle-ci.

Le calendrier d'immunisation est le suivant : trois injections intrapéritonéales sont pratiquées à 15 jours d'intervalle. Le rappel intraveineux a lieu quatre jours avant la fusion et 15 jours après la dernière injection.

10. La lignée Sp2/O-Ag14

Cette lignée est un hybridome issu de la fusion de cellules de la lignée X63/Ag8 et de splénocytes de souris BALB/c immunisées avec des globules rouges de mouton. Cette lignée est non sécrétrice d'anticorps. Les cellules sont conservées dans l'azote liquide et un pool cellulaire est maintenu constamment en culture.

10.1. Composition du milieu de culture

Il s'agit de milieu RPMI 1640 sans L-Glutamine supplémenté de :

- 10 % sérum de veau foetal décomplémenté
- 2 % pénicilline / streptomycine (5000 µg/ml et 5000 U/ml)
- 2 % L-glutamine 200 mM
- 1 % pyruvate de sodium 200 mM
- 0,1 % β-mercaptoéthanol 50 mM

Ce milieu sera appelé milieu complet.

10.2. Conditions de culture

La culture est faite dans des flacons de culture de 80 cm² dans un volume de 35 ml de milieu complet / flacon. Tous les 4 jours les cellules sont décollées du fond des flacons et remises en culture par dilution au 1/20^{ème} dans du milieu complet neuf.

11. Préparation des macrophages intrapéritonéaux

Les macrophages sont prélevés par injection, avec une seringue à grosse aiguille, de 10 ml de RPMI 1640 dans le péritoine de souris BALB/c. Ces cellules servent de cellules nourricières et facilitent le développement des hybridomes après la fusion. Elles ont aussi un rôle de phagocytose des débris cellulaires. Après lavage et numération, elles sont congelées en cryotube à -80°C à raison de 4.10⁶ cellules par tube.

Une partie des macrophages obtenus va servir à préparer le milieu conditionné, il s'agit d'un surnageant de culture de macrophages. Dans un flacon de culture de 80 cm², une concentration de 4.10⁵ macrophages / ml est amenée dans du milieu complet. La flasque de culture est laissée dans l'incubateur à CO₂ (37°C, 5% CO₂) pendant 24 heures. L'ensemble est ensuite centrifugé à 300 X g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré, filtré sur filtre 0,1 µm et congelé à -80°C en aliquots de 20 ml.

12. Protocole de fusion cellulaire

Les souris immunisées sont tuées par dislocation des vertèbres et leur rate est prélevée après dissection. Elle subit deux lavages dans du RPMI 1640, puis elle est crevée à l'aide de deux aiguilles pliées en Z et vidée.

L'ensemble des splénocytes est repris dans 30 ml de RPMI 1640, les agrégats cellulaires sont disloqués à l'aide d'une pipette stérile. L'ensemble est ensuite laissé au repos 10 minutes. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 1500 X g pendant 5 minutes.

Parallèlement, des cellules de type SP2/O sont décrochées des flasques de culture, puis centrifugées à 1500 X g pendant 5 minutes. Les culots sont repris dans 50 ml de RPMI 1640, et les cellules sont comptées sur cellule de Malassez.

Les splénocytes centrifugés sont repris dans 10 ml de RPMI 1640 et comptés sur cellule de Malassez.

Les deux types cellulaires sont regroupés pour la fusion dans le ratio **1 SP2/O : 2 splénocytes**. L'ensemble est centrifugé à 1500 X g pendant 5 minutes. Un maximum de surnageant sera retiré après centrifugation. L'agent de fusion, le PEG 1500 (Boehringer Mannheim), est ajouté dans la proportion de 1 ml de PEG pour 10^8 cellules à fusionner. Ce volume de PEG (V_{PEG}) est ajouté sur une période de 1 minute tout en remettant en suspension le culot cellulaire. Cette suspension est ensuite placée au bain-marie à 37°C pendant 90 secondes sous agitation.

Après fusion sont ajoutés, sur une période de 1 minute et successivement, des volumes de RPMI 1640 équivalents à $1 V_{PEG}$, $5 V_{PEG}$ et $15 V_{PEG}$ afin de diluer le PEG. Les cellules sont alors laissées au repos 10 minutes, puis centrifugées à 1500 X g pendant 5 minutes. Le culot est repris avec du milieu complet pour obtenir une concentration finale de 5,7 millions de cellules par ml.

Dans des plaques de culture à 96 puits, dans lesquelles ont été mis la veille des macrophages à la concentration de 10500 cellules/puits/100 μ l, 50 μ l de la suspension des cellules fusionnées sont déposés dans chaque puits. 4 heures après, 100 μ l de milieu complet contenant du HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine) sont ajoutés dans chaque puits. L'ensemble est laissé dans un incubateur à CO₂, à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 10 jours.

12.1. Suivi de fusion

Au bout de quelques jours, l'observation microscopique (microscope inversé) permet de commencer à repérer les puits où des hybridomes se développent. Un changement de

milieu peut être nécessaire au bout de six à sept jours par aspiration du milieu contenu dans les puits à la pipette Pasteur, en prenant garde de ne pas aspirer jusqu'au fond.

A J+10, il faut procéder aux premiers tests ELISA (cf. §13.1) de sélection des hybridomes (il faut bien prendre soin de ne pas avoir changé le milieu depuis au moins trois jours). Ce test permet de déterminer la qualité de la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée avec ou sans fer. Les hybridomes producteurs des Ac recherchés seront alors clonés.

12.2. Clonage

Le clonage a pour but d'obtenir un hybridome producteur d'Ac à partir d'une seule cellule. Deux types de techniques ont été utilisées :

- la dilution limite : des dilutions successives au ½ sont réalisées dans les colonnes d'une plaque P96. Dans tous les puits, 100 µl de milieu complet sont déposés. Dans la première colonne, 100 µl de suspension cellulaire sont ajoutés dans chaque puits. 100 µl de ce mélange sont transférés dans la seconde colonne et ainsi de suite.
- Il est réalisé en agar noble 3%. Ce dernier est préparé dans de l'eau distillée. L'ensemble n'est pas mélangé mais est autoclavé 30 minutes sous ½ atmosphère. Après stérilisation, l'agar est stocké à 4°C. La préparation de ce clonage se fait en deux étapes :

12.2.1. Dépôt de la couche nourricière

Ce type de clonage nécessite la préparation de 2 couches superposées. La couche inférieure va aider au développement des clones car elle contient des macrophages intrapéritonéaux, de l'interleukine 6 (IL-6) et de l'hybridokine qui est un facteur de croissance pour les hybridomes (Interchim, France). Cette étape doit se faire au moins 24 heures avant le clonage en plaque P6. Les volumes donnés ci-après sont suffisants pour préparer 10 plaques. L'agar noble est chauffé à 200-250°C jusqu'à solubilisation, puis le flacon est mis dans un

bain-marie à 44°C. Parallèlement 200 ml de milieu complet sont préparés et enrichis en IL-6 (0,04%) et hybridokine (2,5%), et placés également à 44°C. Quand les deux préparations sont bien à la température du bain-marie, 50 ml d'agar 3% sont ajoutés au milieu complet, ainsi que 8 millions de macrophages préalablement décongelés. 4 ml de ce milieu sont distribués dans les puits des plaques de culture, le stockage est réalisé dans l'incubateur à 5% de CO₂ après solidification du milieu de culture.

12.2.2. Dépôt de la couche de clonage

L'agar noble est mis à fondre à 200-250°C, puis placé à 44°C dans un bain-marie. Parallèlement 24 ml de milieu complet sont préparés et placés à 44°C. Quand les deux préparations sont à la même température, 6,5 ml d'agar sont ajoutés au milieu complet.

Par puits de P96 sélectionné, 3 dilutions correspondant à 1/10, 1/100 et 1/1000 sont préparées dans des cryotubes. Dans chaque tube 450 µl de milieu conditionné sont distribués. Dans le premier tube, 50 µl du contenu du puits à cloner sont ajoutés. Après avoir bien homogénéisé le tout, des dilutions en cascade sont réalisées dans les autres tubes. 500 µl de milieu complet contenant l'agar sont ajoutés dans les tubes, l'ensemble est bien homogénéisé et versé dans le puits de la plaque P6. Après solidification, les plaques sont mises 10 jours dans l'incubateur à CO₂.

Le reste de chaque puits de P96 est mis dans un puits de P24 contenant 500 µl de milieu conditionné. Au bout d'une semaine, 1 ml de milieu conditionné est ajouté et ces cultures sont entretenues jusqu'à sélection définitive des clones.

12.2.3. Repiquage des clones

Au bout de 10 jours, les colonies les plus isolées les unes des autres sont prélevées, sur fond noir, à l'aide d'une pipette Pasteur et transférées dans un puits de P24 contenant 500 µl de milieu conditionné. L'ensemble est laissé 24 heures dans l'incubateur à CO₂. Les puits reçoivent 1 ml de milieu complet et les clones sont dissociés par aspiration-refoulement.

Après une semaine de culture, les surnageants de culture des clones sont testés en test ELISA pour la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée avec ou sans fer. Les puits retenus sont à nouveau clonés. A l'issu du repiquage, les tests ELISA de réactions croisées sont effectués et l'isotype des Ac est déterminé (cf. § 13.2).

13. Sélection des anticorps produits

13.1. Méthode ELISA

Le fond des puits d'une plaque ELISA est tapissé avec l'antigène à détecter, une nuit à 4°C (50 µl d'antigène / puits). Les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS (sans Ca²⁺, ni Mg²⁺) contenant 0,05 % de tween 20. Les sites non spécifiques sont saturés par ajout dans chaque puits de 150 µl de PBS contenant 1 % de BSA et incubation 90 minutes à 37°C. Les plaques sont lavées 3 fois et le surnageant de culture est ajouté, 50 µl / puits, et incubé 60 minutes à 37°C. Après 3 lavages l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase à une dilution de 1/50000 est ajouté, 50 µl / puits, et incubé 60 minutes à 37°C. Les plaques sont lavées 3 fois et le substrat de l'enzyme, l'*o*-Phenylenediamine Dihydrochloride (SIGMA FAST OPD), est ajouté (50 µl / puits). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la réaction est stoppée par ajout de 50 µl de H₂SO₄ 3M. La lecture se fait à 492 nm.

13.2. Détermination de l'isotype des anticorps produits

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer l'isotype des anticorps produits :

- **Test de Coombs indirect ou d'inhibition de l'hémagglutination** : ce test utilise des globules rouges de moutons sensibilisés avec des Ac dirigés contre un isotype. Il y aura formation d'un réseau tridimensionnel observable sous la forme d'un voile si l'isotype est reconnu. Sinon les globules rouges sédimentent au fond du puits.

- Test de type capture ELISA : les anticorps dirigés contre un isotype servent à tapisser le fond de puits de plaque de culture à 96 puits. Le reste du test suit ensuite le protocole du test ELISA. Un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase servira d'anticorps secondaire.

13.3. Détection des réactions croisées

Les anticorps produits sont testés quant à leur capacité à détecter *Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée avec ou sans fer.

Les bactéries sont cultivées, lavées dans du PBS, sont déposées 12 heures avant le test dans les puits de plaques ELISA. Les bactéries sontensemencées avec une $DO_{620\text{ nm}}=1$, une souche par colonne. Le test suit ensuite le protocole décrit dans le paragraphe 13.1.

Les anticorps monoclonaux sont testés, du point de vue de leur spécificité de reconnaissance d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, par méthode ELISA.

Ce test est réalisé sur un ensemble de 27 souches bactériennes. Le Tableau 2 présente pour les souches dérivées d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 ou taxonomiquement proches de cette dernière. Malgré leur similitude, toutes les souches présentent certaines différences génotypiques. L'étude de ces modifications pourrait nous permettre d'approcher l'origine du déterminant plasmidien impliqué dans l'expression d'Ag reconnu par les Acms :

- *Alcaligenes eutrophus* CH34 (sauvage) avec les plasmides pMOL28 et pMOL30 non modifiés,
- *A. eutrophus* CH34 AE43 (*cnr*⁻) qui possède le plasmide pMOL30 et une délétion de pMOL28 appelée pMOL28 Δ 43,
- *A. eutrophus* CH34 AE81 (*leu-27*, *met-81*, *trpE50*) possède les plasmides pMOL28 et pMOL30,
- *A. eutrophus* CH34 AE104 souche sans plasmides,

- *A. eutrophus* CH34 AE126 souche possédant pMOL28,
- *A. eutrophus* CH34 AE128 souche possédant pMOL30,
- *A. eutrophus* CH34 AE176 (*lys-176*) souche possédant pMOL28,
- *A. eutrophus* CH34 AE194 (*lys-194*) souche possédant pMOL30,
- *A. eutrophus* CH34 AE229 (*nal-110, phe-42*) souche sans plasmide,
- *A. eutrophus* CH34 AE245 (*aut-3, his-245, met-79*) possédant le plasmide pMOL50 : dérivé de pMOL28 ayant acquis une insertion de ± 50 kb et capable de se transférer à haute fréquence,
- *A. eutrophus* AS2 souche possédant les plasmides pMOL28-2 (*cnr⁺*) et pMOL30-2 (*czc⁺*), souche isolée au Congo (région de Likasi) dans une usine de déchets métallurgiques riches en cuivre et cobalt,
- *A. eutrophus* AS39 qui possède les plasmides pMOL28-39 (*cnr⁺*) et pMOL30-39 (*czc⁺*), souche isolée au Congo (région de Likasi) comme AS2,
- *A. eutrophus* DS185 qui possède les plasmides pMOL85 (*czc⁺*), pMOL86 et pMOL90. Souche isolée sur le "désert de zinc" : zone désertifiée par des rejets anciens d'oxydes et sulfure de zinc émanant de l'usine métallurgique de Lommel (Belgique),
- *A. eutrophus* SV661 qui possède les plasmides pMOL28-661 (*cnr⁺*) et pMOL30-661 (*czc⁺*). Souche isolée dans les déchets d'une usine métallurgique (Beerse, Belgique).

Les autres souches utilisées ont été sélectionnées dans le souchier du laboratoire car elles peuvent être présentes dans des prélèvements de l'environnement.

Nom de la souche	Référence article	Fournisseur
<i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134 (2,4-D ^r)		Dr. Bauda
<i>Escherichia coli</i> S17/1 (Ni ^r)	*	Dr. Bauda
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> n°1 (Ni ^r et Zn ^r)		Dr. Bauda
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> n°2 (Ni ^r)		Dr. Bauda
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> n°3 (Zn ^r)		Dr. Bauda
<i>Bacillus subtilis</i> **		ATCC 31193
<i>Klebsiella aerogenes</i> **		ATCC 29518
<i>Streptococcus faecalis</i> **		ATCC 7013
<i>Escherichia coli</i> **		ATCC 13281
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **		ATCC17694
<i>Pseudomonas fluorescens</i> **		Institut Pasteur 6329
<i>Alcaligenes faecalis</i> **		ATCC 8748

* Schmidt T. et Schlegel H.G. (1994). Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxydans* 31A. *J. Bacteriol.*, **176**, 7045-7054.

** Ces souches, susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement, proviennent d'un soucier. Leur pureté a été vérifiée par coloration de Gram, tests au KOH, à l'oxydase et à la catalase, ainsi qu'à l'aide de galerie API.

14. Production en masse des anticorps

Le(s) hybridome(s) retenu(s) à l'issue de la sélection sont étendus en flacon de culture 80 cm². 500 µl de suspension cellulaire sont mis en culture dans 35 ml de milieu défini de type PFMH II (Gibco). Quand l'hybridome en culture est confluent, l'ensemble est centrifugé à 1500 X g pendant 5 minutes, le surnageant contenant les anticorps servira à la purification de ces derniers, les cellules sont remises en culture.

15. Protocole de purification des anticorps monoclonaux

Cette phase de purification se fait sur colonne d'affinité à base de protéine G de type Ultralink™ Immobilized Protein G (Pierce, Rockford, Il.). La colonne est préalablement lavée avec 30 ml de tampon de fixation (Pierce), puis équilibrée avec 50 ml de ce même tampon. L'échantillon est dilué au 1/2 dans la tampon de fixation, puis l'ensemble est déposé sur la colonne. Après passage de l'échantillon, la colonne est lavée avec 100 ml de tampon de fixation. L'élution se fait par ajout de 30 ml de tampon d'élution (Pierce) qui va baisser le pH aux alentours de 3 ce qui favorise le décrochement des Ac. Des aliquots de 1 ml sont faits et le pH est immédiatement remonté par ajout de 100 µl de Tris 1M (pH 7,5). L'élution est suivie en spectrophotométrie à 280 nm. La colonne est régénérée avec 50 ml de tampon d'élution, et un nouvel échantillon peut être déposé. Le stockage de la colonne se fait à 4°C.

Tableau 2 : Caractéristiques génotypiques des souches dérivées d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 (fournies par M. Mergeay) utilisées pour étudier les réactions croisées des Acms.

Souches <i>Alcaligenes eutrophus</i>	Marqueurs chromosomiques	Plasmides et marqueurs pertinents	Référence bibliographique
CH34 (sauvage)		pMOL28 (<i>chr</i> ⁺ , <i>cnr</i> ⁺ , IS1086, <i>mer</i> ⁺ , <i>repA28</i> , 180 kb) pMOL30 (<i>cop</i> ⁺ , <i>czc</i> ⁺ , <i>mer</i> ⁺ , <i>pbr</i> ⁺ , 240 kb)	Mergeay <i>et al.</i> (1978)
AE43		pMOL28Δ43 (<i>chr</i> ⁺ , <i>mer</i> ⁺ , TI ⁺ , <i>cnr</i> ⁻) pMOL30 (<i>czc</i> ⁺) - Zn ^R	
AE81	<i>leu-27</i> ; <i>met-81</i> ; <i>trpE50</i>	pMOL28 (<i>cnr</i> ⁺) - Ni ^R pMOL30 (<i>czc</i> ⁺) - Zn ^R	Mergeay <i>et al.</i> (1985)
AE104		Aucun	Mergeay <i>et al.</i> (1985)
AE126		pMOL28 (<i>cnr</i> ⁺) - Ni ^R	Mergeay <i>et al.</i> (1985)
AE128		pMOL30 (<i>czc</i> ⁺) - Zn ^R	Mergeay <i>et al.</i> (1985)
AE176	<i>lys-176</i>	pMOL28 (<i>cnr</i> ⁺) - Ni ^R	Mergeay <i>et al.</i> (1985)
AE194	<i>lys-194</i>	pMOL30 (<i>czc</i> ⁺) - Zn ^R	Mergeay <i>et al.</i> (1985)
AE229	<i>nal-110</i> ; <i>phe-42</i>	Aucun	Sadouk et Mergeay (1993)
AE245	<i>aut-3</i> ; <i>his-245</i> ; <i>met-79</i>	pMOL50 (<i>chr</i> ⁺ , <i>cma</i> ⁺ , <i>cnr</i> ⁺ , <i>mer</i> ⁺ , TI ⁺ , Tra ⁺ , 222 kb) - Ni ^R	Sadouk et Mergeay (1993)
AS2		pMOL28-2 (<i>chr</i> ⁺ , <i>cnr</i> ⁺ , <i>mer</i> ⁺ , 180 kb) - Ni ^R pMOL30-2 (<i>czc</i> ⁺ , 240 kb) - Zn ^R	Diels et Mergeay (1990)
AS39		pMOL28-39 (<i>chr</i> ⁺ , <i>cnr</i> ⁺ , <i>mer</i> ⁺ , TI ⁺ , 180 kb) - Ni ^R pMOL30-39 (<i>czc</i> ⁺ , <i>mer</i> ⁺ , 240 kb) - Zn ^R	Diels et Mergeay (1990)
DS185	<i>aut-</i>	pMOL 85 (<i>cop</i> ⁺ , <i>czc</i> ⁺ , Tra ⁺ , 250 kb) pMOL 86 (4 kb) pMOL90 (300 kb)	Diels <i>et al.</i> (1989)
SV661		pMOL28-661 (<i>cnr</i> ⁺ , <i>mer</i> ⁺ , 180 kb) - Ni ^R pMOL30-661 (<i>czc</i> ⁺ , <i>mer</i> ⁺ , 240 kb) - Zn ^R	Diels et Mergeay (1990)

16. Western Blot

Afin d'identifier l'Ag reconnu par les Acms sélectionnés, il est nécessaire de les tester face à l'ensemble des protéines composant la ME. Cette technique va permettre, sous l'effet d'un champ électrique, de transférer les protéines séparées par électrophorèse à partir du gel sur une membrane réceptrice en polyvinylidene difluoride (PVDF) de porosité 0,22 µm (BioRad).

Avant transfert, la membrane de transfert doit être activée. Pour cela elle est plongée quelques secondes dans du méthanol 100% et laissée dans de l'eau ultrapure pour s'équilibrer. La membrane est équilibrée quand elle est facilement submersible. A partir de là, la membrane ne doit plus sécher sous peine d'empêcher un bon transfert des protéines dans les zones sèches.

