

Présentation à la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display

Christelle Souriau, The Duc Hua, Marie-Paule Lefranc, Mylène Weill

La présentation à la surface de phages filamenteux, le phage display, est devenue un très puissant outil de sélection et de synthèse combinatoire des protéines. Les phages filamenteux peuvent présenter à leur surface des peptides aléatoires, des protéines ou encore des fragments d'anticorps.

Les banques de peptides exposés sur phage ont été sélectionnées avec succès sur différentes cibles purifiées. Les sélections sur anticorps monoclonaux caractérisent rapidement des épitopes tandis que les sélections sur récepteurs ou sur enzymes identifient de nouveaux ligands et de nouveaux substrats.

Les banques combinatoires de fragments d'anticorps ont permis d'isoler des anticorps dirigés contre un très grand

nombre d'antigènes différents. Les banques dites naïves ne nécessitent pas d'immunisation et sont particulièrement intéressantes pour isoler des anticorps humains ou des anticorps dirigés contre des protéines très conservées.

De nouveaux protocoles permettent maintenant les sélections sur des cibles complexes telles que des cellules, des sérums de patients ou des tissus.

Enfin, une protéine active exposée sur phage peut être soumise à différentes modifications suivies de sélections sur une cible. Cette « évolution in vitro » représente un puissant outil d'analyse des relations entre la structure et la fonction d'une molécule.

Cette revue décrit différentes applications développées dans un nombre croissant de laboratoires.

La présentation de peptides à la surface de phages filamenteux a été démontrée pour la première fois par Georges Smith en 1985 [1], mais il a fallu attendre quelques années pour comprendre l'importance de ce puissant outil de sélection [2, 3]. Les phages filamenteux sont utilisés pour présenter à leur surface, en fusion avec le domaine amino-terminal de leurs protéines pIII ou pVIII, des molécules telles que des peptides aléatoires [3], des fragments d'anticorps (Fab, Fv ou scFv *single chain F*) [4] ou d'autres protéines (*figure 1A*). Les phages recombinants sont sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible (*figure 2*). Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés et amplifiés par infection de bactéries. Les phages

amplifiés sont sélectionnés à nouveau sur la même cible. Après 3 à 4 tours de sélection-amplification, les phages sélectionnés sont analysés et testés pour l'activité recherchée. Des pressions de sélection différentes peuvent être introduites à chaque tour ainsi qu'une diversité additionnelle par mutagenèse. Cette stratégie fondée sur la sélection est nettement plus puissante qu'une stratégie de criblage classique qui nécessite de nombreuses manipulations. Il est en effet possible de cribler 10^6 à 10^{10} molécules recombinantes différentes dans un volume réduit de quelques microlitres. De plus, l'association de la protéine exposée en surface (phénotype) avec son ADN codé par le phage (génotype) permet d'accéder rapidement aux séquences des molécules sélectionnées car l'ADN est

directement isolé avec la protéine pour laquelle il code. Cette méthode est très efficace puisqu'il est possible de sélectionner un phage dont la fréquence était de $1/10^8$ dans la banque originale. Le nombre croissant de publications apparues ces dernières années indique que la technologie du *phage display* représente un outil performant pour de très nombreuses applications.

Les banques de peptides sur phage

Construction

Les banques de peptides sont engendrées par clonage d'oligonucléotides aléatoires en 5' des gènes *pIII* ou *pVIII* d'un phage filamenteux. La longueur des peptides fusionnés avec

