

9.3 : Exemples et applications

Diapositive 1 :

Maintenant que vous avez compris les mécanismes sous-jacents au système de *phage display*, jetons un œil à son utilisation dans la recherche.

I) Le phage display a un large éventail d'applications. Cela peut aller de l'amélioration des enzymes à l'analyse du protéome ou à la découverte de nouveaux médicaments et nouvelles cibles, mais cet éventail ne se limite pas à cela.

Diapositive 2 :

La première chose que je veux mettre en avant est l'optimisation des enzymes. Une grande variété d'enzymes est aujourd'hui utilisée dans différents domaines de l'industrie et de la biotechnologie. Ces enzymes sont fabriquées, à l'origine, par des organismes pour remplir une fonction spécifique dans une niche ou un environnement spécifique, comme à l'intérieur du cytoplasme cellulaire. Par conséquent, elles ont souvent des propriétés indésirables pour la fonction ou l'environnement dans lequel nous voulons les utiliser. Elles peuvent ne pas fonctionner assez rapidement, être instables dans les conditions d'utilisation voulues ou ne pas fonctionner sur le substrat désiré. Le phage display peut aider à améliorer ces enzymes en sélectionnant, par exemple, une meilleure thermostabilité, une meilleure activité ou une augmentation de la liaison au substrat.

I) Commençons par la stabilité. Prenez par exemple une enzyme qui est normalement présente dans le cytoplasme d'une cellule à 37 ° C. Cependant, lorsque nous l'utilisons dans un processus industriel à 50 ° C, l'enzyme devient instable et est dénaturée. Grâce au phage display, nous pouvons créer une librairie d'enzymes « mutagénisées » et les afficher, dans le cas présent, il s'agit de la protéine du gène 3 du phage. Dans l'étape de liaison du biopanning, la plupart des phages ne pourront pas lier le substrat enzymatique à 50 ° C car ils sont dénaturés. Seuls les phages qui affichent une enzyme capable de se replier correctement à cette température seront conservés et amplifiés dans les étapes suivantes de biopanning. Ces phages peuvent ensuite être séquencés pour obtenir la séquence voulue pour une protéine stable.

II) La résistance à la protéolyse peut également être acquise par phage display. Dans cet exemple, une librairie d'enzymes « mutagénisées » est exprimée sous forme de protéine fusionnée avec l'enzyme d'intérêt au centre de la g3p. Après digestion, seuls les phages portant une enzyme résistante à la protéolyse ont la queue N-terminale de g3p qui est nécessaire pour interagir avec le pilus F. Par conséquent, seuls ces phages sont amplifiés dans le biopanning. La séquence d'ADN obtenue à partir de ces phages va coder cette enzyme résistante et peut être utilisée pour la production de l'enzyme modifiée.

Diapositive 3 :

Il est également possible d'améliorer l'activité catalytique des enzymes. Dans cet exemple, je discuterai d'une façon de le réaliser pour les métalloenzymes. Ce sont des enzymes qui nécessitent un atome de métal pour leur activité. Dans ce cas, une β -lactamase a été utilisée, une enzyme capable d'inactiver les antibiotiques β -lactames.

I) Une banque de β -lactamase mutagénisées a été préparée et fusionnée à la protéine du gène 3 de M13. Dans une première étape, les phages sont traités avec un agent chélatant, en éliminant tous les atomes métalliques. De cette façon, la métalloenzyme est inactivée. Cependant, elle est encore capable de lier son substrat. Par conséquent, une première sélection d'enzymes capable de lier son

substrat est obtenue. Après lavage, le métal est de nouveau ajouté afin d'activer les enzymes qui sont donc capables de fonctionner. Des enzymes plus actives vont mieux cliver le substrat et donc permettre une meilleure élution. De cette façon, une sélection positive est réalisée en vue de l'obtention d'enzymes catalytiquement plus actives.