Après préparation du blot pour le transfert (Figure 13) ce dernier est fait dans un tampon Towbin (Towbin *et al.*, 1979)¹³⁶ dans lequel est ajouté du SDS à une concentration finale de 0,1 %. Il se déroule sous 100 V – 350 mA pendant 1h30 avec réfrigération. Le transfert est réalisé dans un appareil Mini Trans-blot Cell (Bio-Rad).

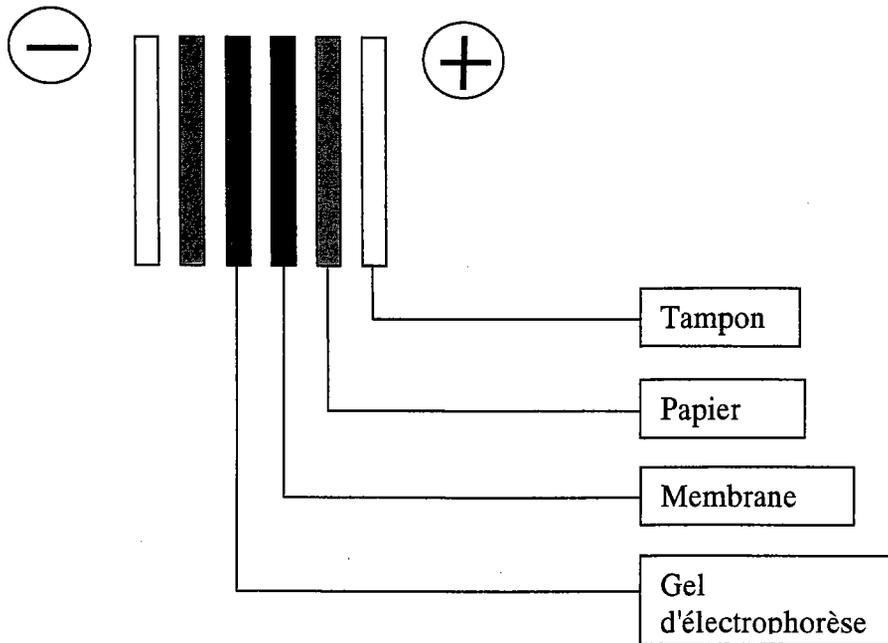


Figure 13 : Schéma de préparation du blot pour le transfert.

Après transfert, la membrane est lavée dans du Tris Buffered Saline (TBS) pendant 10 minutes. Les sites non spécifiques sont bloqués par incubation de la membrane de blotting pendant 2 heures dans du TBS-1 % Tween20. Après trois rinçages dans du TTBS (TBS-0,05 % Tween 20) de 5 minutes chacun, la membrane est incubée en présence de l'anticorps à tester pendant 1 heure à 37°C. Après trois rinçages dans du TTBS, la membrane est incubée 1 heure à 37°C en présence de l'anti-IgG couplé à la phosphatase alcaline. La membrane de blotting est rincée trois fois dans du TTBS et deux fois dans du TBS afin d'éliminer le restant de tween 20.

Pour la révélation de l'immunoblot la membrane est incubée, à température ambiante, dans un tampon substrat (Tris 100 mM, pH9,5 contenant 100 mM NaCl et 5 mM MgCl₂) dans lequel sont ajoutés, pour 10 ml final, 66 µl de NBT (0,5 g dans 10 ml de diméthylformamide (DMF) 70%), et après mélange, 33 µl de BCIP (0,5 g dans 10 ml DMF 100%), jusqu'à apparition d'un signal (Blake *et al.*,1984)¹³⁷.

17. Protocole d'immunofluorescence

Un aliquot d'une culture d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 est centrifugé à 3500 Xg pendant 7 minutes. Le culot est lavé deux fois dans du PBS et centrifugé. Il est repris avec 1 ml de formaldéhyde 2% pendant 30 minutes, ce qui permet la fixation des bactéries. Une goutte de cette suspension est ensuite déposée sur une lame à immunofluorescence et laissée à sécher. Les sites non spécifiques de fixation des anticorps sont saturés par trempage de la lame dans du PBS-1% BSA pendant 1 heure à 37°C. Trois lavages de 5 minutes dans du PBS sont effectués et l'anticorps à tester (Acm sélectionné lors de ce travail) est ajouté et laissé en contact pendant 1 heure à 37°C. Trois lavages de 5 minutes dans du PBS sont réalisés et l'anticorps secondaire, Anti fragment Fc des IgG de souris couplé à la FITC, est ajouté et laissé en contact 1 heure à 37°C. La lame est lavée trois fois et lutée. Ensuite, l'observation au microscope à fluorescence peut être faite.

ETUDE EXPERIMENTALE

ETUDE EXPERIMENTALE

Avant de pouvoir immuniser des souris avec des ME d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, il est nécessaire de vérifier la pureté de l'échantillon bactérien de travail et de sélectionner un milieu de culture qui favorisera la production de sidérophore tout en permettant d'avoir une forte biomasse bactérienne. Après avoir fractionné les ME et vérifié leur pureté, une analyse de la composition en protéines de la ME sera réalisée par électrophorèse SDS-PAGE.

1. Vérification de la pureté de la souche

Un ensemble de tests, comme la coloration de Gram, le KOH, le Lana, la culture sur milieux sélectifs, la galerie API 20 NE a été réalisé pour vérifier la pureté de la souche et s'assurer que les ME obtenues ne seront que d'une seule origine.

L'ensemble des résultats (Tableau 3) montre que la bactérie est une souche d'Alcaligenes eutrophus CH34 et que l'échantillon est pur. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par le Laboratoire de Microbiologie du Centre des Sciences de l'Environnement (Metz, 57).

Tableau 3 : Résultats de différents tests réalisés pour l'identification d'*Alcaligenes eutrophus* CH34.

Test réalisé	Résultat
Aspect de la colonie sur milieu TG	Ronde de couleur crème-rosée
Gram	Bâtonnet droit - Négatif
KOH	Positif
Milieu sélectif enrichi en Ni (2 mM) et Zn (2mM)	Développement de colonies
Milieu sélectif enrichi en glucose	Aucun développement
Réduction des nitrates en nitrites	Positif
Formation d'indole à partir de tryptophane	Négatif
Fermentation du glucose	Négatif
Hydrolyse de l'arginine	Négatif
Hydrolyse de l'urée par l'uréase	Négatif
Hydrolyse de l'esculine	Négatif
Hydrolyse de la gélatine	Négatif
Hydrolyse du p-nitro-phényl-βD-galactopyranoside	Négatif
Assimilation du glucose	Négatif
Assimilation de l'arabinose	Négatif
Assimilation du mannose	Négatif
Assimilation du mannitol	Négatif
Assimilation du N-acétyl-glucosamine	Négatif
Assimilation du maltose	Négatif
Assimilation du gluconate	Positif
Assimilation du caprate	Positif
Assimilation de l'adipate	Positif
Assimilation du malate	Positif
Assimilation du citrate	Négatif
Assimilation du phényl-acétate	Négatif

2. Suivi de la croissance bactérienne - Essais préliminaires -

Choix du milieu de culture

Les protéines impliquées dans le mécanisme de transport du fer chez *Alcaligenes eutrophus* CH34 devant servir pour obtenir des anticorps dirigés contre celles-ci, il était nécessaire de sélectionner un milieu de culture, dérivé du milieu TG, qui induisait leur surexpression, cette dernière étant évaluée indirectement par une augmentation de la production de sidérophore.

2.1. Première sélection

Afin de déterminer le meilleur compromis entre la production de la biomasse bactérienne et celle de sidérophore, quatre conditions de culture ont été testées :

- ➔ milieu TG complet, appelé complet (+Fe/+SL7),
- ➔ milieu TG sans ajout de fer, appelé -Fe / +SL7,
- ➔ milieu TG avec ajout de fer mais sans ajout de la solution SL7, appelé +Fe/-SL7,
- ➔ milieu TG sans ajout de fer, ni de solution SL7, appelé -Fe/-SL7.

Pour ces quatre milieux de culture, le suivi de la croissance bactérienne a été réalisé par lecture de la D.O. des échantillons à 620 nm (Figure 14). Chaque prise d'échantillon a été réalisée en triplicat et l'écart-type est reporté sur la figure correspondante.

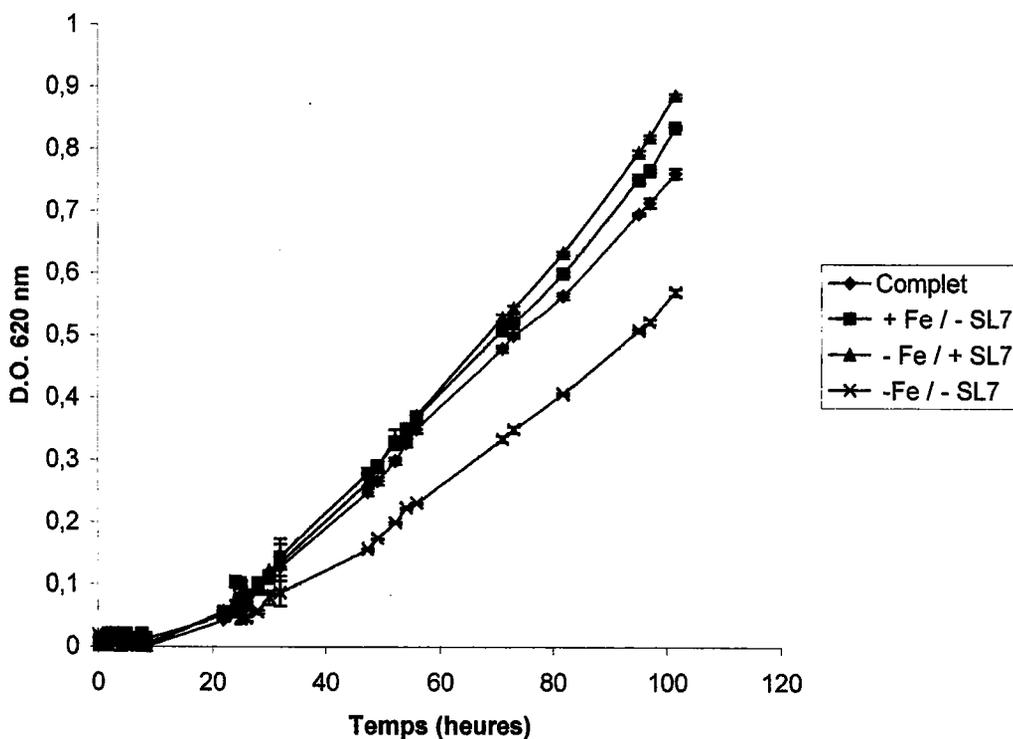


Figure 14 : Suivi de la croissance d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 en fonction du temps et de la composition du milieu de culture.

A l'issue de ce suivi de croissance, deux groupes de milieux de culture peuvent être distingués : le développement bactérien dans les milieux "complet", "-Fe/+SL7" et "+Fe/-SL7" ne présente pas, après de 100 heures de culture, de grande différences. Les absorbances finales sont de 0,760, 0,886 et 0,834 respectivement. Par contre, la croissance dans le milieu "-Fe/-SL7" est très inférieure au groupe précédent avec une différence comprise entre 25 et 35% selon le milieu avec lequel la comparaison est faite. Ce milieu n'a pas été retenu pour le reste de l'étude. La phase de latence d'environ 10 heures peut être due à l'adaptation de la bactéries au milieu TG qui est un milieu minéral minimum.

Parallèlement à l'étude précédente, le suivi de la production de sidérophore a été réalisé par l'intermédiaire du test au Chrome Azurol S, ou test CAS, par lecture de la D.O. à 630 nm sur le surnageant de culture (Figure 15).

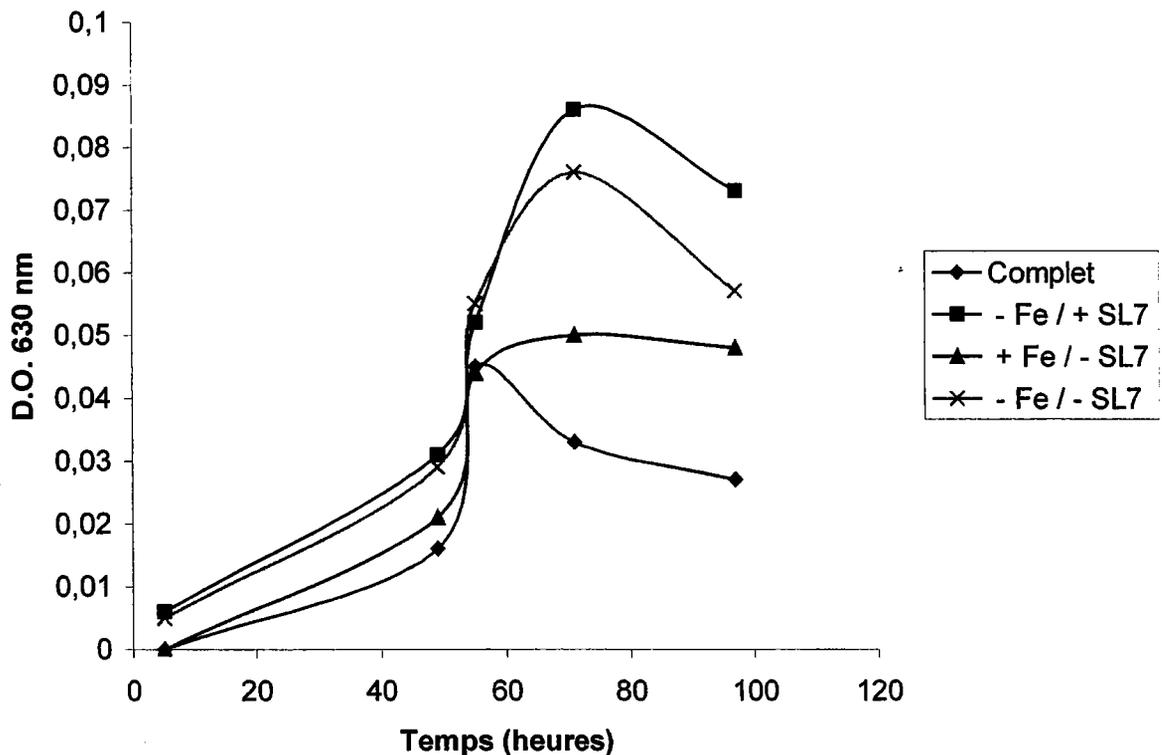


Figure 15 : Suivi de la production de sidérophore par l'utilisation du test CAS.

Parmi les trois milieux de culture sélectionnés précédemment, le milieu "-Fe/+SL7" présente la meilleure production de sidérophores. Cette dernière est 50% plus importante par rapport aux milieux "+Fe/-SL7" et 60% par rapport au milieu "complet". De plus, cette production est maximale au bout de 72 heures dans tous les cas. C'est donc ce temps de culture qui a été retenu pour le reste de l'étude.

Le suivi de la croissance bactérienne nous a permis de sélectionner trois milieux de culture : "complet", "-Fe/+SL7" et "+Fe/+SL7", mais seulement deux milieux "-Fe/+SL7" et "-Fe/-SL7" ont été retenus après suivi de la production de sidérophore.

A l'issue de ces essais préliminaires, le milieu "-Fe/+SL7" semble présenter le meilleur compromis entre croissance bactérienne et production de sidérophore. Le temps de culture pour le reste de ce travail sera fixé à 72 heures .Cependant, ces résultats demandent à être confirmés.

2.2. Deuxième sélection

Afin de confirmer les résultats précédents, une deuxième sélection était nécessaire. Pour cela, les milieux étudiés furent :

- ➔ milieu -Fe/+SL7 sélectionné lors de la première étude,
- ➔ milieu TG ou "complet",
- ➔ milieu enrichi en fer, contenant deux fois la concentration normale en fer soit 0,0096 g/l, appelé 2xFe/+SL7.

Si les deux premiers milieux de culture ont déjà été étudiés, le milieu enrichi en fer permet de vérifier si c'était bien l'absence de fer qui induit la production de sidérophore. Le suivi de croissance d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 s'est fait sur une période de 72 heures (Figure 16).

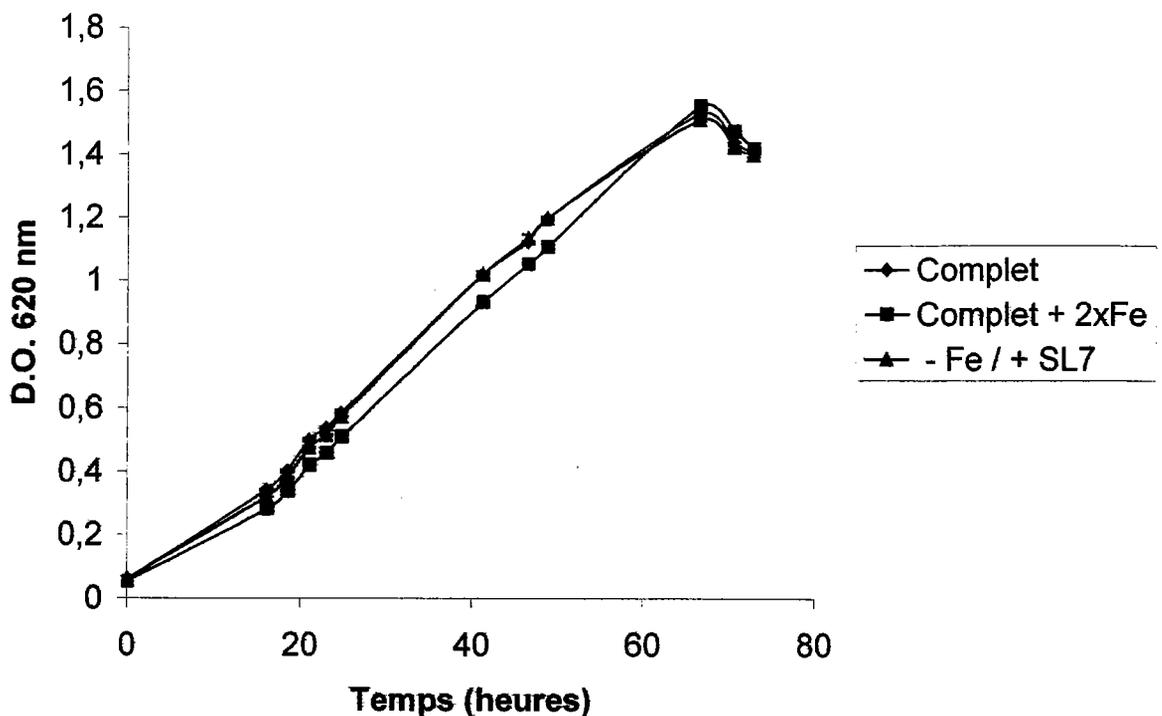


Figure 16 : Suivi de la croissance d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 en fonction du temps et de la composition du milieu de culture.

La croissance bactérienne dans les trois milieux est similaire, ce qui confirme les résultats déjà obtenus. Cependant, le développement bactérien est plus important et plus rapide, par rapport à la première sélection, car la D.O. en fin de croissance est de 1,4 contre 0,9. Ceci peut s'expliquer par le fait que le premier prélèvement a eu lieu au bout de 16 heures de croissance ce qui a permis à la biomasse de bien se développer. Par contre, lors des premiers essais, toutes les heures des prélèvements étaient faits, ce qui a entraîné un arrêt de l'agitation et l'altération de l'homogénéité du milieu. De plus, au bout de 72 heures, comme lors de la première étude sur la production de sidérophores, la croissance atteint son maximum, après quoi il y a dégradation de la biomasse. Même si la cinétique de croissance bactérienne n'est pas identique à celle du premier essai, c'est le même milieu, "-Fe/+SL7", qui peut être retenu.

Le temps de culture de 72 heures, qui paraissait optimal pour la synthèse de sidérophore lors du premier essai préliminaire, l'est aussi pour la croissance bactérienne. Ceci nous permet donc de fixer le temps de croissance pour les cultures menées pour l'obtention des ME.

La phase de latence, observée lors de l'étude précédente, a disparu car les bactéries utilisées lors de la première sélection ont servi à ensemercer les nouveaux erlenmeyers. Très rapidement *Alcaligenes eutrophus* CH34 atteint la phase exponentielle de croissance.

Dans ces conditions de culture, le suivi de la production de sidérophore (Figure 17) a également été réalisé.