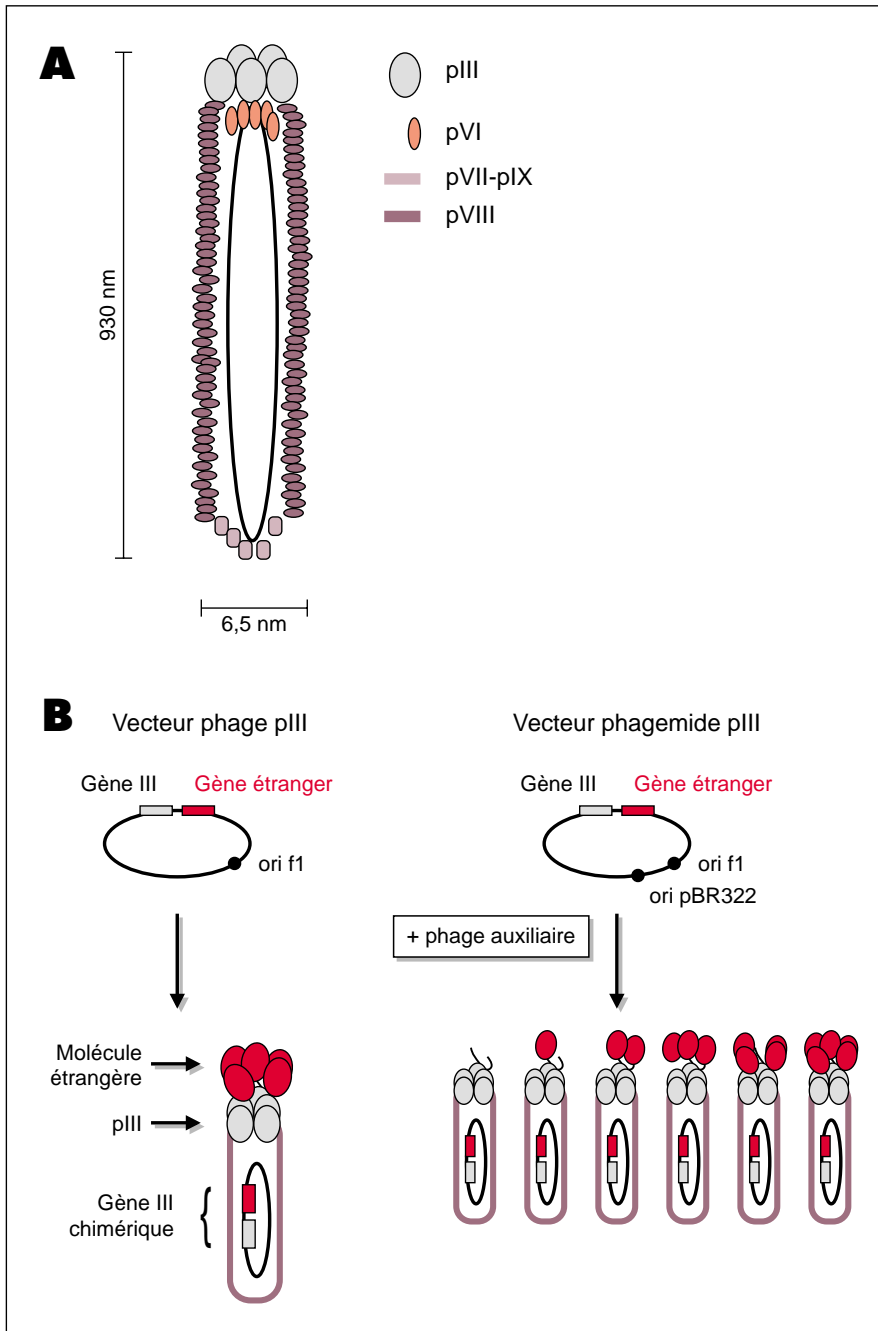


Figure 1. **A. Représentation schématique du bactériophage filamenteux fd.** Le phage présente une longueur de 930 nm et un diamètre de 6,5 nm. Son ADN est logé à l'intérieur d'un cylindre flexible composé d'environ 2700 monomères de protéine pVIII. Une extrémité de la particule présente 5 copies des protéines pVII et pIX tandis que l'autre extrémité présente 5 copies des protéines pIII et pVI. Les protéines pIII exposées sur la tête du phage sont impliquées dans l'attachement aux pili de la bactérie hôte qui précède l'infection. Les protéines pVIII composent le manteau du phage. **B. Exemple d'expression à la surface d'un vecteur phage ou d'un vecteur phagemide.** Dans le cas d'une expression à la surface d'un vecteur phage pIII, toutes les protéines pIII du phage sont fusionnées à la molécule étrangère. Dans le cas d'une expression à la surface d'un vecteur phagemide pIII, la protéine pIII du phagemide fusionnée à la molécule étrangère et la protéine pIII sauvage codée par le phage auxiliaire sont exprimées dans la même cellule. Plusieurs combinaisons d'expression sont possibles et le nombre de molécules étrangères exprimées en surface est variable.

pIII ne semble pas perturber la morphologie du phage. En revanche, le nombre important de protéines pVIII en surface limite la taille des peptides fusionnés à environ 8 acides aminés pour éviter les phénomènes d'encombrement stérique. Pour exposer des peptides plus longs ou pour diminuer la valence des molécules présentées il est nécessaire d'utiliser des vecteurs phagemides

qui permettent une dilution des protéines fusionnées par des protéines sauvages issues du phage auxiliaire (figure 1B). Un facteur limitant la taille des peptides est en fait la taille de la banque nécessaire pour que tous les peptides aléatoires possibles soient représentés. L'efficacité de clonage est telle qu'au-delà de 6 à 7 acides aminés les banques obtenues sont partielles puisqu'elles nécessi-

