

Phage display

Diapositive 1 :

Le *phage display* est une technique utilisée pour étudier l'interaction de protéines ou de peptides avec différents ligands ou autres protéines. Dans le *phage display*, une librairie de peptides ou de protéines est fusionnée à une protéine d'enveloppe de phage et exposée à la surface des particules de phage. Les protéines affichées peuvent être « screenées » pour la liaison à la cible tandis que le gène codant cette protéine de fusion est contenu dans le génome du phage, garantissant le lien entre le génotype et le phénotype et permettant que les protéines qui interagissent dans la librairie puissent être facilement identifiées par séquençage de l'ADN.

Diapositive 2 :

La fusion des protéines est limitée aux protéines d'enveloppe exposées à la surface. L'affichage des peptides ou des protéines se réalise le plus souvent par fusion avec la petite protéine d'enveloppe gpIII ou la grande protéine d'enveloppe gpVIII. Différents systèmes de vecteurs d'affichage sont utilisés : les vecteurs de phage avec une copie unique des gènes de la protéine d'enveloppe dans laquelle l'insertion d'une séquence ou d'une librairie de protéines entraîne une fusion obligatoire avec toutes les copies de la protéine d'enveloppe. Ces systèmes sont appelés systèmes 3 ou 8, en fonction de la protéine d'enveloppe utilisée pour la fusion. Un second type de vecteurs de phage contient deux copies d'un gène de protéine d'enveloppe dans lequel l'insertion d'une séquence ou d'une librairie de protéines dans l'une des copies du gène résulte en une protéine d'enveloppe de type sauvage et en une protéine d'enveloppe portant les protéines fusionnées. Ces systèmes sont appelés systèmes 33 ou 88. Enfin, un troisième type de système implique deux éléments différents, un phagemide, qui est un plasmide contenant un signal d'emballage et une copie de la protéine d'enveloppe fusionnée avec une séquence protéique ou une librairie, et le phage « helper », qui est un phage M13 normal avec un signal d'emballage défectueux. Lorsqu'une cellule hôte contenant le phagemide est infectée par un phage « helper », des particules de phage contenant un mélange de protéines de type sauvage et d'enveloppe fusionnées sont produites. Ces systèmes sont appelés systèmes 3+3 ou 8+8.

Diapositive 3 :

La construction d'une librairie est une étape clé dans le phage display. Diverses approches peuvent être considérées afin de générer une librairie de protéines différentes, mais en général, les méthodes sont réparties en trois catégories principales. La première catégorie comprend les méthodes qui ont pour but de changer de façon aléatoire la séquence du type sauvage. Ces méthodes comprennent l'utilisation de substances mutagènes physiques et chimiques. La deuxième catégorie comprend les méthodes qui ont pour but de randomiser uniquement une région spécifique de la protéine, ces méthodes sont appelées méthodes dirigées et impliquent l'utilisation d'oligonucléotides aléatoires synthétiques pour générer des variants par PCR ou clonage direct.

Diapositive 4 :

Enfin, dans la troisième catégorie de méthodes, l'objectif principal n'est pas de générer de la diversité dans les séquences, mais de combiner en prenant des fragments de séquences existantes et de les mélanger dans de nouvelles combinaisons, ce sont les techniques de recombinaison.

Diapositive 5 :

Une fois que la librairie d'une protéine souhaitée est affichée sur des particules de phage, elles sont soumises à plusieurs cycles de sélection au cours desquels les variants possédant une liaison plus forte à la cible sont sélectionnés. Ce processus s'appelle le « biopanning ». Dans le biopanning, un ligand ou une cible biotinylée est immobilisée sur une matrice enduite de streptavidine, telle une microplaque. Ensuite, les particules de phage affichant la librairie sont ajoutées à la plaque. Les phages qui se lient à la cible resteront attachés, tandis que les agents non liants seront éliminés par des étapes de lavage ultérieures. Les phages liés sont élués et amplifiés en leur permettant d'infecter de nouvelles cellules d'*E.coli*. Les nouveaux phages contenant des variants sélectionnés sont soumis aux cycles suivants de biopanning. L'enrichissement des phages spécifiques est typiquement de l'ordre de 20 à 1000 fois par cycle. Cela explique la nécessité de plusieurs cycles de biopanning pour obtenir un enrichissement utile des phages se liant à partir de grandes librairies. Après plusieurs cycles, les variants se liant le mieux peuvent être identifiés par séquençage d'ADN.

Diapositive 6 :

Le phage display est une technique puissante qui permet le dépistage en parallèle de milliers de peptides ou de variants de protéines pour améliorer leur capacité de liaison ou en créer de nouvelles, non seulement au niveau des interactions des protéines de liaison, mais aussi dans la génération d'interactions protéine-protéine, protéine-ADN. Sa robustesse et sa mise en œuvre relativement aisée ont fait du phage display une technique utile en recherches fondamentale et appliquée, en particulier dans le domaine de la recherche clinique, dans la génération d'anticorps recombinants et dans l'identification de peptides cliniquement pertinents.