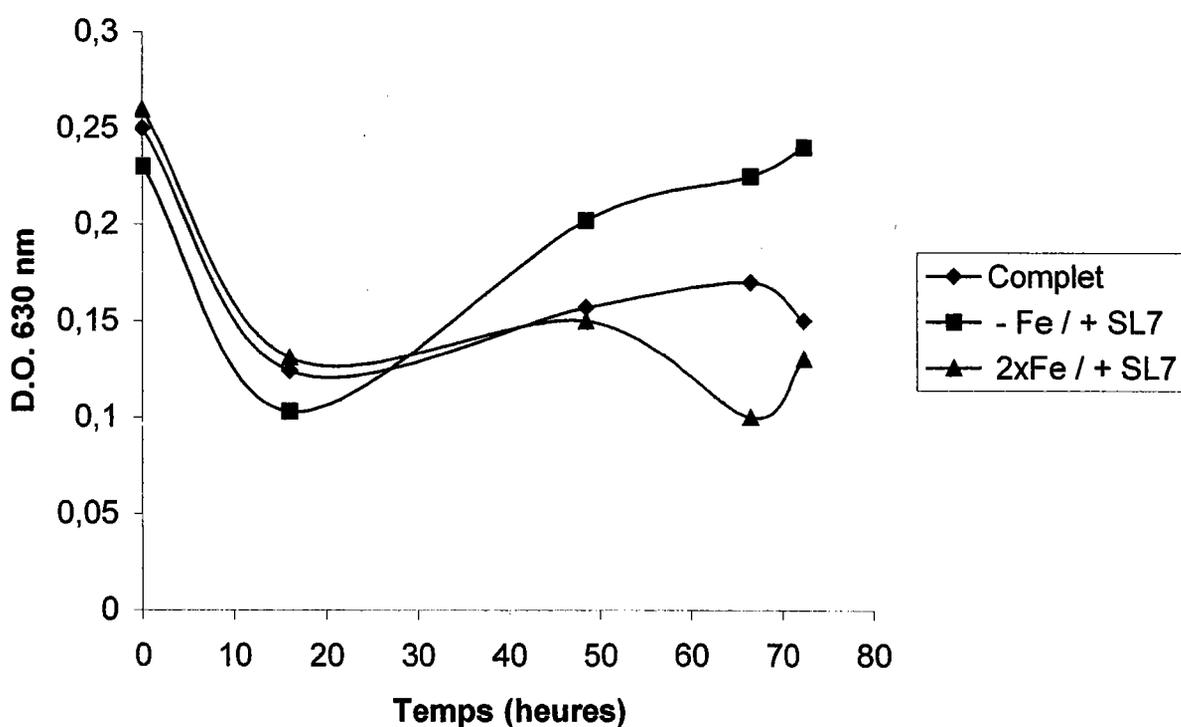


Figure 17 : Suivi de la production de sidérophore par l'utilisation du test CAS..

Si la production de sidérophore dans les trois milieux baisse durant les seize premières heures, dès la fin de la première journée de culture, la synthèse augmente fortement dans le milieu "-Fe/+SL7" et restera supérieure à celles des autres milieux durant toute l'étude. Cette décroissance, dans les premières 16 heures, peut s'expliquer par le fait que les bactéries utilisées pour réensemencer les erlenmeyers de culture provenaient de la culture précédente en milieu complet. Les bactéries vont donc d'abord consommer leur réserve de fer avant d'aller fixer ce dernier dans le milieu environnant. Après cette étape, seules les bactéries issues du milieu carencé en fer vont produire des sidérophores de façon constante.

Ces résultats confirment ceux obtenus lors de la première sélection. De plus, la carence en fer est bien à l'origine de la production de sidérophore chez *Alcaligenes eutrophus* CH34. Parallèlement, des protéines de la ME intervenant dans la prise en charge du complexe fer-sidérophore devraient être surexprimées.

Ces deux tests de sélection du milieu de culture ont permis de retenir pour la suite de ce travail le milieu "-Fe/+SL7". Ce dernier permet le meilleur compromis entre production de la biomasse bactérienne et induction du mécanisme de transport du fer chez Alcaligenes eutrophus CH34. Le temps de culture est également fixé à 72 heures car c'est au bout de cette durée que la biomasse bactérienne est maximale et que la production de sidérophore est forte, dans nos conditions de culture.

Après avoir montré qu'un milieu carencé en fer induisait la production de sidérophore chez *Alcaligenes eutrophus* CH34, il a été nécessaire de fractionner la membrane externe avant de vérifier par électrophorèse qu'il y avait bien surexpression de protéines, au niveau de cette enveloppe bactérienne, impliquées dans le mécanisme de transport du fer.

3. Vérification de la pureté des membranes externes obtenues

3.1. Protocole expérimental

Après avoir cultivé *Alcaligenes eutrophus* CH34 dans les milieux "-Fe/+SL7" et "2xFe/+SL7" pendant 72 heures, les bactéries sont sédimentées à 3500 Xg pendant 7 minutes et lavées dans du PBS. La ME et les muréinoplastes (bactéries sans ME) ont été obtenus en induisant un choc osmotique dans une solution de sucrose 0,5 M suivi d'ultracentrifugations. La méthode utilisée est résumée dans la Figure 18.

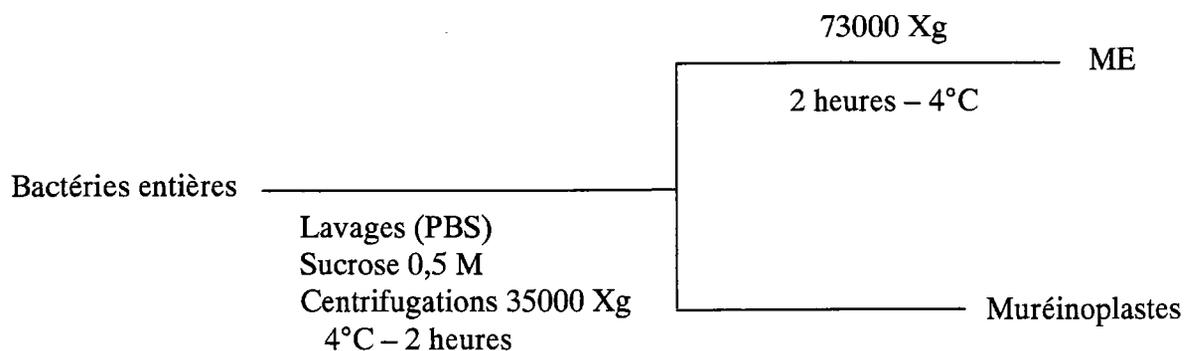


Figure 18 : Résumé de la méthode d'obtention de la membrane externe, d'après Falla et al. (1988)⁸¹.

3.2. Résultats et discussion

Des marqueurs spécifiques, K.D.O. pour la ME et S.D.H. pour la MC contenue dans les muréinoplastes, ont été dosés afin de déterminer le rendement de fractionnement et la pureté des ME obtenues. Des marqueurs non spécifiques ont également été utilisés comme le poids sec ou les protéines totales afin d'éviter de surcharger les gels d'électrophorèse qui seront réalisés.

Tableau 4 : Concentration des marqueurs (mg/mg de poids sec pour K.D.O. et les protéines, unités/mg de poids sec pour S.D.H.) dans la membrane externe et les muréinoplastes d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée avec ou sans fer.

Croissance	Structures	Protéines mg/mg de poids sec	SDH unités/mg de poids sec	KDO mg/mg de poids sec
Sans fer	Membrane externe	0,020 ± 0,001	0	0,095 ± 0,003
	Muréinoplastes	0.166 ± 0,002	0,032 ± 0,002	0,009 ± 10 ⁻⁴
Avec fer	Membrane externe	0.025 ± 0,001	0	0,106 ± 0,005
	Muréinoplastes	0.147 ± 0,001	0,028 ± 0,003	0,013 ± 2.10 ⁻⁴

Les résultats présentés dans le Tableau 4 montrent que le K.D.O. est mesuré dans les deux structures (ME et muréinoplastes), mais dans les muréinoplastes la concentration de ce marqueur est 10,5 et 8 fois inférieure à celle obtenue pour la ME. Falla *et al.* (1988)⁸¹ chez *Pseudomonas fluorescens*, Booth et Curtis (1977)¹³⁸ chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ont montré des résultats similaires en utilisant des chocs osmotiques en solution de sucre. Yamato *et al.* (1975)⁷⁸ ont également trouvé une forte différence dans la concentration en K.D.O., qui était 20 fois supérieure dans la ME par rapport aux muréinoplastes chez *Escherichia coli*, en utilisant la presse de French et du lysozyme.

L'activité de la S.D.H. a seulement été mesurée dans les muréinoplastes qui contiennent la MC. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Falla *et al.* (1988)⁸¹ chez *Pseudomonas fluorescens*. Cependant, Fox *et al.* (1970)¹³⁹ ont mesuré une activité

S.D.H. d'environ 15% dans la fraction ME chez *Escherichia coli* K12 en utilisant un choc osmotique dans une solution de sucrose 0,5 M. D'autres auteurs comme Booth et Curtis (1977)¹³⁸, Miura et Mizushima (1969)¹⁴⁰ et Hancock et Nikaido (1978)¹⁴¹, ont dosé une faible activité S.D.H. dans les fractions de ME obtenues chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* K12 en utilisant le lysozyme et des centrifugations.

Les résultats obtenus montrent que la ME d'Alcaligenes eutrophus CH34 a été obtenue avec un bon rendement (≥ 90% par rapport aux valeurs du K.D.O.) et sans contamination par la MC.

4. Etude de la composition en protéines de la membrane externe d'Alcaligenes eutrophus CH34 par électrophorèse SDS-PAGE.

Après avoir fractionné et purifié des ME d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, il était nécessaire de vérifier si l'augmentation de la production de sidérophore, observée lors de la sélection du milieu de culture, s'accompagnait de la surexpression de protéines au niveau de cette enveloppe bactérienne.

La technique mise en œuvre fut l'électrophorèse SDS-PAGE. Différents essais ont été réalisés afin de sélectionner le type de coloration utilisé entre le bleu de Coomassie et l'argent. Dans tous les cas, les deux types de membranes, obtenues à partir de bactéries cultivées avec ou sans fer, ont été utilisés afin de comparer leur profil électrophorétique.

4.1. Coloration au bleu de Coomassie

De nombreux tests ont été menés afin d'optimiser cette coloration. Les paramètres étudiés sont :

- ➔ La concentration en protéines de l'échantillon variant de 5 à 20 $\mu\text{g/ml}$
- ➔ Le volume déposé dans les puits d'électrophorèse allant de 10 à 35 μl
- ➔ Le temps de migration de 40 à 45 minutes

A l'issu de ces essais, les conditions optimum sont les suivantes :

- ➔ Une concentration en protéines de l'échantillon de 20 $\mu\text{g/ml}$
- ➔ 25 μl d'échantillon déposé dans les puits d'électrophorèse
- ➔ 43 minutes de migration
- ➔ Chauffage des échantillons à 100°C pendant 5 minutes en présence de 2% de SDS.

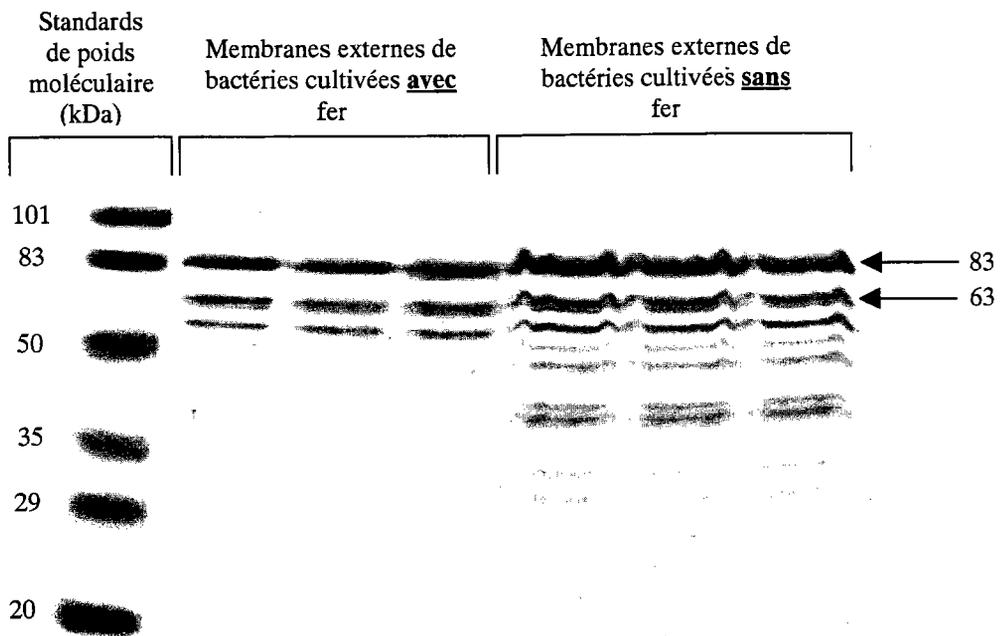


Figure 19 : Profils électrophorétiques, de membranes externes de bactéries cultivées avec ou sans fer, obtenus après coloration au bleu de Coomassie. Les échantillons ont été chauffés 5 minutes à 100°C. Les dépôts ont été réalisés en triplicat.

La Figure 19 présente un gel obtenu dans les conditions retenues préalablement. Il est à noter que les profils électrophorétiques obtenus sont incomplets puisque les bandes protéiques de poids moléculaires inférieur à 50 kDa n'apparaissent que très faiblement lorsqu'elles sont visibles. Les profils sont donc difficilement interprétables. De plus, il apparaît des effets de bords indiquant une surcharge des puits d'électrophorèse, il est donc impossible d'augmenter le volume déposé pour améliorer la résolution des gels.

Cependant, il semble que, dans le cas des membranes de bactéries cultivées en absence de fer, les bandes, dont les poids moléculaires sont d'environ 83 et 63 kDa, soient surexprimées par rapport aux ME obtenues en présence de fer. D'autres différences pourraient exister, mais le manque de sensibilité de cette technique ne permet pas de les mettre en évidence

Pour pallier ce problème de sensibilité de gel, une coloration à l'argent est envisagée car cette technique présente une sensibilité de 10 ng, ce qui permet d'améliorer d'un facteur 10 la sensibilité de détection des bandes protéiques.

4.2. Coloration à l'argent

Dans ces nouvelles conditions expérimentales, il a été nécessaire de modifier les paramètres de concentration de l'échantillon en protéines et de volume déposé dans les puits d'électrophorèse. Les différents essais préliminaires les ont fixés respectivement à :

↪ 15 µg/ml

↪ et 20 µl

D'un autre côté il est intéressant de savoir si le chauffage, en présence de SDS, des échantillons a une influence sur l'intégrité des protéines. La Figure 20 et la Figure 21 montrent l'effet de ces deux paramètres.

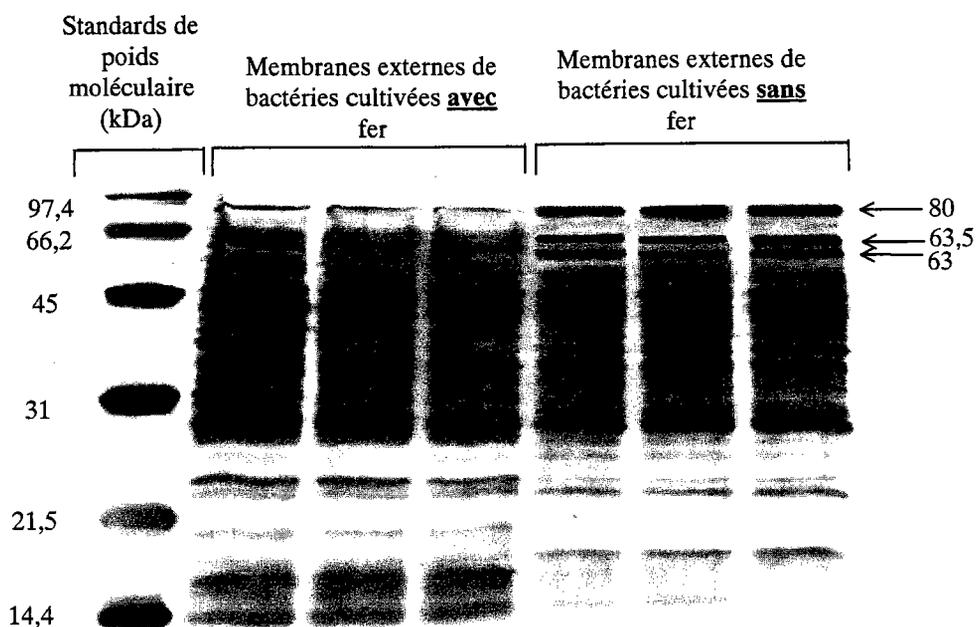


Figure 20 : Profils électrophorétiques obtenus pour des échantillons chauffés pendant 5 minutes en présence de 2% de SDS.

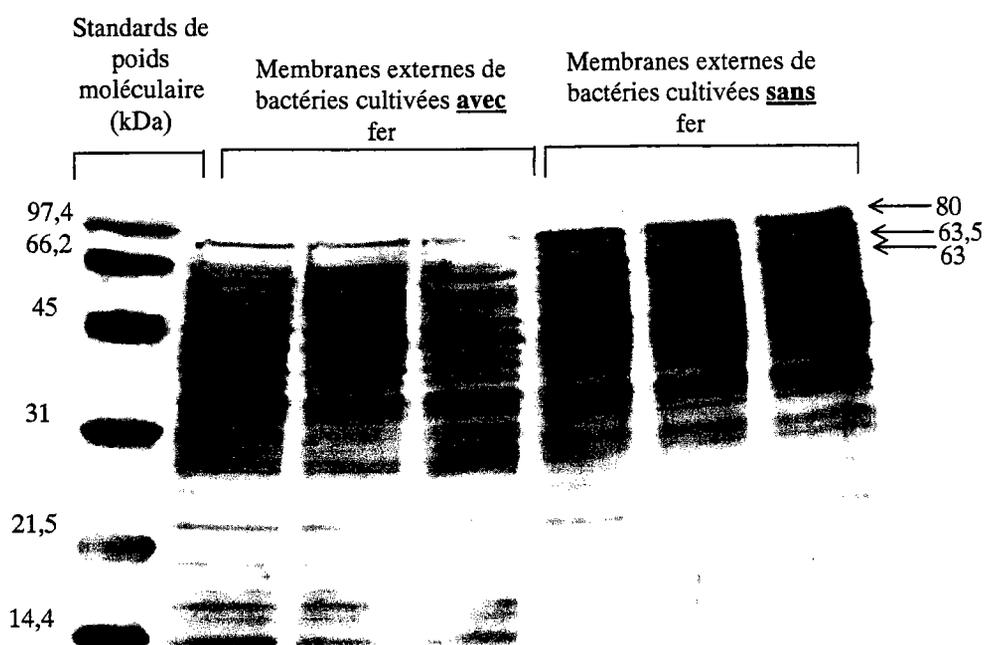


Figure 21 : Profils électrophorétiques obtenus sans chauffage préalable des échantillons.

Que les échantillons soient chauffés ou non, il n'y a pas de différence notable entre les deux types de profils électrophorétiques obtenus. Comme pour la coloration au bleu de Coomassie, les bandes, dont les poids moléculaires sont d'environ 80, 63,5 et 63 kDa, semblent clairement surexprimées lorsque les membranes externes sont obtenues à partir de bactéries cultivées en absence de fer. Gilis *et al.* (1996)³⁹ ont également montré la surexpression de trois protéines de 85,3, 77,8 et 74,5 kDa sur la ME d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. D'autres surexpressions moins évidentes semblent aussi apparaître, mais la simple observation ne permet pas de le confirmer.

Afin de pouvoir avoir une approche semi-quantitative de l'expression des différentes protéines de la membrane externe d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, nous avons effectué un profil de ligne sur les profils électrophorétiques. Cette technique consiste à transformer sous forme d'intensité de gris les bandes obtenues après scanning des gels. Le logiciel Labview™ est utilisé pour réaliser cette transformation. La Figure 22 et la Figure 23 représentent les graphiques obtenus après traitement.

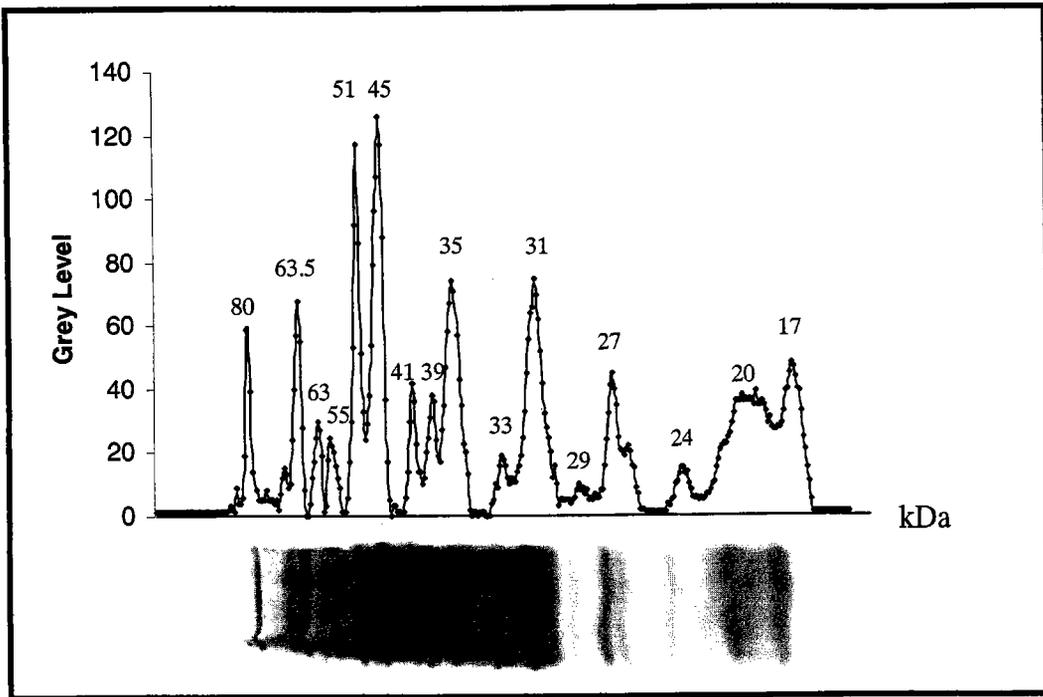


Figure 22 : Profil de ligne obtenu à partir de membranes externes de bactéries cultivées en présence de fer, après chauffage 5 minutes à 100°C.