tent plus de 10^{11} transformants [5]. Cela n'est pas forcément gênant puisque de telles banques ont pu être criblées avec succès. Les banques sont régulièrement régénérées, contrairement aux banques chimiques qui, elles, s'épuisent. Cependant, le caractère « vivant » de ces banques biologiques peut présenter certains désavantages. De nombreux clones, ceux qui sont toxiques

pour l'hôte, ceux qui sont sensibles aux protéases endogènes, ceux qui sont faiblement traduits ou sécrétés ou ceux qui diminuent le pouvoir infectieux des phages, peuvent être absents d'une banque théoriquement complète. De plus, une à deux amplifications successives appauvrissent considérablement la diversité d'une banque car certains clones présentent des avantages de pousse et envahissent rapidement la population. La régénération d'une banque nécessite donc un reclonage des insertions et non pas une simple amplification. La sélection de phages recombinants issus de banques différentes, sur une même cible, identifie parfois des peptides différents révélant ainsi l'importance du contexte de présentation des peptides. Les séquences flanquantes sont importantes, et un peptide peut perdre totalement ses capacités de liaison s'il est synthétisé chimiquement sous forme soluble. Ces observations ont orienté les chercheurs vers la construction de banques « contraintes ».

Les banques dites contraintes présentent les peptides aléatoires dans une conformation qui accepte peu de degrés de liberté. Les peptides peuvent être cycliques (leur séquence est flanquée de deux cystéines formant un pont disulfure), ou abrités dans des structures fixes d'autres protéines telle qu'une boucle hypervariable d'un domaine VH d'immunoglobuline. Une étude systématique du mode de présentation semble indiquer que les peptides contraints présentent souvent des affinités et des spécificités de liaison supérieures aux peptides linéaires et sont plus informatifs sur les sites de liaison. De plus, les versions solubles conservent en général leur capacité de liaison.

Applications

Sélection sur différentes cibles

Les banques de peptides permettent la sélection rapide de peptides capables de se fixer sur une cible immobilisée. En général, la sélection révèle plusieurs peptides différents qui définissent un ou plusieurs consensus. Les consensus sont ensuite testés sous forme soluble pour l'activité recherchée. Lorsque aucun

consensus ne peut être obtenu, il est souvent difficile et onéreux de tester chaque peptide séparément. Un nouveau protocole de sélection ou une nouvelle banque sont alors utilisés.

La cible est un anticorps monoclonal

C'est certainement l'application la plus fréquente de la sélection de peptides sur phage. La localisation du consensus sélectionné dans la séquence de l'antigène (celle-ci est généralement connue), permet l'identification de l'épitope de l'antigène reconnu par l'anticorps. L'identité entre le consensus et l'épitope n'est souvent que partielle mais des expériences de compétition permettent de valider l'interaction. De nombreux épitopes linéaires ont pu être ainsi cartographiés (pour revue [6]). Lorsque l'épitope recherché est conformationnel ou discontinu, les séquences consensus identifiées ne présentent pas d'analogie avec le ligand naturel de l'anticorps. Les peptides sélectionnés correspondent dans ce cas à des mimotopes. Il est également possible de mettre en évidence des épitopes modifiés de manière post-traductionnelle. Westendorf *et al.* (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) ont phosphorylé une banque de peptides de 15 acides aminés et l'ont ensuite sélectionnée sur l'anticorps MPM2 dirigé contre des phosphoprotéines de la phase M des cellules eucaryotes. Après trois tours de sélection, ils ont mis en évidence une séquence consensus fixant l'anticorps uniquement sous sa forme phosphorylée [7].

La cible est une protéine

La sélection de peptides sur protéine purifiée permet, comme dans le cas d'une sélection sur anticorps, d'identifier le site de liaison d'un ligand naturel dont la séquence est déjà connue. En général, l'interrogation de bases de données à partir du consensus obtenu ne permet pas d'identifier un partenaire nouveau. Pour ce type de projets, le système double hybride ou les banques de produits d'ADN complémentaires (ADNc) exposés sur phages (voir plus loin) semblent plus adaptés. Cependant les banques de peptides sur phages représentent un moyen rapide d'identifier les sites d'interac-

tion entre deux protéines connues. La sélection de peptides sur le produit de l'oncogène *HDM2* a permis de confirmer son interaction avec la protéine p53 et d'identifier un peptide potentiellement thérapeutique capable d'inhiber l'interaction de ces deux protéines (pour revue [8]). Plusieurs laboratoires ont isolé des peptides sur des protéines dont le ligand naturel n'est pas peptidique. La sélection sur streptavidine identifie le peptide HPQ (His-Pro-Gln) qui entre en compétition avec la biotine [9]. La sélection sur concanavaleine A, une lectine qui fixe l' α -D-mannopyranoside, identifie le peptide YPY (Tyr-Pro-Tyr) qui entre en compétition avec le sucre et présente une affinité comparable pour la cible [10]. Ces deux exemples montrent que des peptides peuvent mimer un ligand naturel non peptidique sans pour autant former les mêmes contacts avec la cible.