II) Après 2 cycles de biopanning, les chercheurs acquièrent une enzyme qui possède une activité 60 fois plus élevée. La technique peut également être étendue à d'autres métalloenzymes.

Diapositive 4 :

Le phage display peut également être utilisé dans la recherche sur la protéomique. De nombreuses protéines réalisent leur fonction suite à l'interaction avec d'autres protéines. Cependant, dans de nombreux cas, ce partenaire d'interaction est inconnu. Pour trouver ces partenaires d'interaction protéique à travers le phage display, une librairie d'ADNc ou d'ORF est fabriquée à partir du protéome d'intérêt. Ces librairies codent pratiquement toutes les protéines possibles pouvant être exprimées dans une certaine cellule. Par conséquent, les différents phages de la librairie exprimeront et afficheront toutes les protéines possibles à leur surface. Dans le cas présenté ici, la protéine du Gène 8 est utilisée. Le « panning » se fait ensuite en utilisant la protéine d'intérêt comme « appât ». Après plusieurs « panning », les phages restants seront enrichis en protéines qui interagiront avec la protéine d'appât. Le séquençage générera une liste de cibles potentielles pouvant ensuite être vérifiées par d'autres techniques.

Diapositive 5 :

Un dernier exemple que je vais vous exposer est la recherche d'un peptide capable de traverser la barrière hémato-méningée. Dans le développement de médicaments, il est difficile de développer des médicaments capables de passer dans le cerveau. Ceci est dû au fait que le cerveau possède une « barrière hémato-méningée ». Cette barrière est uniquement présente dans le cerveau autour des vaisseaux sanguins et est absente dans le reste du corps. Les cellules endothéliales adjacentes à ces vaisseaux sanguins sont reliées par des jonctions étroites qui forment une barrière continue et difficile à passer, séparant les vaisseaux sanguins et le cerveau. Ceci pose un problème, par exemple, dans le développement de médicaments contre la maladie d'Alzheimer. Cependant, cette barrière n'est pas impossible à traverser. Certaines protéines et nutriments peuvent en effet traverser cette barrière. Une manière de permettre à une molécule de traverser serait de la lier à un petit peptide capable de passer. Par conséquent, les chercheurs ont mis en place un système de phage display afin de trouver de tels peptides

i) À cette fin, une librairie peptidique de « 12-mers » aléatoires a été construite pour être affichée à la surface du phage. Plutôt que de réaliser du biopanning *in vitro*, on utilise une méthode de panning *in vivo* pour trouver des peptides. Dans cette technique de panning, les phages sont injectés dans la veine caudale des souris. Le phage peut circuler durant quelques minutes afin de permettre la liaison aux récepteurs. Les souris sont alors euthanasiées et les phages sont extraits du cerveau.

Diapositive 6 :

Après quatre cycles de panning *in vivo*, 20 peptides ont pu être séquencés. Douze d'entre eux avaient la même séquence consensus.

I) Ce peptide consensus a été fusionné à une nanoparticule, marquée avec une tag fluorescente et injecté chez la souris. L'imagerie *in vivo* a ensuite été utilisée pour examiner la localisation des nanoparticules. Les deux premières souris sont des souris témoins, la 3ème et la 4ème

possèdent les particules fusionnées dans des ratios différents. Une localisation nette dans le cerveau de la souris est alors observée. Aussi, lorsque vous regardez la localisation dans les organes sur la figure de droite, vous pouvez clairement observer une forte accumulation de nanoparticules dans le cerveau, ce qui n'est pas le cas pour les souris témoins. Par conséquent, le peptide, découvert par le phage display, pourrait permettre l'envoi de nanoparticules ou de médicaments vers le cerveau. Ces exemples montrent clairement la polyvalence du système phage display et comment il peut s'appliquer dans la pratique.

Diapositive 7 :

Plus d'informations sur le système phage display et sur les exemples discutés ici peuvent être trouvées dans les articles suivants.