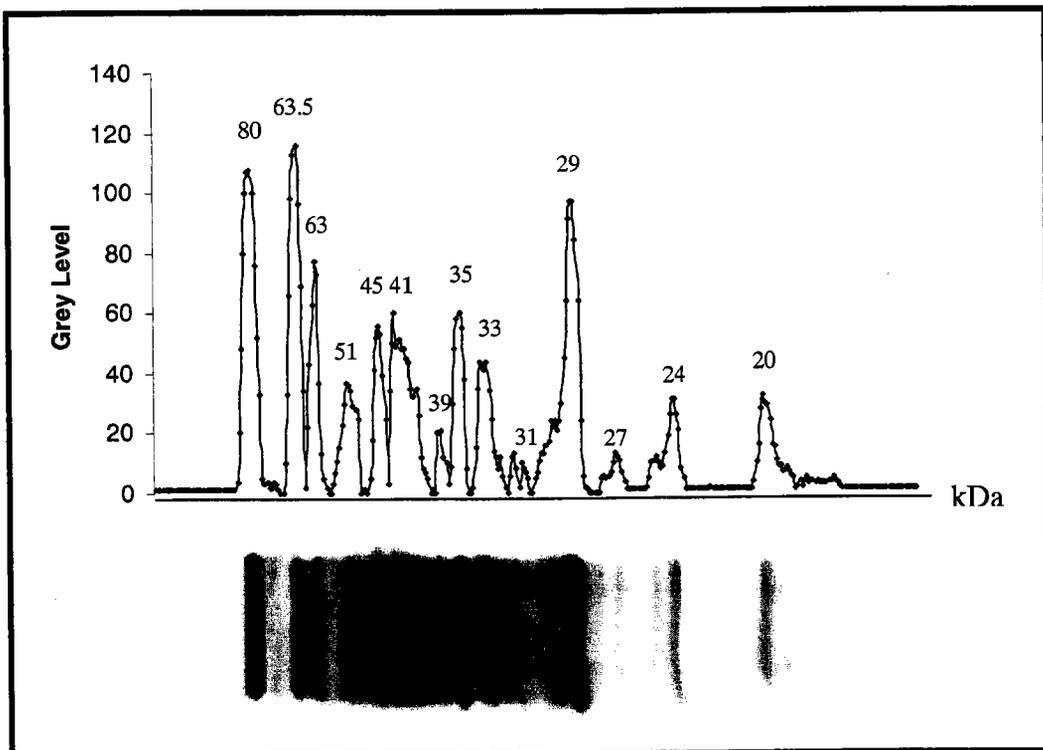


Figure 23 : Profil de ligne obtenu à partir de membranes externes de bactéries cultivées en absence de fer, après chauffage 5 minutes à 100°C.

La carence en fer induit d'importantes modifications dans le profil électrophorétique. Comme le montrent la Figure 22 et la Figure 23, les protéines surexprimées quand la bactérie est cultivée en présence de fer, dont les poids moléculaires sont d'environ 51, 45, 31, 27 et 17 kDa, voient leur synthèse réprimée d'un facteur 3 à 5 dans des conditions de carence en fer. Toutefois, cinq protéines principales de la ME, dont les poids moléculaires sont d'environ 80, 63,5, 63, 41 et 29 kDa, sont surexprimées d'un facteur 2 à 8 en absence de fer. Nos observations mettent en évidence le fait que l'augmentation de la production de sidérophores s'accompagne de la surexpression de certaines protéines de la ME. Ce même phénomène ayant été montré par Crosa (1989)³⁴ ou Reigh et O'Connell (1993)¹⁴² chez *Rhizobium meliloti*.

Si la première protéine surexprimée, d'un poids moléculaire d'environ 80 kDa, en cas de carence en fer a été identifiée par Gilis *et al.* (1996)³⁹ comme étant le récepteur du sidérophore, Alcaligine-E, produit par *Alcaligenes eutrophus* CH34, les autres n'ont jamais été mises en évidence. Ces dernières semblent être des protéines de ME régulées par le fer. Récemment, chez *Bordetella avium*, il a été montré que cinq protéines de ME, dont les poids moléculaires sont de 95, 92, 91,5, 84 et 51 kDa, étaient surexprimées en cas de carence en fer (Connell *et al.*, 1998)¹⁴³. Cette bactérie, comme *Bordetella pertussis*, produit un sidérophore proche d'alcaligine E. Cela vient confirmer notre hypothèse selon laquelle il y a plus de trois protéines de ME impliquées dans le transport du fer, et leurs poids moléculaires sont proches de ceux que nous avons obtenus. Cette interprétation est renforcée par le fait que toutes les bactéries qui sécrètent un ou plusieurs sidérophore(s), produisent trois à six protéines intervenant dans la fixation du complexe fer-sidérophore (Guérinot, 1994)³². Cela signifie qu'une bactérie peut synthétiser différents composés, dont les sidérophores, pour optimiser la fixation du fer comme l'ont décrit par Philson et Llinas (1982)¹⁴⁴ chez *Pseudomonas fluorescens* qui peut produire trois sidérophores différents en cas de carence en fer.

Mais cette étude de la ME vient aussi mettre en évidence le fait que le sidérophore d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, qui a été classé comme phénolate, n'est pas similaire au sidérophore pyochéline produit par *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, ce ne sont pas les mêmes protéines de ME qui sont régulées dans les deux cas :

- ➔ 75 et 14 kDa pour la pyochéline chez *Pseudomonas aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993⁴⁴ ; Sokol et Woods, 1983⁴⁶)
- ➔ 80, 63,5, 63, 41 et 29 kDa dans le cas de notre étude, ou 85,3, 77,8 et 74,5 pour Gilis *et al.* (1996)³⁹

Il semble donc, comme l'avance l'équipe de Gilis, que Alcaligine-E, soit un membre d'un sous-groupe des phénolates. Mais se baser seulement sur les poids moléculaires des protéines intervenant dans ce phénomène n'est pas un élément suffisamment concluant.

Ce travail montre que nous avons bien induit la surexpression de plusieurs protéines de la ME, dont les poids moléculaires sont d'environ 80, 63,5, 63, 41 et 29 kDa, lorsque la bactérie est cultivée en absence de fer. Ces protéines pourraient être impliquées dans le mécanisme de transport du fer chez la bactérie. Ces ME seront utilisées pour l'immunisation de souris dans le but de produire des Acms très spécifiques dirigés contre Alcaligenes eutrophus CH34.

5. Obtention et production d'anticorps monoclonaux anti-

Alcaligenes eutrophus CH34

Nous avons choisi d'utiliser les ME isolées d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 afin de limiter le nombre d'Ac obtenus et améliorer leur spécificité. Si l'ensemble de la bactérie est

injectée à la souris, il est possible d'obtenir des Acms contre d'autres structures que celles de la ME, ces Acms n'étant pas utilisables pour une détection directe *in-situ* de cette bactérie. Deux méthodes de production d'Acms ont été mises en œuvre :

- ➔ la méthode *in vivo* proposée par Köhler et Milstein (1976)⁹², légèrement modifiée, par immunisation de souris
- ➔ une nouvelle méthode développée au laboratoire par immunisation *in vitro* des splénocytes isolés après traitement par un mitogène polyclonal, la Concanavaline A (ConA).

5.1. Premier essai de production d'anticorps monoclonaux par immunisation

in vivo

5.1.1. Protocole d'immunisation

- ➔ 5 injections intrapéritonéales, espacées de 15 jours chacune, de 20 µg d'Ag dilué dans 100 µl AIF. Deux lots de souris ont été utilisés. Le premier reçoit des ME de bactéries cultivées en absence de fer (ME -Fe), le second des bactéries entières cultivées sans fer qui ont été fixées au formaldéhyde 2% et lavées avec du sérum physiologique avant injection.
- ➔ 1 rappel intraveineux avec 20 µg d'Ag dilué dans 50 µl de sérum physiologique

Nous avons testé la réponse spécifique vis-à-vis d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 et le titre en IgG des sérums des souris immunisées, afin de réaliser le rappel sur les souris les mieux répondantes. Cet essai a été réalisé par un dosage ELISA (Tableau 5). Le choix de ces deux types d'immunisation permettait de vérifier si l'immunisation avec des ME favorisait

l'obtention d'Acms présentant une meilleure spécificité par rapport à une immunisation avec la bactérie entière.

Tableau 5 : détermination de la spécificité contre *Alcaligenes eutrophus* CH34 et du titre en IgG, après les cinq immunisations, à partir des sérums des souris.

Antigène	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Souris 6	Souris 7
ME -Fe					1/400000	> 1/1600000 *	1/10000
Bactérie entière	1/12500	1/12500	1/12500	1/12500			

* : souris non retenue car présentant une pelade

■ : souris retenues pour le rappel intraveineux

Le titre en IgG des sérums de souris immunisées avec les ME est très supérieur à celui des souris immunisées avec la bactérie entière, 1/400000 contre 1/12500. Les souris 2 et 5 vont être utilisées pour la suite de la fusion cellulaire, afin de comparer la production d'Acms en terme de concentration et de spécificité en fonction de l'Ag.

5.1.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes

Le protocole de fusion cellulaire a nécessité, tout au long de notre étude, la mise au point de divers paramètres. Tout d'abord, les splénocytes issus de la souris 5 ont subi une centrifugation sur Ficoll afin d'isoler seulement les lymphocytes. La fusion a eu lieu en présence de PEG 4000 (41% dans du RPMI) et le ratio de SP2/O:lymphocytes était de 1:4. L'ensemble de la suspension cellulaire a été répartie dans une plaque de culture 24 puits. Une supplémentation avec de l'OPI (Sigma) - Oxalate, Pyruvate, Insuline - a été amenée dans le milieu afin de remplacer la couche nourricière de macrophages.

Quant à la souris 2, l'ensemble des splénocytes a été fusionné en suivant le protocole ci-dessus et réparti dans 4 plaques de culture 24 puits (P24).

Pour ces deux fusions, la sélection des hybridomes a été faite vis-à-vis de la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 entière cultivée en absence de fer, seuls les hybridomes producteurs d'IgG ont été retenus. Ce screening a été réalisé au bout de 10 jours de culture grâce à un test ELISA. Pour la souris 5 nous avons obtenus 2 puits contenant des IgG spécifiques à partir de la plaque P24, soit un pourcentage de puits positifs de 8,3%. Pour la souris 2, nous avons obtenu 8 puits producteurs d'IgG à partir des 4 plaques P24, soit un pourcentage de puits positifs identiques au cas précédent. Il n'y a donc pas de différence au niveau de l'intensité de la réponse en fonction de l'Ag utilisé.

Les puits retenus ont été clonés par dilution limite en plaque de culture 96 puits (P96). Suite à une contamination par des bactéries, les essais ont du être arrêtés.

5.2. Deuxième essai de production d'anticorps monoclonaux par immunisation *in vivo*

5.2.1. Protocole d'immunisation

→ la souris 7, immunisée avec des ME lors de l'essai précédent et ayant reçu sa dernière injection intrapéritonéale 1 mois plus tôt, reçoit un rappel intraveineux avec 20 µg d'Ag dilué dans 50 µl de sérum physiologique. Nous avons voulu savoir si un plus long délai entre la dernière injection intrapéritonéale et le rappel intraveineux pouvait modifier la qualité de la réponse anticorps.

5.2.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes

La totalité des splénocytes issus de la rate de la souris 7 ont été fusionnés en suivant le même protocole que pour les deux fusions précédentes. L'ensemble des cellules fusionnées a été réparti dans une plaque P24, le milieu de culture étant toujours supplémenté avec de l'OPI.

Après 10 jours de culture, la sélection de puits à cloner s'est faite par la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 entière cultivée en absence de fer. Seuls les puits où des hybridomes producteurs d'IgG sont présents ont été retenus. Pour la souris 7, nous avons obtenu 1 puits positif soit un pourcentage de 4,1%. L'intensité de la réponse obtenue est supérieure d'un facteur 2 par rapport aux premières fusions.

Le puits retenu a été cloné par dilution limite en plaque P96, le reste de la suspension de départ étant conservé en culture en plaque P6. Malgré plusieurs tentatives de clonage, les clones ne se sont pas développés et nous n'avons pas pu continuer avec ce lot de cellules. Cela semble indiquer une instabilité des hybridomes obtenus par ce protocole.

Les problèmes rencontrés lors de ces trois premières fusions, nous ont fait revenir à la méthode plus classique de production d'Acm. L'OPI a été abandonné au profit de la couche nourricière de macrophages intrapéritonéaux et de l'IL-6 sera rajoutée dans le milieu pour favoriser le développement des hybridomes. En effet, cette cytokine a pour rôle principal de favoriser la maturation des lymphocytes B en cellules productrices d'Acs (Bach et Lesavre, 1993)⁸⁵. La quantité d'Ag injectée sera augmentée afin d'améliorer la réponse secondaire du système immunitaire de la souris. Le temps entre la dernière injection intrapéritonéale et le rappel intraveineux restera de 15 jours.

5.3. Troisième essai de production d'anticorps monoclonaux par immunisation *in vivo*

5.3.1. Protocole d'immunisation

Le protocole décrit ci-après, est utilisé dans le département de production d'Acm dirigé par le docteur Yves Lutz à l'I.G.B.M.C. (Illkirch, 67):

➔ Deux souris sont immunisées en parallèle et les deux rates sont poolées.

- ➔ 3 immunisations intrapéritonéales, espacées de 15 jours chacune, avec 200 µg d'Ag dilué dans 500 µl d'AIF.
- ➔ 1 rappel intraveineux, quatre jours avant le sacrifice, avec 20 µg d'Ag dilué dans 100 µl de sérum physiologique.

5.3.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes

Les splénocytes issus des deux souris ont été regroupés et le protocole de fusion suivi est celui donné dans "Matériels et Méthodes". Après fusion, 50 millions de cellules sont répartis dans deux plaques P96 et le reste des cellules fusionnées sont congelées.

Au bout de 10 jours un screening par test ELISA des puits est réalisé. Les critères retenus sont :

- ➔ la production d'IgG,
- ➔ la reconnaissance d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée sans fer,
- ➔ la détection de la protéine d'environ 80 kDa qui a été identifiée comme étant le récepteur du sidérophore produit par la bactérie. Cette protéine a été obtenue par élution dans du PBS de la bande de gel d'électrophorèse contenant cette protéine.

A l'issue de ce test, 6 puits ont été retenus pour le clonage, soit un pourcentage de 3,1 %. Ces puits présentaient, soit une forte détection de la bactérie ou de la protéine (puits 1D3, 1H4, 2C8), ou un compromis entre les deux (1D2, 1B9, 2G8). Les D.O. obtenues à 490 nm pour ces puits sont données dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Valeurs des D.O. obtenues, en ELISA, à 490 nm pour la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée sans fer et de la protéine de 80 kDa pour la sélection des puits à cloner.

	D.O. de détection de la protéine de 80 kDa	D.O. de détection d' <i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée sans fer
Puits 1D2	0,023	0,705
Puits 1D3	0,004	0,816
Puits 1H4	0,075	0,577
Puits 1B9	0,045	0,514
Puits 2C8	0,002	0,723
Puits 2G8	0,061	0,601

La D.O. de détection de la protéine de 80 kDa est très faible par rapport à celle de la bactérie entière (Tableau 6). Ce phénomène peut s'expliquer soit par une concentration trop faible en protéine lors du coatage des plaques ELISA, soit par le fait que ce n'est pas cette protéine qui est reconnue par les Ac.

Les six puits sélectionnés ont subi un premier clonage en agar noble 3%. Le fait de cultiver en milieu solide, permet d'isoler directement les clones les uns des autres sans avoir à réaliser les nombreuses observations des plaques de culture du clonage en dilution limite. Sur les 48 clones cultivés, 6 ont été sélectionnés. Ces derniers sont tous issus du puits 2G8, qui présentait le meilleur compromis entre les deux détections envisagées. L'intensité de détection est très variable d'un clone à l'autre. Si l'intensité de détection de la protéine de 80 kDa est toujours aussi faible, celle de la détection de la bactérie est moins importante en général en comparaison avec les valeurs du puits de départ (Tableau 7).

Tableau 7 : Valeurs des D.O. obtenues, en ELISA, à 490 nm pour la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée sans fer et de la protéine de 80 kDa pour la sélection des clones après clonage en agar noble 3%.

	D.O. de détection de la protéine de 80 kDa	D.O. de détection d' <i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée sans fer
Clone 2G8/A2	0,194	0,430
Clone 2G8/A6	0,047	0,337
Clone 2G8/B5	0,065	0,318
Clone 2G8/B6	0,068	0,630
Clone 2G8/C1	0,038	0,482
Clone 2G8/C2	0,052	0,429

Pour les autres clones, les Ac produits avaient perdu la caractéristique de détection de la protéine de 80 kDa, confortant notre hypothèse que ce n'est pas cette protéine qui est reconnue par les Acms.

Pour s'assurer que les caractéristiques des anticorps produits par les six clones sélectionnés ne se perdent pas avec les repiquages, ces hybridomes subissent un second clonage en agar noble 3%. Cela va aussi permettre d'établir la lignée.

55 clones résultent de cette manipulation et après sélection (ELISA), 11 clones sont conservés:

- 2G8/A2-10
- 2G8/A2-11
- 2G8/B5-7
- 2G8/B5-9
- 2G8/B6-1
- 2G8/B6-7
- 2G8/B6-9
- 2G8/C1-3
- 2G8/C1-4
- 2G8/C1-5
- 2G8/C1-6

Sur l'ensemble de ces clones, les Ac produits ne détectent plus la protéine de 80 kDa. L'intensité de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 est réduite d'un facteur 1,5 par rapport aux intensités des anticorps produits par les clones issus du premier clonage.

Nous conserverons ces clones et les anticorps qu'ils produisent vont subir différents tests de réactions croisées pour ne retenir que les clones produisant des anticorps spécifiques de la bactérie. L'isotypage, par capture-ELISA, de ces derniers sera aussi réalisé.

5.3.3. Isotypage et spécificité des anticorps obtenus

5.3.3.1. Isotypage des anticorps obtenus

L'ensemble des Ac a été isotypé à l'aide d'un test de capture-ELISA. Tous les isotypes ont été testés et tous les Ac produits sont d'isotype IgG1.

5.3.3.2. Spécificité des anticorps obtenus

La sélection finale des hybridomes producteurs s'est faite sur la capacité des Ac à reconnaître spécifiquement *Alcaligenes eutrophus* CH34. Pour cela, deux types de screening ont été réalisés :

- ➔ réactions croisées avec des souches proches d'*Alcaligenes eutrophus* CH34
- ➔ réactions croisées avec des souches bactériennes ubiquistes dans l'environnement.

Nous avons commencé par tester des souches dérivées ou proches d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 (Tableau 8). Il s'agit de souches privées d'un ou des deux plasmides pMOL28 et pMOL30, d'autres souches du genre *Alcaligenes* ou de souches bactériennes portant des résistances proches de notre bactérie. Toutes les souches ont été cultivées en présence et en absence de fer, **un résultats négatif dans le tableau signifie que dans les deux conditions de culture, il n'y a aucune détection par les anticorps produits.**

A l'issue de ce test de spécificité, nous pouvons donc différencier :

- ➔ un groupe de 3 Acms qui ne détectent que *Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivées en absence ou en présence de fer. Ce sont les anticorps produits par les clones B5-7, B5-9 et B6-7.
- ➔ le reste des Acms testés détectent bien *Alcaligenes eutrophus* CH34, mais présentent une réaction croisée avec *Escherichia coli* S17/1, souche résistante au Ni, ces clones ne sont donc pas retenus.