La cible est de l'ADN

La compréhension du mode de reconnaissance protéine-ADN est compliquée car il n'existe pas de correspondance simple établie entre acides aminés et nucléotides. Les protéines à doigts de zinc représentent un modèle idéal pour étudier le mode de reconnaissance de l'ADN car chaque doigt de zinc reconnaît précisément 3 paires de bases consécutives. Choo et Klug (Cambridge, GB) ont mis au point une méthode d'analyse systématique d'une banque de doigts de zinc exprimés sur phage pour établir une base de données doigt de zinc/ADN [11]. Ils ont utilisé ce « code syllabique » pour trouver les doigts de zinc se fixant sur une séquence de 9 pb représentant la jonction des oncogènes *BCR* et *ABL* sur l'ADNc p190 *BCR-ABL*. Les doigts de zinc se fixant sur chacun des trois codons ont été associés dans l'ordre approprié puis testés sur la séquence cible. La spécificité obtenue *in vitro* est remarquable et la protéine en doigt de zinc synthétique, produite dans des cellules eucaryotes, bloque la transcription de l'ADN possédant la séquence cible.

La cible est un récepteur purifié

La sélection sur récepteur purifié représente un immense intérêt pharmacologique. Le but ici est de trou-

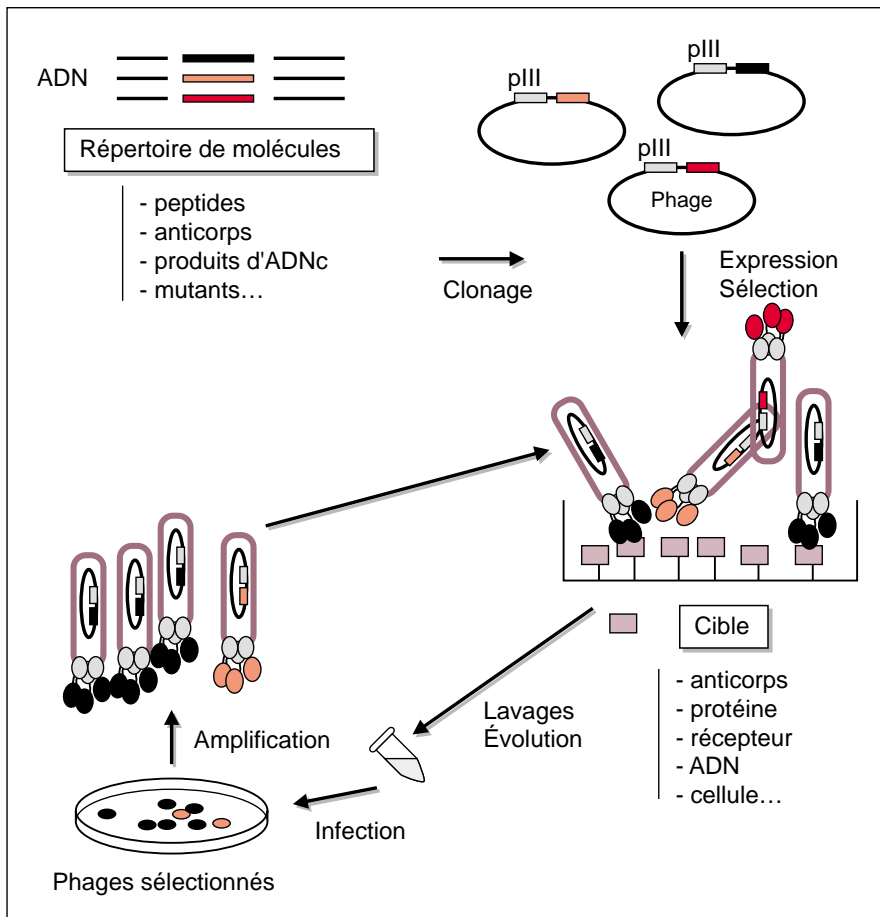


Figure 2. **Sélection d'un répertoire de molécules exprimées à la surface de phages filamenteux pour leur liaison à une cible (biopanning).** Le mélange de phages est incubé avec la cible en milieu de saturation. Après plusieurs lavages, les phages fixés sont élués puis utilisés pour infecter des bactéries en phase exponentielle de croissance. Les phages sélectionnés sont ensuite amplifiés puis utilisés pour un nouveau tour de sélection.

ver de nouveaux agonistes ou antagonistes sans se préoccuper du côté « naturel » de ces molécules. De nombreuses sélections ont été réalisées avec succès. La sélection sur le récepteur de l'érythropoïétine (REPO) a identifié plusieurs peptides cycliques dont les séquences diffèrent de celle de l'érythropoïétine et qui se fixent plus faiblement sur le récepteur. Les études fonctionnelles montrent qu'ils induisent la dimérisation du REPO, la transmission du signal associé ainsi que la croissance et la différenciation de cellules murines (pour revue [8]). Ce travail important montre qu'il est possible de sélectionner de petits peptides biologiquement actifs, capables de mimer des hormones, et représentant une nouvelle classe de

molécules thérapeutiques (*m/s n° 10, vol. 12, p. 1124*). Les sélections sur intégrines, protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire, identifient les consensus RGD (Arg-Gly-Asp) et KGD (Lys-Gly-Asp) (pour revue [6]). Ces deux peptides sont présents dans les venins de serpents connus pour inhiber l'agrégation plaquettaire. Ils inhibent la liaison de nombreuses cellules à la fibronectine.

La cible est un mélange complexe

Sélection sur cellules

La sélection sur cellules est très importante puisque de nombreuses cibles sont des récepteurs transmembranaires difficiles à purifier ou à reconstituer sans membrane, ou encore des récepteurs inconnus. Le problème

majeur rencontré est évidemment le bruit de fond car de nombreux phages se fixent de manière non spécifique sur la surface cellulaire. Plusieurs essais sont réalisés dans différents laboratoires et pour l'instant peu de résultats sont publiés. Il semble important de choisir des récepteurs fortement exprimés et d'éluier les phages fixés par compétition avec un agoniste. Il est possible de pratiquer des sélections dites négatives sur des cellules qui ne possèdent pas le récepteur cible pour épuiser la banque de tous les phages non concernés. Une stratégie prometteuse consiste à surexprimer le récepteur cible dans deux types cellulaires différents. La sélection de peptides en alternance sur les deux types cellulaires permet de se débarrasser progressivement du bruit de fond. La sélection sur plaquettes entières a permis d'isoler plusieurs peptides dont le peptide RGD, déjà isolé sur intégrines purifiées et connu pour inhiber l'agrégation plaquettaire (pour revue [8]).

Sélection sur animal

Un travail novateur démontre la possibilité de sélection *in vivo*. Après injection intraveineuse d'une banque de peptides cycliques à une souris, les différents organes de l'animal ont été broyés et les phages correspondants amplifiés [12]. Plusieurs tours de sélection ont permis d'identifier des peptides qui présentent une forte spécificité pour le cerveau et les vaisseaux du rein. Certains organes, tels que le foie ou les poumons, capturent trop de phages et rendent la sélection impossible. Des globules rouges recouverts de ces peptides spécifiques ont ensuite été injectés par voie intraveineuse puis localisés dans les organes cibles. Ces expériences ouvrent un champ important d'applications pour le ciblage spécifique de médicaments dans certaines cellules (en particulier les cellules tumorales) ou dans certains tissus.

Sélection sur sérums de patients

La sélection de peptides sur sérums de patients permet d'identifier des épitopes spécifiques de maladies infectieuses ou auto-immunes sans avoir besoin de connaître la nature de l'antigène pathogène. Les peptides isolés réagissent contre les anticorps présents dans les sérums de malades mais pas avec ceux des

sérums témoins. En fait, ces peptides miment l'antigène pathogène (pour revue [8]). L'immunisation à l'aide de ces peptides immunogènes peut représenter un moyen rapide de produire des anticorps neutralisants.

Sélection de phages-substrats

L'équipe de Jim Wells (Genentech, CA, USA) a développé une approche astucieuse pour sélectionner des substrats de protéases [13]. Ils ont exprimé sur phage, de façon monovalente, des protéines de fusion tripartites qui possèdent un domaine amino-terminal capable de se fixer sur un support solide, suivi d'une séquence peptidique aléatoire (substrat potentiel de protéases), puis du domaine carboxy-terminal de pIII. Après fixation sur le support solide, les phages qui expriment les substrats potentiels sont traités par la protéase étudiée (la subtilisine ou le facteur Xa). Les phages qui exposent un peptide substrat sont alors libérés et amplifiés, alors que les phages qui exposent un peptide résistant à la protéolyse restent fixés (figure 3). Cette technique a également été appliquée à d'autres enzymes [13].