Dans les deux groupes, l'intensité de la détection de la bactérie cultivée en présence de fer est trois fois inférieure à celle de la souche cultivée en absence de fer. Cela suggère que l'antigène de ME reconnu par les anticorps est impliqué dans le mécanisme de transport du fer. De plus, le fait de ne pas détecter *Alcaligenes eutrophus* CH34 AE126 et AE128 montre que la présence des deux mégaplasmides de résistances est nécessaire à l'expression de l'antigène reconnu. Cela semble être donc la première preuve d'une interaction forte entre le transport du fer et l'efflux de cations chez *Alcaligenes eutrophus* CH34.

Bacillus subtilis, bactérie à Gram (+) et témoin négatif interne du test, n'est pas détecté, ce qui valide les résultats obtenus.

Tableau 8 : Spécificité comparée des anticorps monoclonaux retenus vis-à-vis de souches proches ou dérivées d'*Alcaligenes eutrophus* CH34.

Souche	Résistances aux métaux lourds ^a			Plasmides	Référence du clone / Résultat ELISA										
	Ni	Cd	Zn		A2-10	A2-11	B5/7	B5/9	B6/1	B6/7	B6/9	C1/3	C1/4	C1/5	C1/6
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 (autre laboratoire)	r	r	r	pMOL28 pMOL30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Alcaligenes eutrophus</i> 104	s	s	s	aucun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> 126	r	s	s	pMOL28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> 128	s	r	r	pMOL30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP 134				pJP4 (2,4-D resistance)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S17/1	r	s	s	pTV1	+++	+++	-	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée en absence de fer	r	r	r	pMOL28 pMOL30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	r	r	r		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	r	s	s		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	s	s	r		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>				Témoin négatif	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a r : résistante, s : sensible

- : aucune détection

+ : faible détection

++ : détection moyenne

+++ : forte détection

Après avoir montré la spécificité des Acms retenus, nous avons voulu vérifier que des souches de l'environnement n'étaient pas détectables par ces Acms. Ce test est réalisé dans l'optique d'une détection *in situ* d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. La présence de cette bactérie pourrait révéler une pollution assez importante par des métaux lourds de certains sites, la souche servant donc de bioindicateur. Pour cela des souches, très souvent rencontrées dans l'environnement, ont été sélectionnées. Même si 3 clones nous intéressent, nous avons aussi testé les 8 autres pour valider les résultats obtenus. Le Tableau 9 illustre les résultats obtenus avec ces différentes souches bactériennes, un résultat négatif signifie que quelle que soit la condition de culture (présence ou absence de fer) la souche bactérienne n'est pas détectée.

Tableau 9 : Spécificité comparée des anticorps monoclonaux vis-à-vis de souches bactériennes susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement (souchier du laboratoire).

Souche	Référence du clone / Résultat ELISA										
	A2-10	A2-11	B5-7	B5-9	B6-1	B6-7	B6-9	C1-3	C1-4	C1-5	C1-6
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-			-		-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-			-		-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-			-		-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-			-		-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+++	+++			+++		+++	+++	+++	+++	+++
<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-			-		-	-	-	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	-			-		-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée sans fer	+++	+++			+++		+++	+++	+++	+++	+++
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée avec fer	+	-			+		+	+	+	-	+

- : aucune détection
- + : faible détection
- ++ : détection moyenne
- +++ : forte détection

 : Hybridomes retenus pour la spécificité de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34

Comme l'illustre le Tableau 9, les 8 hybridomes qui n'avaient pas été sélectionnés (A2-10, A2-11, B6-1, B6-9, C1-3, C1-4, C1-5 et C1-6) présentent toujours une réaction croisée avec *Escherichia coli*, même si cette souche est différente du test précédent. Cela semble montrer une détection de toutes les souches du genre *Escherichia coli*. De plus les Acms produits par l'hybridome B6-7 détectent *Klebsiella aerogenes*. Donc, après ce test, deux hybridomes sont retenus, ce sont les clones B5-7 et B5-9. La détection de la bactérie cultivée en présence de fer est à nouveau environ 3 fois inférieure à celle de la bactérie cultivée en absence de fer. Ce résultat vient confirmer l'hypothèse selon laquelle l'antigène reconnu est impliqué dans le mécanisme de transport du fer.

Néanmoins, seul l'hybridome B5-7 sera conservé pour le reste de l'étude car il présente une détection 20% supérieure à celle de l'hybridome B5-9, lequel sera congelé.

5.3.3.3. Vérification de la spécificité de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 par les Acms produits par l'hybridome B5/7

Afin d'étayer les hypothèses faites à la suite des tests de sélection précédents, nous avons étudié les réactions des Acms produits par l'hybridome B5/7 contre des souches dérivées ou taxonomiquement proches d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. Les caractéristiques génotypiques de ces souches sont données dans le Tableau 2.

Le Tableau 10 présente les résultats de la détection des souches par les Acms.

Tableau 10 : Résultats de la détection de souches dérivées ou taxonomiquement proches d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 (fournies par M. Mergeay) et d'autres souches bactériennes par les Acms produits par l'hybridome B5/7

Souches bactérienne	Détection par les Acms
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée en absence de fer (M. Mergeay)	+++
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée en présence de fer (M. Mergeay)	+
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée en absence de fer (I.U.T.)	+++
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée en présence de fer (I.U.T.)	+
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 AE43	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 AE81	+++
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 AE176	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 AE194	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 AE229	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 AE245	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> AS2	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> AS39	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> DS185	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> SV661	-
<i>Salmonella</i> sp.	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-
<i>Escherichia coli</i> K12 Hfr	-

+++ : forte détection
 ++ : détection moyenne
 + : faible détection
 - : aucune détection

Les résultats du Tableau 10 montrent que lorsque *Alcaligenes eutrophus* CH34 est cultivée en absence de fer, sa détection par les Acms produits par l'hybridome B5/7 est plus forte que lorsque la bactérie est cultivée en présence de fer. Ce phénomène est observé quelle que soit l'origine de cette souche bactérienne (I.U.T. ou M. Mergeay). Cela confirme les résultats obtenus précédemment.

Ces résultats montrent aussi que les souches dérivées d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, c'est-à-dire AE176, AE194, AE229 et AE245, qui sont privées d'un des deux plasmides ou des deux mégaplasmides, ne sont pas reconnues par les Acms. Cela vient également confirmer le fait que la présence des deux mégaplasmides est nécessaire pour l'expression de l'Ag reconnu. Les autres souches sauvages que sont *Alcaligenes eutrophus* AS2, *Alcaligenes eutrophus* AS39, *Alcaligenes eutrophus* DS185 et *Alcaligenes eutrophus* SV661 qui sont taxonomiquement très proches d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 et dont les plasmides sont très semblables à pMOL28 et pMOL30, ne sont pas reconnues par les Acms produits par l'hybridome B5/7. Ces observations viennent confirmer la spécificité de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34.

Seule *Alcaligenes eutrophus* AE81 est reconnue par les Acms testés. Cette souche, dérivée d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, porte les deux mégaplasmides mais diffère de la souche sauvage au niveau chromosomique. Cela montre que si la présence des deux mégaplasmides est nécessaire, il faut que ces derniers soient intègres. En cela, l'absence de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 AE43 qui porte encore le plasmide pMOL30 et un plasmide pMOL28 raccourci c'est-à-dire délété d'une région d'environ 40 à 60 kb qui porte les gènes *cnr*, suggère que la déterminante plasmidienne associée à l'Ag reconnu se trouve non loin de *cnr*.

Nous avons essayé de mieux identifier l'antigène reconnu sur la ME en réalisant un test en Western blot sur l'ensemble des protéines de la ME.

5.3.4. Résultats de Western Blot

Cette étude va permettre de déterminer le poids moléculaire de la protéine reconnue par les Acms. Dans le cadre de cet essai, les deux types de ME, issues de bactéries cultivées en présence et en absence de fer, ont été testées. La Figure 24 illustre les résultats obtenus.

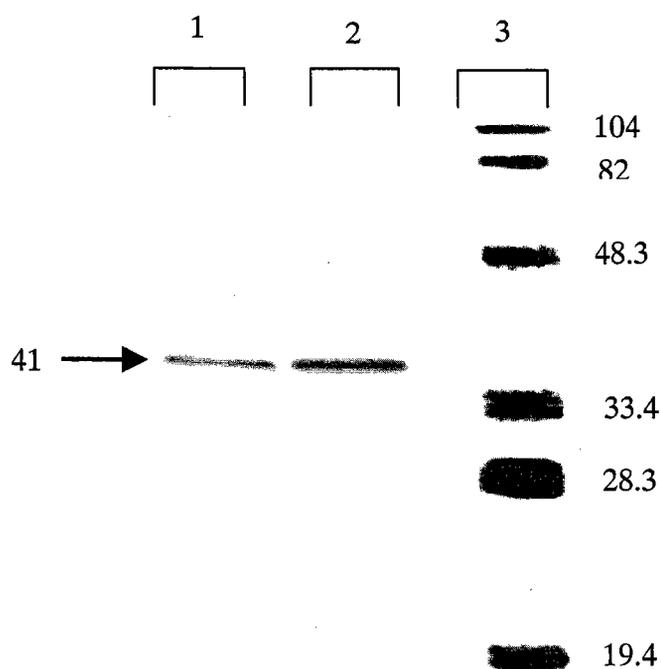


Figure 24 : Réaction des Acms produits par l'hybridome B5-7 en western blot sur des ME purifiées d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. Ligne 1, ME de bactéries cultivées en présence de fer; ligne 2, ME de bactéries cultivées en absence de fer; ligne 3, standard de poids moléculaire phosphorylase B (104 kDa), albumine sérique bovine (82 kDa), ovalbumine (48,3 kDa), anhydrase carbonique (33,4 kDa), inhibiteur de la trypsine de soja (28,3 kDa) et lysozyme (19,4 kDa).

Dans les deux cas, les Acms détectent uniquement une protéine d'un poids moléculaire d'environ 41 kDa. L'intensité du marquage est plus faible lorsque la bactérie est cultivée en présence de fer. Il s'agirait donc, peut-être, d'une nouvelle protéine impliquée dans le mécanisme de transport du fer qui n'a jamais été mise en évidence.

5.3.5. Utilisation des Acms pour la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 en immunofluorescence.

La capacité des Acms produits par l'hybridome B5-7 à se fixer sur *Alcaligenes eutrophus* CH34 entière, cultivée en absence et en présence de fer, a été étudiée par une technique d'immunofluorescence en suivant le protocole décrit dans la partie "Matériels et Méthodes". La Figure 25 et la Figure 26 illustrent la fluorescence bactérienne, chaque point clair correspondant à une bactérie, obtenue pour chaque condition de culture, après photographie sur un microscope à fluorescence.

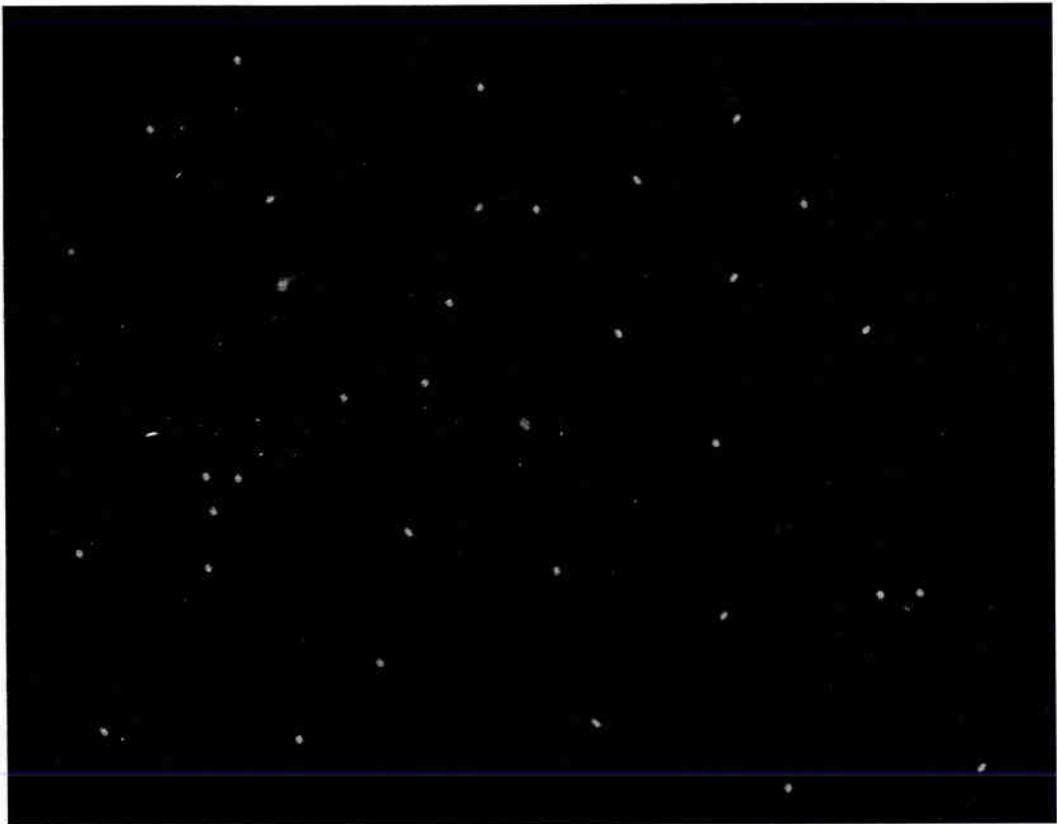


Figure 25 : Immunomarquage par les Acms produits par le clone B5/7 lorsque la bactérie est cultivée en absence de fer.



Figure 26 : Immunomarquage par les Acms produits par le clone B5/7 lorsque la bactérie est cultivée en présence de fer.

Les Acms ont été incubés avec la bactérie cultivée en présence ou absence de fer. La fluorescence est plus importante dans des conditions de carence en fer.

La détection spécifique des Acms produits par l'hybridome B5/7 est faite principalement grâce à la reconnaissance d'une protéine de la ME d'un poids moléculaire d'environ 41 kDa. Les différents tests ont clairement montré que cette protéine est spécifique d'Alcaligenes eutrophus CH34, qu'elle est impliquée dans le mécanisme de transport du fer chez cette bactérie et que la présence des deux mégaplasmides pMOL28 et pMOL30 est nécessaire pour l'expression de cette protéine.

Lors de différentes fusions réalisées, et quel que soit l'antigène utilisé (bactérie entière ou ME), nous obtenons des Acms d'isotype IgG1. Cette prédominance a déjà été mise en

évidence par Talbot-Lebouteiller (1993)¹⁴⁵ chez *Clostridium tyrobutyricum* dans le cadre d'obtention d'Acm contre cette bactérie.

La protéine de 41 kDa n'a jamais été décrite chez *Alcaligenes eutrophus* CH34, son rôle dans le transport du fer est inconnu. Cependant, elle fait partie des cinq protéines de ME surexprimées, dans le cas de la culture d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 en carence de fer, que nous avons mises en évidence par électrophorèse SDS-PAGE. La nécessité de la présence des deux mégaplasmides pourrait s'expliquer par le fait que l'un des deux porte une fonction inductrice et l'autre une fonction régulatrice intervenant dans le mécanisme où est probablement impliqué la protéine de 41 kDa.

Il est possible de faire des hypothèses sur la fonction de cette protéine. Neilands (1982)⁶⁷ a décrit chez *Escherichia coli* K-12, une protéine de ME impliquée dans le transport du fer, d'un poids moléculaire de 40 kDa. Elle a été identifiée comme étant le produit de dégradation d'une protéine de 81 kDa. Dans notre cas, aucune autre bande n'a été détectée en Western blot, ce qui semble aller à l'encontre de Neilands.

Larsen *et al.* (1996)¹⁴⁶ ont identifié, dans la famille des *Enterobacteriaceae*, des homologues de TonB dont les poids moléculaires allaient de 33 à 40 kDa environ. Ils présentaient des homologies de séquences de 50 à 85% tout en étant spécifiques de chaque souche bactérienne. De plus, Letain et Postle (1997)⁴⁹ ont montré que TonB assurait le transport de l'énergie entre la ME et la MC, en faisant la navette entre ces deux enveloppes, chez *Escherichia coli*, afin de faciliter la fixation du complexe fer-sidérophore. TonB interagit avec plusieurs protéines de ME qui ne sont pas encore caractérisées. Selon la même équipe, la répartition de TonB est de 40% dans la ME et de 60% dans la MC respectivement.

En cas de carence en fer, la protéine de 41-kDa (plasmides-dépendante) pourrait agir en coopération avec le mécanisme de transport du fer, codé par le chromosome bactérien, pour optimiser la fixation de ce cation, en fixant par exemple le complexe fer-sidérophore.

Cette non spécificité de la protéine impliquerait aussi que le sidérophore produit par *Alcaligenes eutrophus* CH34 serait capable de fixer d'autres cations que le fer. Cela a été récemment montré par Gilis *et al.* (1998)⁵⁵. Cette équipe a démontré que le cadmium pouvait aussi être fixé par Alcaligine-E. De tels résultats ont aussi été décrits par Namiranian *et al.* (1997)⁴² et Visca *et al.* (1992)⁵⁴ pour la pyochéline chez *Pseudomonas aeruginosa*, qui est capable de fixer le Cu, le Co, le Ni et le Zn.

De plus, Rensing *et al.* (1997)¹⁹ en proposant un nouveau modèle, chez *Alcaligenes eutrophus* CH34, pour le flux sortant de cations codé par l'opéron *czc*, a émis l'hypothèse de la présence dans la ME d'une protéine hypothétique appelée "Omp Y" qui assure le passage des cations vers le milieu extracellulaire. La protéine de 41 kDa que nous avons mis en évidence pourrait être cette "Omp Y" et une des protéines, non caractérisée, qui interagit avec TonB pour le transport du fer. Cela constituerait le premier lien entre ces deux systèmes de transport.

Si le rôle de la protéine de 41 kDa n'est pas de transporter les cations à travers la ME, il pourrait s'agir d'une protéine de stress. Elle pourrait également être liée à un système d'export bactérien de type ABC. Fath et Kolter (1993)¹⁴⁷ dans leur revue sur ce type de mécanisme ont mis en évidence la nécessité de facteurs accessoires pour assurer le bon fonctionnement de ces transports. Un de ces facteurs est une protéine de ME qui intervient dans la sécrétion d'autres protéines synthétisées par la bactérie. L'exemple donné est *tolC* qui intervient dans le mécanisme de sécrétion de l'hémolysine chez *Escherichia coli*. Cette protéine a été classée au sein du groupe des protéines de fusion membranaire par Saier *et al.* (1994)¹⁸. Dans ce cas, la protéine de 41 kDa interviendrait dans l'excrétion du sidérophore. Ce dernier pouvant fixer indifféremment le fer ou des métaux lourds, cela pourrait expliquer la surexpression de cette protéine dans nos conditions de culture.

5.4. Production et purification des anticorps monoclonaux

Après avoir sélectionné les Acms produits par le clone B5/7, il était nécessaire de les produire en plus grande quantité et de les purifier.

Pour l'ensemble des quatre essais (Figure 27), les Ac commencent être élués à partir de la fraction 15, et ce phénomène se poursuit jusqu'à la fraction 30. Les concentrations en IgG les plus fortes se situent entre les fractions 15 et 20 qui seront utilisées pour des études complémentaires avec ces Ac.

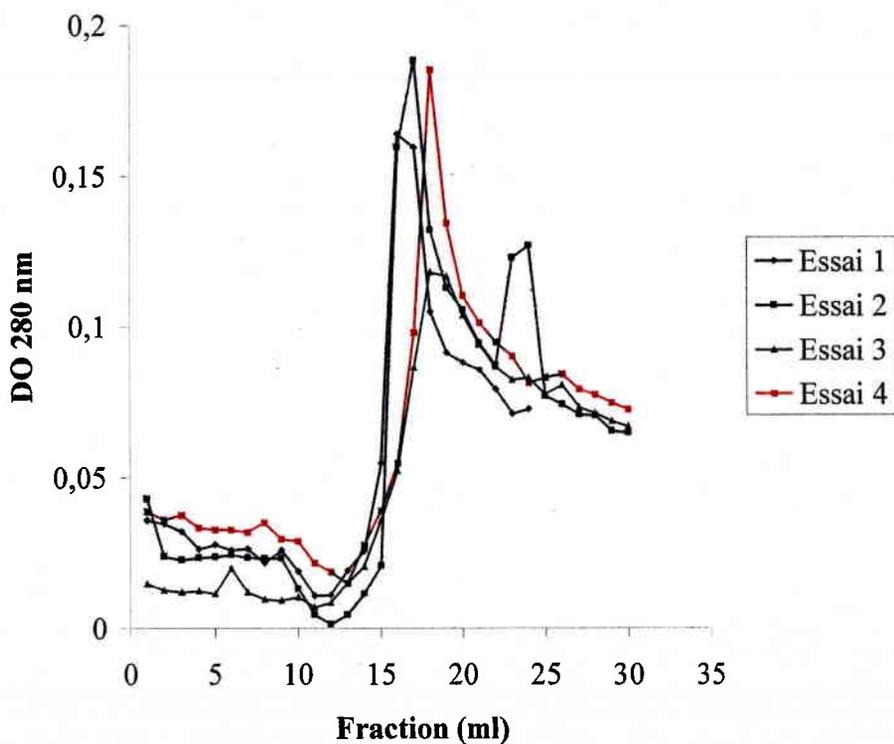


Figure 27 : Elution des IgG par suivi de la D.O. à 280 nm après passage sur une colonne de chromatographie à protéine G.