Immunitation

Par définition, les peptides isolés pour leur liaison à un anticorps peuvent présenter certaines propriétés d'anti-idiotypes telles que le pouvoir immunogène (pour revue [6]). Il est parfois possible d'identifier des mimotopes qui ressemblent à l'antigène original, mais qui sont suffisamment dégénérés pour présenter différents spectres de réactions croisées. Par exemple, un mimotope sélectionné sur un anticorps spécifique d'un sous-type du virus de l'hépatite B (HBV) a permis d'induire une réponse humorale anti-HBV non restreinte et donc plus protectrice. Il s'agit cependant de cas heureux car il arrive également que les anticorps dirigés contre des peptides mimotopes ne soient pas capables de reconnaître l'antigène original et, dans ce cas, les mimotopes injectés ne présentent aucun pouvoir protecteur. Le phage lui-même représente un excellent vecteur pour l'immunisation. Greenwood *et al.* (Cambridge, GB) ont exposé le peptide corres-

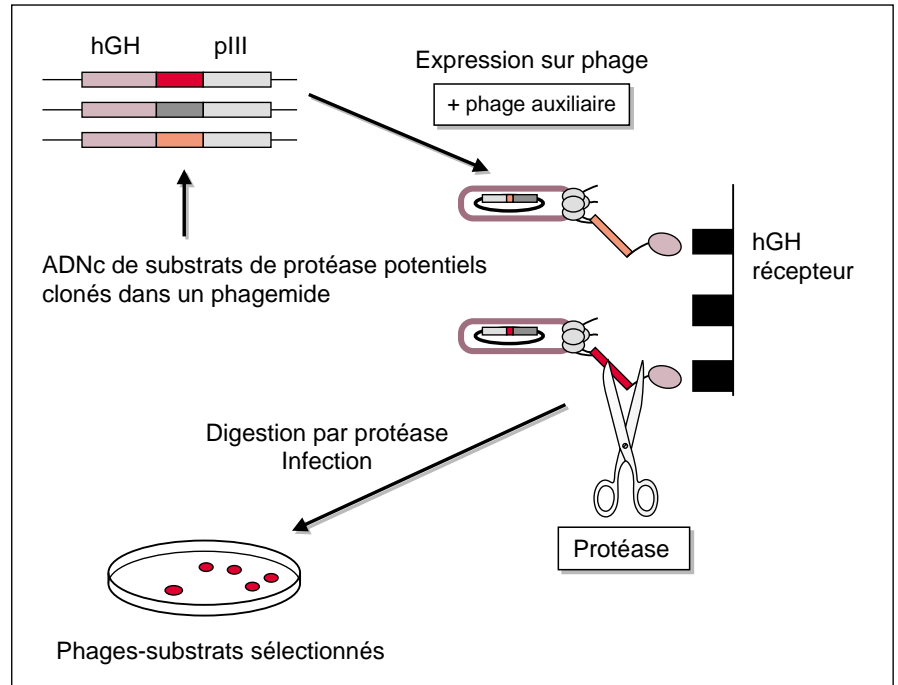


Figure 3. **Sélection de phages-substrats.** Les phages monovalents codant pour des substrats potentiels fusionnés à l'hormone de croissance (hGH, human growth hormone), sont incubés avec le récepteur de l'hormone (hGH récepteur). Après traitement par la protéase d'intérêt, les phages porteurs de peptides substrats sont libérés et utilisés pour infecter des bactéries en phase exponentielle. Les phages sélectionnés peuvent éventuellement être amplifiés pour réaliser une nouvelle sélection.

pondant à l'antigène de surface majeur de *Plasmodium falciparum* à la surface de pVIII. Les phages porteurs de peptides injectés se sont avérés fortement immunogènes [14]. Il est possible d'imaginer la construction de phages « super-immunogènes » présentant simultanément des épitopes B et T ainsi qu'une cytokine immunostimulante.

Les banques combinatoires d'anticorps

Une application essentielle du phage filamenteux a été la construction de banques combinatoires de fragments d'anticorps (pour revue [4, 15]). Les domaines variables d'un anticorps peuvent être exprimés sur phage, soit sous forme de fragments scFv (*single chain Fv*), dans lesquels les domaines VH et VL réarrangés sont liés de manière covalente par un court peptide, soit sous forme de fragments Fab. Cette technique a permis d'obtenir de nombreux anticorps