6. Mise au point d'une méthode d'immunisation *in vitro* pour l'obtention d'anticorps monoclonaux - Induction d'une réponse immunitaire secondaire.

Un des paramètres importants que l'on rencontre lors de la production d'Acms est le temps. En effet, entre la première immunisation et l'obtention, après sélection, des hybridomes producteurs des Igs recherchées, **il faut entre 4 et 6 mois**. Nous avons voulu développer une méthode qui permettrait de raccourcir ce temps à 2 mois en conservant la même qualité aux Ac produits.

Pour pouvoir obtenir une réponse immunitaire secondaire, il est nécessaire de réaliser plusieurs immunisations tout en maintenant les lymphocytes vivants et en culture. Contrairement aux essais précédemment développées par d'autres équipes, nous avons voulu tenter de mettre au point une méthode de culture permettant de maintenir les lymphocytes en vie au-delà de 72 heures.

Notre but était de recréer en plaque de culture la rate de souris. Pour pallier le problème de la mort lymphocytaire, nous avons utilisé un mitogène polyclonal, la concanavaline A (ConA) capable d'activer les populations lymphocytaires. Le choix de la ConA est à la fois pratique et économique. Ce système est complété par l'ajout de cellules nourricières et d'Il-6 avant la mise en contact avec l'Ag.

6.1. Premier essai *in vitro*

Nous avons voulu vérifier la faisabilité de cette technique et déterminer à quel moment la ConA devait être ajoutée à la concentration finale de 3 µg/ml, pendant 24 heures.

6.1.1. Protocole "d'immunisation"

- La veille du sacrifice de la souris, une couche nourricière de macrophages intrapéritonéaux est déposée dans les puits d'une plaque de culture P6, soit 60000 cellules / puits / ml de milieu complet.

- Une souris BALB/c femelle âgée de 4 à 6 semaines est sacrifiée, sa rate est prélevée, les splénocytes sont récupérés dans 12 ml de milieu complet. 2 ml de cette suspension cellulaire est déposée dans chaque puits de culture. L'ensemble est mis au repos dans un incubateur CO₂ (5% CO₂, 37°C) pendant 24 heures.

- Deux protocoles d'immunisation sont étudiés :

- ajout de ConA dans 1 ml de milieu de culture complet pour obtenir une concentration finale de 3 µg/ml. Après 24 heures, 3 immunisations, espacées de 72 heures, avec 200 µg d'Ag (ME) amenés dans 5 ml de milieu complet seront réalisées.

- ajout de 200 µg de ME dans 5 ml de milieu de culture. Après 24 heures, la ConA est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 3 µg/ml. Après 72 heures, 200 µg de ME sont ajoutés dans 5 ml de milieu complet. Après 72 heures, le milieu du puits est renouvelé et 200 µg de ME sont amenés dans 5 ml de milieu de culture.

- Après 12 jours, la fusion se fait en suivant le protocole utilisé pour la production *in vivo*. Tous les puits ayant reçu le même traitement sont poolés pour la fusion.

6.1.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes

A la suite de l'ajout de ConA, la croissance dans les puits de culture a été très forte, car en 24 heures le milieu de culture était épuisé. Il y a eu une très forte mortalité cellulaire due aux mauvaises conditions de culture et le contact avec les ME n'a pas été optimal. Il sera nécessaire de diminuer cette concentration pour mieux maîtriser le développement cellulaire lors d'un autre essai.

Après 10 jours de culture, la sélection de puits à cloner s'est faite par rapport à la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée en absence et en présence de fer, et seuls les puits où des hybridomes producteurs d'IgG étaient présents ont été retenus. Pour cette fusion, nous avons retenu 6 puits (A1, B10, B11, C10, E7, et F6) sur 72 testés soit un pourcentage de 8,3 %. Ce pourcentage est identique à celui obtenu lors de la production *in vivo* d'Acms. Mais la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée en présence de fer est environ 8 fois inférieure à celle de la bactérie cultivée en carence de fer. Il faut de plus noter que les puits clonés ont tous subi le traitement ConA, suivi des ajouts de ME.

Les puits retenus ont été clonés en agar noble 3%, le reste de la suspension de départ étant conservée en culture en plaque P6. Après prélèvement des clones et leur culture pendant 10 jours, une nouvelles sélection a été entreprise. Les mêmes critères de sélection ont été utilisés.

A l'issue de celle-ci, 4 puits, A1/A2, A1/A7, B10/B9 et C10/D7, sur 48 testés ont été retenus. Leur intensité de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée en absence de fer était d'une D.O. moyenne de 0,2. En revanche, la détection de la bactérie cultivée en présence de fer a quasiment disparue, la D.O. moyenne de détection étant de 0,015, valeur qui est similaire au bruit de fond de la technique dans nos conditions. Ces hybridomes ont été mis en culture

en plaque de culture P6, seul A1/A2 s'est développé. Cela pourrait signifier une instabilité plus importante de ces cellules.

Cet essai a montré la faisabilité de cette technique d'immunisation in vitro, c'est-à-dire obtenir une réponse secondaire (de type IgG) grâce à la survie des lymphocytes au-delà de 72 heures. Ce test a permis de montrer que la ConA devait être mise avant les apports de ME.. La concentration en ConA est aussi un facteur important pour la bonne réalisation de cette technique.

6.2. Deuxième essai in vitro

La concentration en ConA utilisée a été réduite à 1 µg/ml en final, ce qui devrait permettre de mieux maîtriser le développement cellulaire. Les autres conditions sont conservées par rapport au premier essai.

6.2.1. Protocole "d'immunisation"

- La veille du sacrifice de la souris, une couche nourricière de macrophages intrapéritonéaux est déposée dans les puits d'une plaque de culture P6, soit 60000 cellules / puits / ml de milieu complet.
- Une souris BALB/c est sacrifiée, sa rate est prélevée, les splénocytes sont récupérés dans 12 ml de milieu complet. 2 ml de cette suspension cellulaire sont déposés dans chaque puits de culture. L'ensemble est mis au repos dans un incubateur CO₂ (5% CO₂, 37°C) pendant 24 heures.
- ajout de ConA dans 1 ml de milieu de culture complet pour obtenir une concentration finale de **1 µg/ml**. Après 24 heures, 200 µg de ME sont ajoutés dans 5 ml de milieu. Après 3 jours, l'ensemble du milieu de culture du puits est renouvelé et 200 µg de ME

sont amenés dans 5 ml de milieu de culture. Après 3 jours, un dernier ajout de 200 µg de ME dans 5 ml de milieu de culture est réalisé.

- Après 12 jours, la fusion se fait en suivant le protocole utilisé pour la production *in vivo*. Tous les puits ayant reçu le même traitement sont poolés pour la fusion.

6.2.2. Fusion cellulaire et suivi de la production des hybridomes

L'ajout de la ConA à une concentration plus faible a permis la maîtrise du développement cellulaire. Sur les 4 jours de présence de la ConA, la biomasse s'est accrue sans épuiser le milieu de culture. Ainsi le contact avec l'antigène a pu être optimal. Le problème est donc résolu de ce point de vue.

Après 10 jours de culture, la sélection de puits à cloner s'est faite par rapport à la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 cultivée en absence et en présence de fer, et seuls les puits, où des hybridomes producteurs d'IgG étaient présents, ont été retenus. Nous avons retenu 7 puits sur les 96 testés, soit un pourcentage de 7,3 %. De plus, le nombre de puits testés est en augmentation par rapport au premier essai, passant de 72 à 96, soit un gain de 33 %. Ceci montre bien que la croissance cellulaire a été mieux maîtrisée en limitant la mortalité des lymphocytes. La D.O. moyenne de détection de la bactérie cultivée en absence de fer est de 0,132, soit une augmentation de 44% par rapport au premier essai. Cependant, la détection de la bactérie cultivée en présence de fer est toujours aussi faible, sortant à peine du bruit de fond de la méthode.

Les puits retenus ont été clonés en agar noble 3%, le reste de la suspension de départ étant conservée en culture en plaque P6. Après prélèvement des clones et leur culture pendant 10 jours, une nouvelle sélection a été entreprise. Les mêmes critères de sélection ont été utilisés. 57 clones ont été testés et 6 ont été retenus (1A11, 1B1, 1B2, 1G6, 1G7 et 1H11) soit un pourcentage de 10,5%. Mais la capacité à détecter *Alcaligenes eutrophus* CH34, quelles

que soient les conditions de culture, est faible, la D.O. moyenne de détection de la bactérie cultivée en absence de fer est de 0,036.

Nous avons voulu vérifier les réactions croisées avec des souches proches d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, ceci afin de déterminer si cette faible D.O. est due à une instabilité des clones ou à un problème de reconnaissance de la bactérie. Les souches étudiées sont les mêmes que celles utilisées pour la méthode *in vivo*. Le Tableau 11 illustre les résultats obtenus.

L'ensemble des hybridomes étudiés ne reconnaît que faiblement *Alcaligenes eutrophus* CH34, ce qui confirme les résultats obtenus lors des tests de sélection. Cependant tous les Ac se fixent de manière spécifique sur *Alcaligenes xyloxydans* (Ni^r, Zn^r et Cd^r) puisque la D.O. moyenne de la détection de cette souche est de 0,663. Il semble, donc, que ce ne soit pas une instabilité des clones, mais un problème "d'immunisation" des lymphocytes qui explique la faible détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. La très forte intensité de détection de l'autre souche montre que cette technique est viable pour la production d'Acms.

Nous avons donc montré la faisabilité de cette technique d'immunisation in vitro qui permet :

- *de maintenir les lymphocytes en culture au-delà de 72 heures,*
- *d'obtenir une réponse immunitaire secondaire,*
- *de réduire à 2 mois le temps nécessaire pour l'obtention d'Acms*
- *d'obtenir d'Acms*

Ces essais préliminaires ont montré qu'il fallait modifier certains paramètres de la technique pour pouvoir obtenir des Acms spécifiques de la souche ayant servi à l'immunisation. Nous pourrions également augmenter le nombre de cellules nourricières , ajouter d'autres interleukines et/ou facteurs de croissance. Il faudra par exemple augmenter

les quantités de ME utilisées pour les "immunisations" ou augmenter le nombre d'"immunisations" afin de présenter plus d'antigène et ainsi améliorer la spécificité des Acms. Pour améliorer cette technique, l'utilisation d'autres mitogènes comme le pokeweed ou la phytohémagglutinine, plus spécifiques de la division des lymphocytes B (Yang et al., 1998)¹⁴⁸, serait aussi envisageable.

Cette technique mériterait une autre étude visant à optimiser l'ensemble de ces paramètres.

Tableau 11 : Spécificité comparée des anticorps monoclonaux retenus vis-à-vis de souches proches ou dérivées d'*Alcaligenes eutrophus* CH34.

Souche	Résistances aux métaux lourds ^a			Plasmides	Référence du clone / Résultat ELISA						
	Ni	Cd	Zn		1A11	1B1	1B2	1G6	1G7	1H11	1A1/A2
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 (autre laboratoire)	r	r	r	pMOL28 pMOL30	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> 104	s	s	s	aucun	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> 126	r	s	s	pMOL28	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> 128	s	r	r	pMOL30	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP 134				pJP4 (résistance au 2,4-D)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S17/1	r	s	s	pTV1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> CH34 cultivée en absence de fer	r	r	r	pMOL28 pMOL30	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes xyloxydans</i>	r	r	r		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Alcaligenes xyloxydans</i>	r	s	s		-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes xyloxydans</i>	s	s	r		-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>				Témoin négatif	-	-	-	-	-	-	-

^a r : résistante, s : sensible

- : aucune détection

+ : faible détection

++ : détection moyenne

+++ : forte détection

7. Applications des anticorps monoclonaux à la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34.

Après avoir obtenu des Acms dirigés spécifiquement contre *Alcaligenes eutrophus* CH34, il était nécessaire de développer une méthode rapide pour détecter cette bactérie. En effet, le seul moyen actuel de détecter cette souche est de la cultiver sur des milieux de culture sélectifs. Cette méthode est longue et peut induire la perte de caractéristiques phénotypiques.

Avec la production des Acms, nous pouvons envisager l'utilisation d'un test de type ELISA. Mais si celui-ci est assez sensible, il présente les inconvénients de n'être utilisable qu'en laboratoire et le délai pour obtenir des résultats est assez long (environ une journée). Nous avons voulu réduire ce temps à quelques minutes et avoir un système utilisable "sur le terrain". Pour cela nous nous sommes inspirés du test d'hémagglutination indirecte artificielle utilisé, par exemple, pour réaliser la détection de certaines protéines d'origine bactérienne (Protéine C Reactive test). Le principe est, que sur des globules rouges ou des billes de latex, des Ac spécifiques sont greffés par leur partie C-terminale. En cas de reconnaissance de l'Ag spécifique, il y a formation d'agglutinats observables à l'œil nu, ce qui indiquera la positivité du test. Notre choix s'est orienté vers des billes de latex.

Pour les essais, deux types de billes ont été utilisés :

- ➔ latex de polystyrène hydrophiles super-actifs modifiés carboxylate, billes de 3,1 μm de diamètre.
- ➔ latex de polystyrène hydrophobes super-actifs modifiés aliphatic/amine, billes de 2,1 μm de diamètre.

Leur emploi a été justifié par des problèmes d'orientation de la fixation des Acms. En effet, en fonction de la charge portée par la surface de la bille, les Ac vont se fixer soit par

leur partie N-terminale (fragments Fab), soit par leur partie C-terminale (fragment Fc). Pour déterminer le type de fixation en fonction du type de billes, nous avons utilisé un Ac secondaire anti-IgG de souris marqué à la fluorescéine dirigé uniquement contre le fragment Fc. Ainsi seuls les Ac fixés par leur partie Fab seront révélés par immunofluorescence indirecte.

7.1. Sélection du type de billes

Les deux types de billes sont photographiés en contraste de phase interférentielle (ou DIC) et fluorescence sur un microscope NIKON E-800. La Figure 28 illustre les résultats obtenus. Les billes "modifiées carboxylate" sont les seules à présenter une fluorescence. Cela signifie que les Acms se sont bien fixés par leur partie N-terminale. Ce seront donc les billes modifiées aliphatic/amine qui seront utilisées pour le reste de l'expérience.

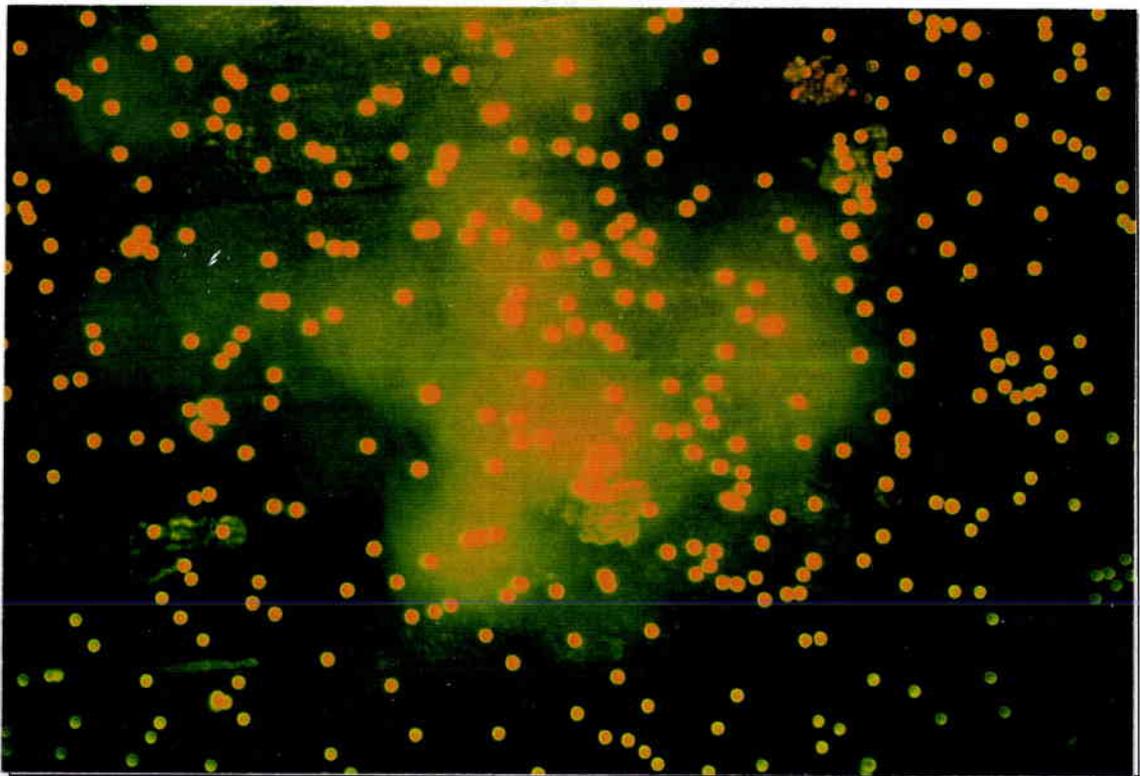


Figure 28 : Immunomarquage par un anticorps secondaire fluorescent obtenu après fixation des Acms produits par l'hybridome B5/7 sur les billes de latex modifiées carboxylate.

7.2. Essais de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34

Après avoir montré la fixation des Acms sur les billes, la capacité de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 par ce système devait être démontré. Pour cela, deux lots de bactéries ont été préparés contenant l'un la bactérie cultivée sans fer, l'autre la bactérie cultivée en présence de fer, leur D.O. à 620 nm était de 0,8. Un nouveau lot de billes coatées a été préparé en suivant le protocole décrit précédemment. Sur une plaque d'opaline, nous avons déposé 100 µl de suspension de billes et ajouté 100 µl de suspension bactérienne. La plaque est lentement agitée par retournement pendant 2 minutes. Si la bactérie est détectée, il y aura formation d'agglutinats visibles à l'œil nu.

Le premier puits contenant du PBS sert de témoin négatif au test. Dans le puits où la bactérie cultivée en absence de fer a été déposée, il y a formation de gros agglutinats. Par contre ces derniers sont de plus petite taille dans le cas où la bactérie est cultivée en présence de fer. Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus en ELISA lors des tests de sélection des Acm. La Figure 29, la Figure 30 et la Figure 31 présentent des observations microscopiques de ces agglutinats en fonction du type de bactérie utilisé.

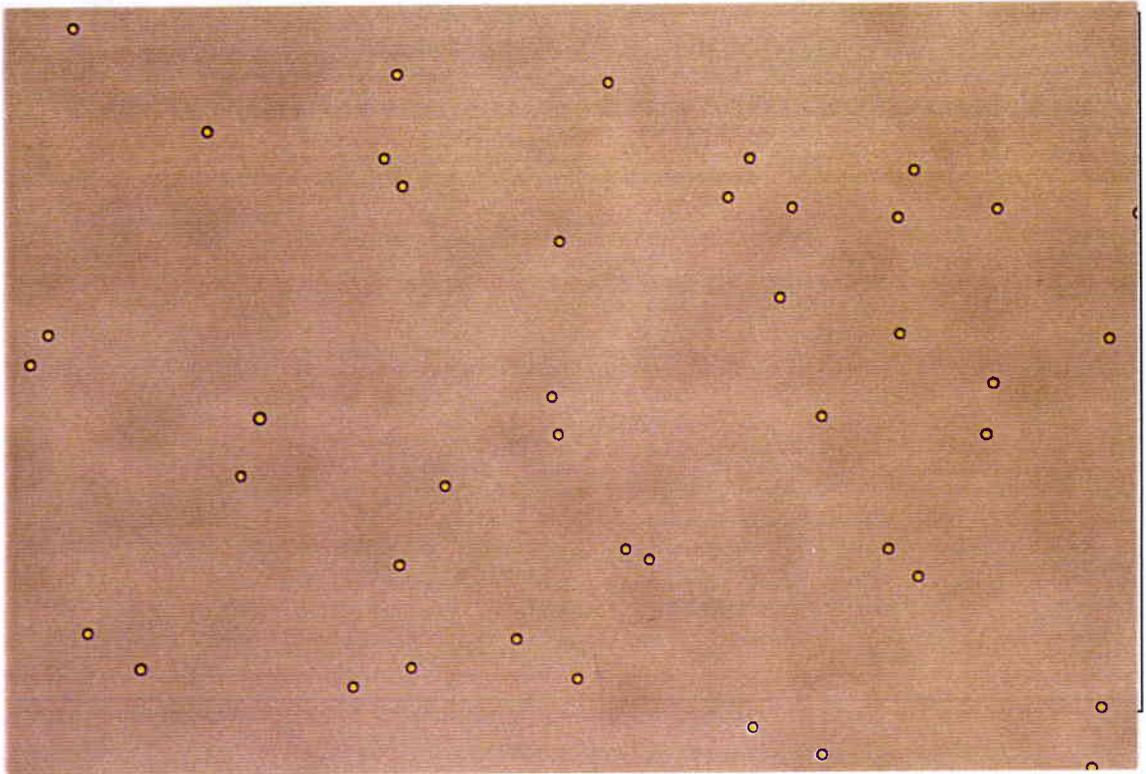


Figure 29 : Observation en DIC des agglutinats formés en présence de PBS comme témoin négatif (grossissement x400).

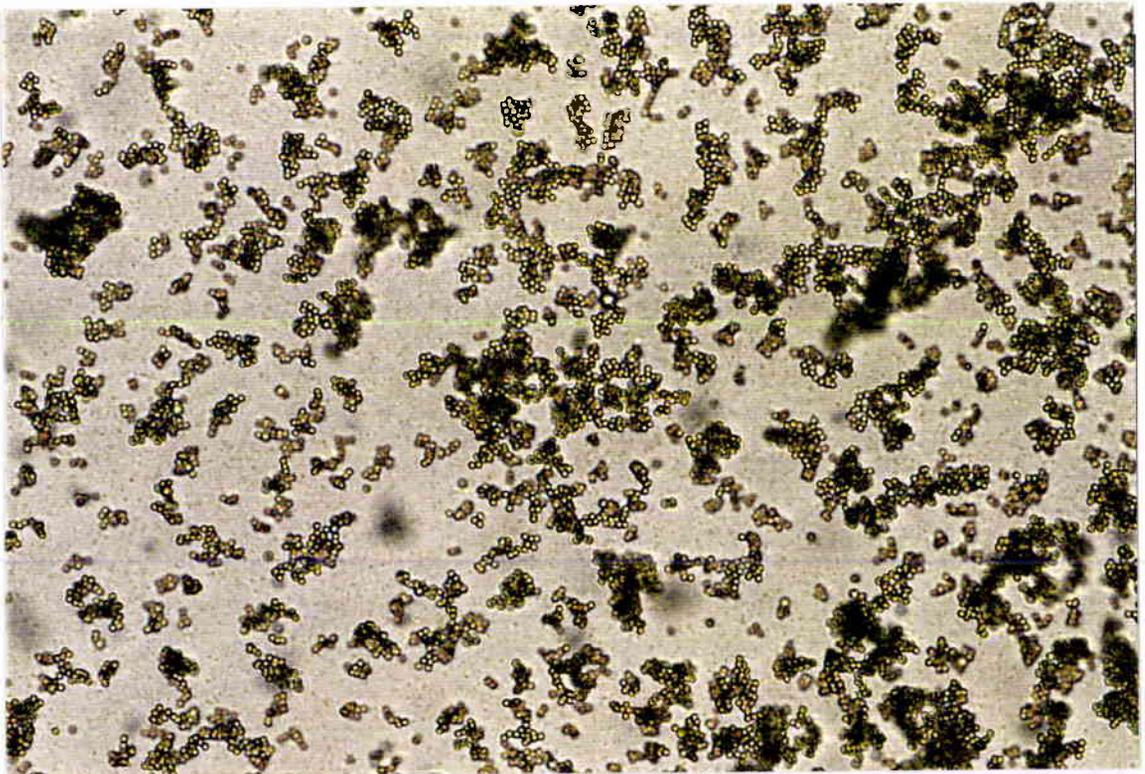


Figure 30 : Observation en DIC des agglutinats formés entre les billes modifiées amine aliphatique coatées avec les Acms et les bactérie cultivées en absence de fer. (Grossissement x400).



Figure 31 : Observation faite en DIC des agrglutinats formés entre les billes de latex modifiées amine aliphatique coatées avec les Acms et les bactéries cultivées en présence de fer (Grossissement x400).

Nous avons donc montré la capacité à détecter Alcaligenes eutrophus CH34 par ce système. Cette technique est rapide, moins de 5 minutes, et pourrait être aisément transportable sur le terrain car elle nécessite un matériel restreint. Il reste à déterminer le seuil de détection de ce procédé, et montrer que l'agglutination n'est pas observable avec d'autres souches bactériennes.

7.3. Détermination du seuil de détection de ce procédé

Pour déterminer le seuil de détection de cette méthode, une gamme de concentrations en bactéries a été réalisée. Le Tableau 12 donne les différentes concentrations utilisées (en million de bactéries /ml).

Tableau 12 : Gamme de concentrations en bactéries utilisée pour déterminer le seuil de détection du procédé.

Concentration (million bactéries / ml)	3	2,5	2	1,5	1	0,75	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,01
----------------------------------------	---	-----	---	-----	---	------	-----	-----	-----	-----	-----	------

Pour cet essai, 100 µl de billes ont été ajoutées à 100 µl de suspension bactérienne. L'ensemble est agité par retournement pendant 2 minutes sur une plaque d'opaline. Une observation visuelle est faite pour évaluer la formation d'agglutinats et 15 µl de la suspension sont montés entre lame et lamelle pour une observation microscopique. Un témoin négatif était fait avec du PBS.

Des agglutinats étaient visibles jusqu'à une concentration de 2.10^5 bactéries par ml. En dessous de cette valeur, seule l'observation microscopique permet de voir la formation de petits agglutinats jusqu'à la concentration de 10^4 bactéries par ml.

Le seuil de détection par ce procédé est donc de 2.10^5 cellules / ml pour une détection visuelle et de 10^4 cellules / ml pour une détection microscopique. Ce test sera donc utilisable pour des cas où Alcaligenes eutrophus CH34 est présente en forte quantité. En revanche, dans le cas d'un effluent de composition inconnue, un résultats négatif devra être confirmé après culture, pendant 24 heures, dans un milieu spécifique afin d'enrichir la biomasse bactérienne. Si la réponse est toujours négative, l'absence de la bactérie pourra être conclue. Même si cette étape est lourde, le temps de détection de la bactérie est toujours réduit à une journée ce qui est un gain de temps appréciable par rapport aux méthodes traditionnellement utilisées pour identifier la bactérie.

7.4. Spécificité de la détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 par ce procédé.

Afin de vérifier que la formation des agglutinats n'est pas due à la simple présence de bactéries, trois souches dérivées d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 ont été utilisées. Il s'agit de :

- *Alcaligenes eutrophus* CH34 AE104 (aucun plasmide)
- *Alcaligenes eutrophus* CH34 AE126 (contient pMOL28)
- *Alcaligenes eutrophus* CH34 AE128 (contient pMOL30)

Aucune formation d'agglutinats n'est observée avec ces trois souches bactériennes.. Cela signifie que la formation d'agglutinats n'est pas due à la simple présence de bactéries, mais qu'il s'agit bien d'une réaction spécifique Ag-Ac.

Le procédé de détection d'Alcaligenes eutrophus CH34 par agglutination artificielle indirecte est donc un procédé plus rapide que les techniques utilisées jusqu'à présent pour identifier la bactérie. Malgré certaines restrictions (culture en cas d'échantillon de composition bactérienne inconnue), cette technique est donc un bon moyen d'identifier Alcaligenes eutrophus CH34 de façon rapide, spécifique et de façon continue.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était l'obtention et la production d'anticorps monoclonaux pour la détection directe d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 dans des sols ou des effluents liquides pollués par des métaux lourds. Cette bactérie à Gram(-) possède deux mégaplasmides de résistance aux métaux lourds. pMOL28 code pour les résistances au Ni, Hg, Co, chromate et thallium, quant à pMOL30 il permet les résistances au Cd, Zn, Co, Hg, Cu et thallium. Dans l'optique de l'obtention d'Acms, la ME a été fractionnée, avec un rendement de plus de 90% et sans contamination par la MC, en utilisant la méthode proposée Forsberg *et al.* (1970) modifiée par Falla *et al.* (1990). Une étude électrophorétique des ME issues de bactéries cultivées avec ou sans fer a montré de grandes différences du point de vue de la composition en protéines. En effet, dans le cas d'une carence en fer, cinq protéines, dont les poids moléculaires sont d'environ 80, 63,5, 63, 41 et 29 kDa, étaient surexprimées.

Ces ME ont ensuite servi à immuniser des souris femelles BALB/C en vue de l'obtention d'hybridomes capables de produire des Acms spécifiques d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. Après trois essais *in vivo* visant à la mise au point de cette technique, un nombre d'à peu près 300 hybridomes a été obtenu, à partir desquels 11 hybridomes producteurs d'Ac, de type IgG, ont été retenus. Parmi eux, huit reconnaissaient *Escherichia coli* S17/1 et un, *Klebsiella aerogenes*. Les deux hybridomes restants, B5/7 et B5/9, ont été retenus et les Acms qu'ils produisaient étaient d'isotype IgG1. Seul B5/7 a été conservé pour le reste de l'étude car l'intensité de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 par les Acms qu'il produisait était 20% supérieure à celle de B5/9.

La protéine de ME reconnue par ces Acms a un poids moléculaire de 41 kDa, et qui faisait partie des cinq protéines qui étaient surexprimées en conditions de carence en fer lors de l'étude électrophorétique de la ME. L'étude des réactions croisées des Acms produits par

l'hybridome B5/7 contre des souches dérivées ou taxonomiquement proches d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 et contre des bactéries susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement ont montré que :

- cette protéine est spécifique d'*Alcaligenes eutrophus* CH34,
- cette protéine semble impliquée dans le mécanisme de transport du fer et peut-être dans la résistance aux métaux lourds,
- l'expression de cet Ag nécessite la présence des deux mégaplasmides intègres,
- la déterminante plasmidienne associée à la protéine de 41 kDa est proche de la région du plasmide pMOL28 codant pour l'opéron *cnr*.

Une application de ces Acms a été la mise au point d'une méthode rapide de détection d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. Pour cela, les Ac ont été greffés sur des billes de latex. En présence d'une suspension bactérienne de bactéries cultivées en présence et en absence de fer, la bactérie est détectée visuellement au bout de deux minutes et de manière spécifique. Le seuil de détection visuel de cette technique est de 2.10^5 bactéries / ml.

Parallèlement à cette obtention d'Acms, nous avons voulu développer une technique plus rapide que celle habituellement utilisée. Pour atteindre ce but, les acteurs principaux de la réponse immunitaire, les macrophages, les splénocytes et l'Ag, ont été réunis dans un puits d'une plaque de culture P6. Pour pallier la mortalité des lymphocytes B, un mitogène polyclonal, la Concanavaline A, a été ajouté au milieu de culture. Trois "immunisations" *in vitro*, avec 200 µg d'Ag, ont été réalisées. A l'issue des différents essais, sept hybridomes, producteurs d'IgG, ont été obtenus qui ne détectaient (hors du bruit de fond) que *Alcaligenes xyloxydans* (Ni^r). Si la faisabilité et la rapidité (2 mois) d'une telle technique a été vérifiée, il

reste des paramètres à optimiser pour obtenir des Acms dirigés contre l'Ag ayant servi aux immunisations.

Afin d'essayer de montrer l'implication des deux mégaplasmines dans l'expression de la protéine de 41 kDa, quelques expériences complémentaires peuvent être proposées :

→ tester les Acms contre une bactérie dérivée d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 qui ne produit pas de sidérophore (phénotype Sid⁻) comme celle utilisée par Gilis *et al.*³⁹. Cela permettra de vérifier si la protéine de 41 kDa est bien impliquée dans le mécanisme de transport du fer. Si cette hypothèse est vraie, cette protéine ne devrait plus être détectée pour cette bactérie Sid⁻. Une étude de profils électrophorétiques de membranes externes cultivées en présence de fer et sous pression métallique pourrait aussi amener des informations complémentaires.

→ reconstruire le type sauvage d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 à partir des souches *Alcaligenes eutrophus* AE126 et *Alcaligenes eutrophus* AE128 qui possèdent chacune un des deux plasmides, pMOL28 et pMOL30 respectivement. Sur cette bactérie de phénotype sauvage ainsi reconstruite nous pourrions réaliser les mêmes études (électrophorèse SDS-PAGE, Western Blot, détection par les Acms retenus au terme de ce travail) que celles effectuées avec la souche d'*Alcaligenes eutrophus* CH34 qui nous a servi à produire des Acms.

→ réaliser une étude en électrophorèse SDS-PAGE des ME des souches *Alcaligenes eutrophus* CH34 AE104, *Alcaligenes eutrophus* CH34 AE126, *Alcaligenes eutrophus* CH34 AE128 et *Alcaligenes eutrophus* CH34 AE81 pour vérifier l'implication des deux mégaplasmines dans l'expression de la protéine de 41 kDa.

→ Après avoir réalisé les expériences précédentes, une étude de la protéine de 41 kDa sera l'étape suivante. Pour cela, il serait intéressant d'étudier le comportement de cette protéine face au sidérophore pour déterminer s'il s'agit bien d'un nouveau récepteur

d'Alcaligin-E ou un récepteur pour un autre sidérophore produit par *Alcaligenes eutrophus* CH34. Cela ne sera possible qu'après purification de ce deux protéines (par une méthode HPLC par exemple). Une étude du comportement de la protéine de 41 kDa vis-à-vis de métaux lourds soit libres, soit complexés au(x) sidérophore(s) pourrait apporter des informations quant à l'interaction entre le transport du fer et la résistance aux métaux lourds. Dans tous ces cas, une technique par chromatographie d'affinité pourrait être mise en œuvre. L'une des protéines serait greffée sur un support de sépharose, par exemple, dans une colonne. Une suspension contenant l'autre protéine passerait à travers le système. Un dosage des protéines totales avant et après passage en chromatographie permettrait d'évaluer la quantité fixée. Pour les métaux lourds, un dosage en absorption atomique amènerait à la quantification du métal fixé.

→ L'étude de la structure de la protéine serait la dernière étape afin de caractériser complètement cette dernière, avec son séquençage, et la localisation génétique du déterminant correspondant à cette protéine. Cela permettra de vérifier l'implication des deux mégaplasmites dans l'expression de cette protéine.

Les Acms que nous avons produit contre *Alcaligenes eutrophus* CH34 pourront être utilisés dans le cadre de la mise au point d'un test de bio-indication de pollution par les métaux lourds. Le test d'agglutination indirecte artificielle nous permet de détecter rapidement la bactérie sur le terrain, sa présence pourra signifier une pollution du site étudié. Cette bactérie peut aussi servir dans des processus de dépollution d'effluents pollués par des métaux lourds. Dans ce cadre, il est important de suivre l'évolution en continue de la présence d'*Alcaligenes eutrophus* CH34, car c'est la présence des deux mégaplasmites qui rend cette bactérie intéressante pour un tel procédé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MERGEAY M., HOUBA C. ET GERITS J. (1978). Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions : evidence from curing in a *Pseudomonas*. *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, **86**, 440-441.
2. SCHNEIDER K. ET SCHLEGEL H.G. (1976). Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes Eutrophus* H16. *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 66-80.
3. SCHINK B. ET SCHLEGEL H.G. (1979). The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* (I. solubilization, purification, and biochemical properties). *Biochim. Biophys. Acta*, **567**, 315-324.
4. SADOUK A. (1989). Etude du génome d'une bactérie du sol résistante aux métaux lourds : *Alcaligenes eutrophus* CH34. Thèse de doctorat. Université de Liège. 177 pages.
5. MERGEAY M., NIES D., SCHLEGEL H.G., GERITS J., CHARLES P. ET VAN GIJSEGEM F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.*, **162**, 328-334.
6. YABUUCHI E., KOSAKO Y., YANO I., HOTTA H. ET NISHUICHI Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. : proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov. *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.*, **39**, 897-904.

7. PEITZSCH N., EBERZ G. ET NIES D.H. (1998). *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 453-458.
8. TAGHAVI S., MERGEAY M. ET VAN DER LELIE D. (1997). Genetic and physical maps of the *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality. *Plasmid*, **37**, 22-34.
9. SADOUK A. ET MERGEAY M. (1993). Chromosome mapping in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Mol. Gen. Genet.*, **240**, 181-187.
10. SILVER S. ET WALDERHAUG M. (1992). Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **56**, 195-228.
11. NIES D.H. ET SILVER S. (1989a). Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, **171**, 896-900.
12. NIES D., MERGEAY M., FRIEDRICH B. ET SCHLEGEL H.G. (1987). Cloning of plasmid genes encoding expression resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.*, **169**, 4865-4868.
13. NIES D.H. (1992). CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, **174**, 8102-8110.

14. NIES D.H. ET SILVER S. (1989b). Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J. Bacteriol.*, **171**, 4073-4075.
15. DIELS L., DONG Q., VAN DER LELIE D., BAEYENS W. ET MERGEAY M. (1995). The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34 : from resistance mechanisms to the removal of heavy metals. *J. Ind. Microbiol.*, **14**, 142-153.
16. VAN DER LELIE D., SCHWUCHOW T., SCHWIDETZKY U., WUERTZ S., BAEYENS W., MERGEAY M. ET NIES D.H. (1997). Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.*, **23**, 493-503.
17. NIES D.H., NIES A., CHU L. ET SILVER S. (1989). Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **86**, 7351-7355.
18. SAIER M.H. JR., TAM R., REIZER A. ET REIZER J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.*, **11**, 841-847.
19. RENSING C., PRIBYL T. ET NIES D.H. (1997). New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J. Bacteriol.*, **179**, 6871-6879.
20. DONG Q. ET MERGEAY M. (1994). Czc/Cnr efflux : a three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12- transmembrane-helix protein. *Mol. Microbiol.*, **14**, 185-187.

21. REMACLE J. ET VERCHEVAL C. (1991). A zinc-binding protein in a metal-resistant strain, *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Can. J. Microbiol.*, **37**, 875-877.
22. DIELS L., FAELEN M., MERGEAY M. ET NIES D. (1985). Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, **93**, B27-B28.
23. SIDDIQUI R.A., SCHLEGEL H.G. ET MEYER M. (1988). Inducible and constitutive expression of pMOL28-encoded nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* N9A. *J. Bacteriol.*, **170**, 4188-4193.
24. SIDDIQUI R.A., BENTHIN K. ET SCHLEGEL H.G. (1989). Cloning of pMOL28-encoded nickel resistance genes and expression of the genes in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.*, **171**, 5071-5078.
25. NIES A., NIES D.H. ET SILVER S. (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 5648-5653.
26. SIDDIQUI R.A. ET SCHLEGEL H.G. (1987). Plasmid pMOL28-mediated inducible nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* strain CH34. *FEMS Microbiol. Let.*, **43**, 9-13.
27. SENFUSS C. ET SCHLEGEL H.G. (1988). Plasmid pMOL28-encoded resistance to nickel is due to specific efflux. *FEMS Microbiol. Let.*, **55**, 295-298.

28. LIESEGANG H., LEMKE K., SIDDIQUI R.A. ET SCHLEGEL H.G. (1993). Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.*, **175**, 767-778.
29. SCHMIDT T. ET SCHLEGEL H.G. (1994). Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.*, **176**, 7045-7054.
30. COLLARD J.M., CORBISIER P., DIELS L., DONG Q., JEANTHON C., MERGEAY M., TAGHAVI S., VAN DER LELIE D., WILMOTTE A. ET WUERTZ S. (1994). Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34 : mechanisms and applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, **14**, 405-414.
31. COLLARD J.M., PROVOOST A., TAGHAVI S. ET MERGEAY M. (1993). A new type of *Alcaligenes eutrophus* CH34 zinc resistance generated by mutation affecting regulation of the *cnr* cobalt-nickel resistance system. *J. Bacteriol.*, **175**, 779-784.
32. GUERINOT M.L. (1994). Microbial iron transport. *Ann. Rev. Microbiol.*, **48**, 743-772.
33. NEILANDS J.B. (1994). Effects of iron deprivation on outer membrane protein expression. *Methods Enzymol.*, **235**, 344-352.
34. CROSA J.H. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **53**, 517-530.

35. KÖSTER W. (1991). Iron(III) hydroxamate transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biol. Met.*, **4**, 23-32.
36. RABSCH W. ET WINKELMANN G. (1991). The specificity of bacterial siderophore receptors probed by bioassays. *Biol. Met.*, **4**, 244-250.
37. SCHWYN B. ET NEILANDS J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.*, **160**, 47-56.
38. PAYNE S.M. (1994). Detection, isolation and characterization of siderophores. *Methods Enzymol.*, **235**, 329-344.
39. GILIS A., KHAN M.A., CORNELIS P., MEYER J.M., MERGEAY M. ET VAN DER LELIE D. (1996). Siderophore-mediated iron uptake in *Alcaligenes eutrophus* CH34 and identification of *aleB* encoding the ferric iron-alcaligin E receptor. *J. Bacteriol.*, **178**, 5499-5507.
40. COX C.D. ET GRAHAM R. (1979). Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **137**, 357-364.
41. MOORE C.H., FOSTER L.A., GERBIG D.G. JR., DYER D.W. ET GIBSON B.W. (1995). Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J. bacteriol.*, **177**, 1116-1118.