monoclonaux et s'est avérée particulièrement intéressante dans le cas d'anticorps humains pour lesquels les hybridomes sont techniquement et éthiquement difficiles à obtenir. Le répertoire immunitaire naïf d'un animal (répertoire avant la rencontre avec les antigènes) contient des anticorps capables de se fixer sur la plupart des molécules avec des affinités modérées ($K_a \sim 10^6-10^7 M^{-1}$). Ce répertoire dérive du réarrangement combinatoire des différents gènes V dans les cellules souches (figure 4). Chaque cellule B ($\sim 10^8$ chez la souris et 10^{12} chez l'homme) exprime une seule combinaison VH et VL, qui résulte d'un réarrangement V-D-J pour la chaîne lourde et V-J pour la chaîne légère. L'immunisation induit la prolifération des cellules B qui reconnaissent l'immunogène, leur différenciation en plasmocytes et la sécrétion de l'anticorps correspondant. Une maturation de l'affinité des anticorps est effectuée par un processus de sélection d'hypermuta-

tions somatiques. C'est à ce stade que les cellules B sont généralement récoltées pour préparer les hybridomes.

Les gènes réarrangés VH et VL des anticorps peuvent être amplifiés séparément par PCR (*polymerase chain reaction*), associés au hasard, puis clonés dans des phages permettant d'obtenir ainsi des banques combinatoires (figure 4). Dans le cas de banques construites à partir d'une source « immunisée », des fragments d'anticorps de forte affinité pour l'immunogène peuvent être sélectionnés directement. Dans le cas de banques construites à partir du répertoire naïf, des anticorps d'affinité modérée peuvent être sélectionnés contre une grande variété d'antigènes sans recourir à l'immunisation [16]. Les banques combinatoires naïves dites naturelles, sont construites à partir des gènes réarrangés VH (V-D-J) et VL (V-J) de l'animal. Les banques combinatoires naïves dites synthétiques, sont construites à partir des différents gènes (V, D, J) non réarrangés. Leur réarrangement est réalisé *in vitro* par PCR. L'utilisation d'oligonucléotides aléatoires correspondant aux régions CDR (*complementarity determining regions*) [17] permet d'augmenter la diversité de la banque. Il a été montré que plus la banque combinatoire naïve est complexe, plus il est possible d'isoler des anticorps contre n'importe quel antigène et plus leur affinité est élevée. L'infection combinatoire a permis d'obtenir des banques naïves de plus de 10^{10} fragments Fab différents présentant de bonnes affinités ($K_a \sim 10^8-10^9 M^{-1}$) pour une très grande variété d'antigènes [18]. Bien des aspects du système immunitaire naturel sont donc ainsi copiés. Souvent, des processus de maturation *in vitro* doivent être appliqués pour obtenir les « meilleurs » anticorps en terme de spécificité et d'affinité. Les permutations de chaînes qui ont lieu durant le développement des cellules B peuvent être mimées *in vitro* par la technique de l'échange de chaînes (*chain shuffling*) dans laquelle une chaîne (VH ou VL) est gardée puis réassociée à toutes les autres chaînes de la banque (pour