42. NAMIRANIAN S., RICHARDSON D.J., RUSSELL D.A. ET SODEAU J.R. (1997). Excited state properties of the siderophore pyochelin and its complex with zinc ions. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 777-782.
43. GENSBERG K., HUGHES K. ET SMITH A.W. (1992). Siderophore-specific induction of iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2381-2387.
44. POOLE K., NESHAT S., KREBES K. ET HEINRICHS D.E. (1993). Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyochelin receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **175**, 4597-4604.
45. ANKENBAUER R.G. (1992). Cloning of the outer membrane high-affinity Fe(III)-pyochelin receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **174**, 4401-4409.
46. SOKOL P.A. ET WOODS D.E. (1983). Demonstration of an iron-siderophore-binding protein in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, **40**, 665-669.
47. JASKULA J.C., LETAIN T.E., ROOF S.K., SKARE J.T. ET POSTLE K. (1994). Role of the TonB terminus in energy transduction between membranes. *J. Bacteriol.*, **176**, 2326-2338.
48. POSTLE K. (1990). TonB and the Gram-negative dilemma. *Mol. Microbiol.*, **4**, 2019-2025.

49. LETAIN T.E. ET POSTLE K. (1997). TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **24**, 271-283.
50. MOECK G.S. ET COULTON J.W. (1998). TonB-dependent iron acquisition : mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.*, **28**, 675-681.
51. BRITIGAN B.E., RASMUSSEN G.T. ET COX C.D. (1997). Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infect. Immun.*, **65**, 1071-1076.
52. BRITIGAN B.E., RASMUSSEN G.T. ET COX C.D. (1998). Binding of iron and inhibition of iron-dependent oxidative cell injury by the "calcium chelator" 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA). *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 287-295.
53. PRINCE R.W., COX C.D. ET VASIL M.L. (1993). Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production : molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* fur gene. *J. Bacteriol.*, **175**, 2589-2598.
54. VISCA P., COLOTTI G., SERINO L., VERZILID., ORSI N. ET CHIANCONE E. (1992). Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2886-2893.

55. GILIS A., CORBISIER P., BAEYENS W., TAGHAVI S., MERGEAY M. ET VAN DER LELIE D. (1998). Effect of the siderophore alcaligin E on the bioavailability of Cd to *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 61-68.
56. PRESCOTT, HARLEY ET KLEIN (1995). Microbiologie. Eds : de Boeck-Wesmael, 2^{ème} Edition, Bruxelles. 1014 pages.
57. BEVERIDGE T.J. (1981). Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial cell wall. *Int. Rev. Cytol.*, **72**, 229-317.
58. SALTON M.R.J. (1987). Bacterial membrane proteins. *Microbiol. Sci.*, **4**, 100-105.
59. HINDENNACH I. ET HENNING U. (1975). The major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane - Preparative isolation of all major membrane proteins. *Eur. J. Biochem.*, **59**, 207-213.
60. PARSOT C. ET WANDERSMAN C. (1996). Sécrétion de protéines par les bactéries pathogènes à Gram négatif. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **11**, 15-21.
61. SOUSA C., KOTRBA P., RUMML T., CEBOLLA A, ET DE LORENZO V. (1998). Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein Lamb. *J. Bacteriol.*, **180**, 2280-2284.

62. AONO R., TSUKAGOSHI N. ET YAMAMOTO M. (1998). Involvement of the outer membrane protein TolC, as a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **180**, 938-944.
63. DOMINGUES R.M., AVELAR K.E., SOUZA W.G., MORAES S.R., ANTUNES E.N. ET FERREIRA M.C. (1998). Electrophoretic characterization of exposed outer membrane proteins in environmental and human *Bacteroides fragilis* strains. *Zentralbl. Bakteriol.*, **287**, 331-341.
64. HOSTACKA A. ET KARELOVA E. (1998). Outer membrane proteins of *Klebsiella pneumoniae* after exposure to ciprofloxacin. *Zentralbl. Bakteriol.*, **287**, 343-346.
65. SENDRA R.M., ESTEVE C. ET ALCAIDE E. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Aeromonas hydrophila* serogroup O:19. *FEMS Microbiol. Lett.*, **157**, 123-129.
66. MONOGRAPHIE MEDICALE (1992). Centoxin (HA-1A). Eds Laboratoire Centocor France, Boulogne (France), 56 pages.
67. NEILANDS J.B. (1982). Microbial envelope proteins related to iron. *Ann. Rev. Microbiol.*, **36**, 285-309.

68. BAUMLER A.J., NORRIS T.L., LASCO T., VOIGHT W., REISSBRODT R., RABSCH W. ET HEFFRON F. (1998). IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1446-1453.
69. SCIORTINO C.V., YANG Z. ET FINKELSTEIN R.A. (1985). Monoclonal antibodies to outer membrane antigens of *Vibrio cholerae*, *Infect. Immun.*, **49**, 122-131.
70. KOOI C. ET SOKOL P.A. (1995). Characterization of monoclonal antibodies to *Yersinia enterocolitica* iron-regulated proteins. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 562-571.
71. SHANG E.S., SKARE J.T., ERDJUMENT-BROMAGE H., BLANCO D.R., TEMPST P., MILLER J.N. ET LOVETT M.A. (1997). Sequence analysis and characterization of a 40-kDa *Borrelia hermsii* glycerophosphodiester phosphodiesterase homolog. *J. Bacteriol.*, **179**, 2238-2246.
72. MAHASRESHI P.J., MURPHY G.L., WYCKOFF J.H., FARMER S., HANCOCK R.E.W. ET CONFER A.W. (1997). Purification and partial characterization of the OmpA family of proteins of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun.*, **65**, 211-218.
73. LEOPOLD K., JACOBSEN S. ET NYBROE O. (1997). A phosphate-starvation-inducible outer-membrane protein of *Pseudomonas fluorescens* Ag1 as an immunological phosphate-starvation marker. *Microbiology*, **143**, 1019-1027.
74. REPASKE R. (1958). Lysis of Gram negative organisms and the role of versene. *Biochem. Biophys. Acta*, **30**, 225-232.

75. OSBORN M.J. ET MUNSON R. (1974). Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membrane of gram negative bacteria. *Methods Enzymol.*, **31A**, 642-653.
76. MIURA T. ET MIZUSHIMA S. (1968). Separation by density gradient centrifugation of two types of membrane from spheroplasts membrane of *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 159-161.
77. FORSBERG C.W., COSTERTON J.W. ET MACLEOD R.A. (1970). Quantitation, chemical characteristics, and ultrastructure of the three outer cell wall layers of a gram-negative bacterium. *J. Bacteriol.*, **104**, 1354-1368.
78. YAMATO I., ANRAKU Y. ET HIROSAWA K. (1975). Cytoplasmic membrane vesicles of *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **77**, 705-718.
79. MIZUMO T. ET KAGEYAMA M. (1978). Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.*, **84**, 179-191.
80. ANWAR H., BROWN M.R.W., COZENS R.M. ET LAMBERT P.A. (1983). Isolation and characterization of the outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas cepacia*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 499-507.
81. FALLA J.A., BAUDA P. ET BLOCK J.C. (1988). Isolation of cell envelope layers of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Microbiol. Methods*, **7**, 285-294.

82. SHANG E.S., SKARE J.T., EXNER M.M., BLANCO D.R., KAGAN B.L., MILLER J.N. ET LOVETT M.A. (1998). Isolation and characterization of the outer membrane of *Borrelia hermsii*. *Infect. Immun.*, **66**, 1082-1091.
83. KUBY J. (1992). *Immunology*, Eds. W.H. Freeman and Company: New-York.
84. KABAT E.A., WU T.T., REID-MILLER M., PERRY H.M. ET GOTTESMANN K.S. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. National Institute of Health : Bethesda, Maryland.
85. BACH J.F. ET LESAVRE P. (1993). Structure et gènes des immunoglobulines. *In* : Immunologie de la biologie à la clinique. Eds. Médecine-Sciences / Flammarion, France. 63-83.
86. FRENCH D.L., LASKOV R. ET SCHARFF M.D. (1989). The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. *Science*, **244**, 1152-1157.
87. PRESSMAN D. (1957). *In* Molecular structure and biological specificity, N°2 ; Eds. American institute of biological sciences : Washington, D.C. 1-17.
88. SCHULTZ P.G. ET JACOBS J.W. (1988). *In* Environmental influences and recognition in enzyme chemistry. Eds. VCH Publishers, Inc. : New-York. 305-312.
89. GARVEY J.S., CREMER N.E. ET SUSSDORF D.H. (1977). *Methods in immunology*. Eds. W.A. Benjamin, Inc.: Reading, Massachusetts.

90. GODING J.W. (1986). Monoclonal antibodies : principles and practice. Eds. Academic press : San diego.
91. KOHLER G. ET MILSTEIN C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
92. KOHLER G. ET MILSTEIN C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immun.*, **6**, 511-519.
93. GALFRE G., HOWE S.C., MILSTEIN C., BUTCHER G.W. ET HOWARD J.C. (1977). Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature*, **266**, 550-552.
94. LAI C.H., BLOOMQUIST C. ET LILJEMARK W.F. (1990). Purification and characterization of an outer membrane protein adhesin from *Haemophilus parainfluenzae* HP-28. *Infect. Immun.*, **58**, 3833-3839.
95. BERMINGHAM S., DEWEY F.M. ET MALTBY L. (1995). Development of a monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of *Anguillospora longissima* colonizing leaf material. *App. Environ. Microbiol.*, **61**, 2606-2613.
96. HARLOW E. ET LANE D. (1988). Antibodies : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New-York. Pp. 564-565.

97. GUEGUEN F., ROBREAU G., TALBOT F. ET MALCOSTE R. (1990). Demonstration of a surface antigen of *Clostridium tyrobutyricum* by use of immunoblotting with a monoclonal antibody. *Microbiol. Immunol.*, **34**, 55-64.
98. HAMEL J., BRODEUR B.R., LAROSE Y., TSANG P.S., BELMAAZA A. ET MONTPLAISIR S. (1987). A monoclonal antibody directed against a serotype-specific, outer-membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Med. Microbiol.*, **23**, 163-170.
99. SOKOL P.A. ET WOODS D.E. (1986). Monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* ferripyochelin-binding protein. *Infect. Immun.*, **53**, 621-627.
100. SMITH A.W., WILTON J., CLARK S.A., ALPAR O., MELLING J. ET BROWN M.R.W. (1991). Production and characterization of monoclonal antibodies to outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* grown in iron-depleted media. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 227-236.
101. ATKINS M.B. (1998). Immunotherapy and experimental approaches for metastatic melanoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, **12**, 877-902.
102. SAGAZIO P., TEMPESTA M., BUONAVOGLIA D., CIRONE F. ET BUONAVOGLIA C. (1998). Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. virol. Methods*, **73**, 197-200.

103. WALDERICH B., BURCHARD G.D., KNOBLOCH J. ET MULLER L. (1998). Development of monoclonal antibodies specifically recognizing the cyst stage of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**, 347-351.
104. JENNINGS M.P., VIRJI M., EVANS D., FOSTER V., SRIKHANTA Y.N., STEEGHS L., VAN DER LEY P. ET MOXON E.R. (1998). Identification of a novel gene involved in pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.*, **29**, 975-984.
105. GLASSY M.C., THARAKAN J.P. ET CHAU P.C. (1988). Serum free media in hybridoma culture and MAb production. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 1015-1028.
106. BUTLER M. ET JENKINS H. (1989). Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. *J. Biotechnol.*, **12**, 97-110.
107. GAILLARD I. (1993). Mise en œuvre de la chromatographie haute performance dans le cadre du suivi hors ligne et en ligne des protéines de culture d'hybridomes – Caractérisation de la méthode chromatographique et comparaison avec le test ELISA. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. 262 pages.
108. MARTIAL A. (1991). Etude du comportement d'hybridomes en réacteurs dans un milieu défini – Effet des suppléments (acides aminés, insuline, lipides) en culture discontinues et continues. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. 400 pages.

109. REUVENY S., VELEZ D., MACMILLAN J.D. ET MILLER L. (1986a). Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *J. Immunol. Methods*, **86**, 53-59.
110. KNAZECK R.A., GULLINO P.M., KOHLER P.O. ET DEDRICH R.L. (1972). Cell culture in artificial capillaries. An approach to tissue growth in vitro. *Science*, **178**, 65-67.
111. SCHEIRER W. (1988). High density growth of animal cells within cell retention fermenters equipped with membranes. *In : Animal cell biotechnology*, vol. 3. Spier R.E. et Griffiths J.B. Eds., Academic Press, New-York, 263-280.
112. REUVENY S., VELEZ D., MILLER L. ET MACMILLAN J.D. (1986b). Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermentors. *J. Immunol. Methods*, **86**, 61-69.
113. BJORCK L. ET KRONVALL G. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.*, **133**, 969-974.
114. ELIASSON M., OLSSON A., PALMCRAANTZ E., WIBERG K. INGANAS M., GUSS B., LINDBERG M. ET UHLEN M. (1988). Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4323-4327.
115. FAHNESTOCK S. (1987). Cloned streptococcal protein G genes. *TIBS*, **5**, 79-83.

116. LANGONE (1978). Studies on the interaction between protein A and immunoglobulin G. I. Effect of protein A on the functional activity of IgG. *J. Immunol.*, **121**, 327-332.
117. AKERSTROM B. ET BJORCK L. (1986). A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *J. Biol. Chem.*, **261**, 10240-10247.
118. JUNGBAUER A. ET AL. (1989). Comparison of protein A, protein G and copolymerized hydroxyapatite for the purification of human monoclonal antibodies. *J. Chrom.*, **476**, 257-268.
119. RICHARDSON M. ET DUTTON R.W. (1964). Antibody synthesizing cells : appearance after secondary antigenic stimulation *in vitro*. *Science*, **146**, 655-656.
120. MISHALL R.I. ET DUTTON R.W. (1966). Immunization of normal mouse spleen cell suspensions *in vitro*. *Science*, **153**, 1004-1006.
121. MARBROOK J. (1967). Primary immune response in cultures of spleen cells. *The Lancet*, **2**, 1279-1281.
122. MISHALL R.I. ET DUTTON R.W. (1967). Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.*, **126**, 423-442.
123. MOSIER D.E. (1967). A requirement for two cell types for antibody formation *in vitro*. *Science*, **158**, 1573-1575.

124. MOSIER D.E. ET COPPLESON L.W. (1968). A three cell interaction required for the induction of a primary immune response *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 542.
125. PIERCE C.W. (1969). Immune response in vitro. I. cellular requirements for the immune response by nonprimed and primed spleen cells in vitro. *J. Exp. Med.*, **130**, 345-364.
126. BAN M., HETTICH D. ET CAVELIER C. (1995). Use of Mishell-Dutton culture for the detection of the immunosuppressive effect of iron-containing compounds. *Toxicol. Lett.*, **81**, 183-188.
127. EISENSTEIN T.K., MEISSLER J.J. JR, ROGERS T.J., GELLER E.B. ET ADLER M.W. (1995). Mouse strain differences in immunosuppression by opioids in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1484-1489.
128. STUKI G. ET ALEXANDER M. (1987). Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microb.*, **53**, 292-297.
129. OSBORN M.J., GAUDER J.E., PARISI E. ET CARSON J. (1972). Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **247**, 3962-3972.

130. THORNE K.J.L., THORNLEY M.J. ET GLAUERT A.M. (1973). Chemical analysis of the outer membrane and other layers of the cell envelope of *Acinetobacter sp.* *J. Bacteriol.*, **116**, 410-417.
131. KASAHARA M. ET ANRAKU Y. (1974). Succinate dehydrogenase of *Escherichia coli* membrane vesicles. *J. Biochem.*, **76**, 956-966.
132. AMINOFF D. (1961). Methods for the quantitative estimation of N-acetyl neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *J. Biochem.*, **81**, 384-392.
133. NACHALS M.M., MARGULIES S.I. ET SELIGMAN A.M. (1960). A colorimetric method for the estimation of succinic dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.*, **235**, 499-503.
134. BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
135. LAEMMLI U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
136. TOWBIN J., STAEGELIN T. ET GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.

137. BLAKE M.S., JOHNSTON K.H., RUSSELL-JONES G.J. ET GOTSCHLICH E.C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.*, **136**, 175-179.
138. BOOTH B.R. ET CURTIS N.A.C. (1977). Separation of the cytoplasmic and outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **74**, 1168-1176.
139. FOX C.F., LAW J.H., TSUKAGOSHI N. ET WILSON G. (1970). A density label for membranes. *Nat. Acad. Sci.*, **2**, 598-605.
140. MIURA T. ET MIZUSHIMA S. (1969). Separation and properties of outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, **193**, 268-276.
141. HANCOCK R.E.W. ET NIKAIDO H. (1978). Outer membrane of Gram negative bacteria XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *J. Bacteriol.*, **136**, 381-390.
142. REIGH G. ET O'CONNELL M. (1993). Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the outer membrane of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, **175** : 94-102.
143. CONNELL T.D., DICKENSON A., MARTONE A.J., MILITELLO K.T., FILIATRAUT M.J., HAYMAN M.L. ET PITULA J. (1998). Iron starvation of *Bordetella avium* stimulates expression of five outer membrane proteins and regulates a gene involved in acquiring iron from serum. *Infect. Immun.*, **66**, 3597-3605.

144. PHILSON S.B. ET LLINAS M. (1982). Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens* - I. isolation and characterization. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8081-8085.
145. TALBOT-LEBOUTEILLER F. (1993). Génération d'anticorps anti-*Clostridium tyrobutyricum*: recherche d'anticorps d'isotype prédéfini. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale. 135 pages.
146. LARSEN R.A., MYERS P.L., SKARE J.T., SEACHORD C.L., DARVEAU R.P. ET POSTLE K. (1996). Identification of TonB homologs in the family *Enterobacteriaceae* and evidence for the conservation of the TonB-dependent energy transduction complexes. *J. Bacteriol.*, **178**, 1363-1373.
147. FATH M.J. ET KOLTER R. (1993) ABC transporters : Bacterial exporters. *Microbiol. Rev.*, **57**, 995-1017.
148. YANG W.C., KWOK S.C., LESHIN S., BOLLO E. ET WI L. (1998). Purified porcine seminal plasma protein enhances in vitro immune activities of porcine peripheral lymphocytes. *Biol. Reprod.*, **59**, 202-207.

Résumé

Obtention et production d'anticorps monoclonaux pour la détection de *Alcaligenes eutrophus* CH34

Alcaligenes eutrophus CH34, bactérie à Gram négatif et ayant un métabolisme chimolithotrophe facultatif, possède deux mégaplasmides pMOL28 et pMOL3 résistances aux métaux lourds (Cd, Zn, Co, Ni, Cu, Tl, chromates, Hg et Pb). Des membranes externes de cette bactérie, cultivée avec (0,0096 g/l) ou sans fer, ont été isolées par la méthode de Forsberg *et al.* (1970) légèrement modifiée par Falla *et al.* (1990). Des marqueurs spécifiques, KDO (3-céto-2-déoxyoctonate) et SDH (succinate déshydrogénase), de la membrane externe et de la membrane cytoplasmique respectivement ont été dosés. Les résultats indiquent que la membrane externe a été séparée avec un bon rendement (> 90%) et sans contamination par la membrane cytoplasmique. Une étude électrophorétique de l'enveloppe bactérienne a révélé qu'en absence de fer, cinq protéines de 80, 63,5, 63, 41 kDa étaient surexprimées. Les membranes externes de bactéries cultivées en absence de fer ont permis d'immuniser des souris afin de produire des anticorps monoclonaux. Un total de 200 hybridomes producteurs d'anticorps ont été testés en ELISA. La plupart d'entre eux présentaient des réactions croisées avec *Escherichia coli* ou *Klebsiella aerogenes*. Parmi eux, les hybridomes B5/7 et B5/9, produisent des anticorps monoclonaux spécifiques de *Alcaligenes eutrophus* CH34. Une analyse en Western blot a indiqué que ces anticorps reconnaissent une protéine spécifique d'un poids moléculaire d'environ 41 kDa. Une étude en immunofluorescence a montré que cette protéine était exposée sur la surface de la membrane externe. L'ensemble de ces résultats suggère que cette protéine est impliquée dans le mécanisme de transport du fer. La présence des deux mégaplasmides intégrés est nécessaire pour l'expression de cette dernière. De plus, la région déterminante antigénique associée à l'expression de la protéine de 41 kDa est proche de la région de pMOL 28 codant pour l'opéron *cnr*. Cela semble suggérer un premier lien entre le mécanisme de résistance aux métaux lourds et le transport du fer chez *Alcaligenes eutrophus* CH34.

Mots-Clefs : *Alcaligenes eutrophus* CH34, anticorps monoclonaux, sidérophore, membrane externe.