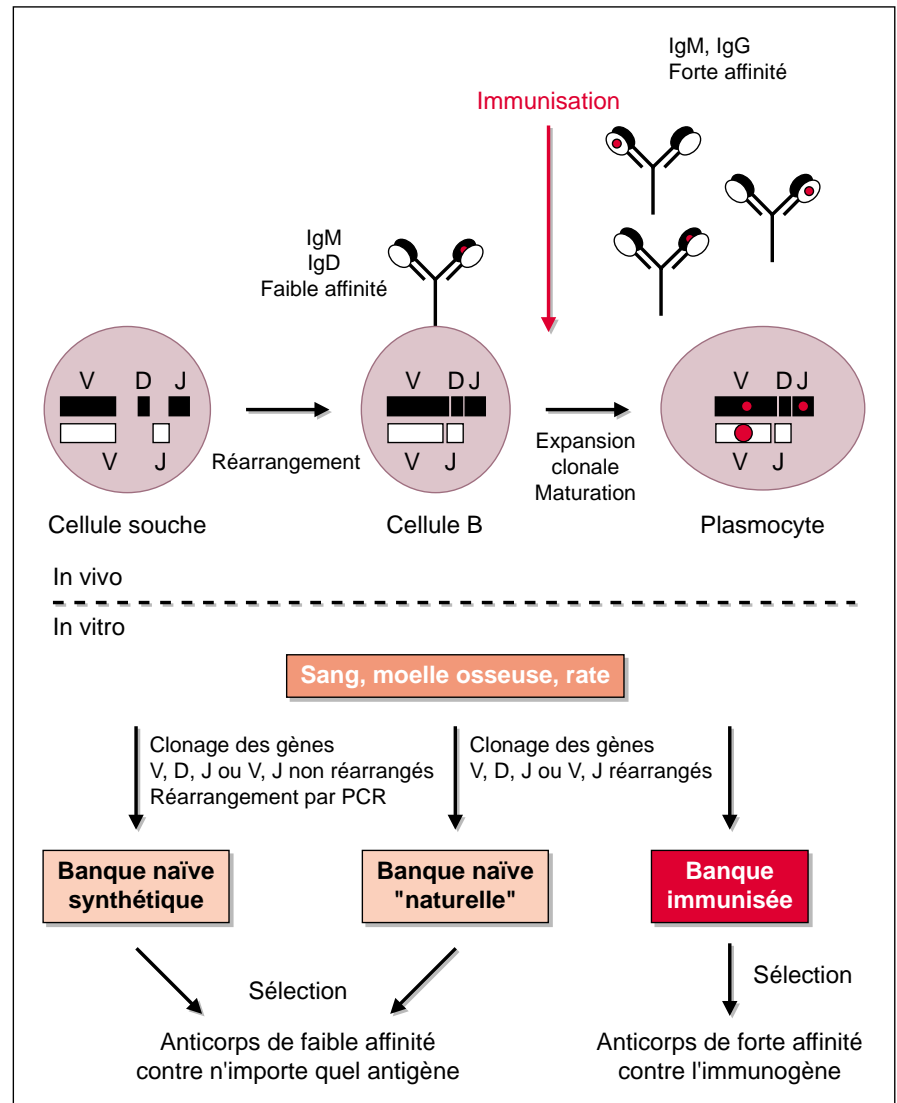


Figure 4. **Production d'anticorps.** In vivo, après réarrangement des différents gènes variables dans les cellules B, les anticorps naïfs sont exprimés en surface sous forme d'IgM et d'IgD. Après immunisation, les clones qui reconnaissent l'immunogène prolifèrent (expansion clonale) et se différencient en plasmocytes qui sécrètent les anticorps sous forme d'IgG (commutation de classe). Des mutations somatiques (représentées dans le schéma par des points rouges), s'accumulent dans les régions variables et conduisent, après sélection, à une augmentation de l'affinité des anticorps pour l'immunogène. Les banques combinatoires permettent de mimer ce processus in vitro.

revue [4]). La maturation de l'affinité est également assurée par introduction de mutations dans les CDR des fragments sélectionnés. Le système artificiel des banques combinatoires s'est donc avéré particulièrement intéressant pour toute production d'anticorps pour laquelle l'immunisation est difficile voire

impossible. C'est le cas de certains anticorps humains ou encore d'anticorps dirigés contre des molécules très conservées non immunogènes. Il est également utile pour l'étude du répertoire immunitaire de patients infectés par certains virus pathogènes ou de patients atteints de maladies auto-immunes [19].

Banques de produits d'ADN complémentaires présentés sur phage filamenteux

La présentation de produits d'ADNc à la surface du phage filamenteux est très séduisante car elle permet de sélectionner les ligands naturels de n'importe quelle cible. Jacobsson et Frykberg (Uppsala, Suède) ont exprimé une banque complète d'ADNc de *Staphylococcus aureus* à la surface de pVIII [20]. Leur sélection s'est avérée particulièrement efficace puisque la majorité des clones sélectionnés présentaient des séquences de protéines connues pour se lier aux différents cibles testées. Cependant, les ADNc eucaryotes ne peuvent être exprimés directement en fusion avec pIII ou pVIII à cause des sites de terminaison de transcription présents dans leur région 3' non codante. Cramer et Suter (Davos, Suisse) ont développé une stratégie astucieuse, fondée sur l'association des protéines Jun et Fos, pour lier de manière covalente le produit de l'ADNc à la surface du phage. Les gènes *Jun* et *Fos* sont exprimés à partir de deux promoteurs *lacZ* distincts du phagemide pComb3. Dans le phage pJuFo, *Jun* est exprimé en fusion avec *pIII* tandis que le produit de *Fos* est synthétisé en fusion amino-terminale avec les produits des ADNc de la banque. Pour éviter la perte de la paire phage/ADNc, l'association Jun-Fos a été rendue covalente grâce à des ponts disulfure (figure 5). Les auteurs ont présenté sur phage une banque complète de produits d'ADNc d'*Aspergillus fumigatus* qu'ils ont sélectionnés avec succès sur sérum IgE humain [21].

Cassettes de mutagenèse, l'évolution in vitro

Le phage filamenteux représente une excellente cassette de mutagenèse. Une protéine exprimée en surface du phage est mutée de manière aléatoire puis sélectionnée pour l'activité recherchée, le plus souvent la liaison à une cible. De nombreuses protéines exprimées à la surface de phages ont conservé leur activité et ont pu être ainsi « améliorées » (Tableau I). La

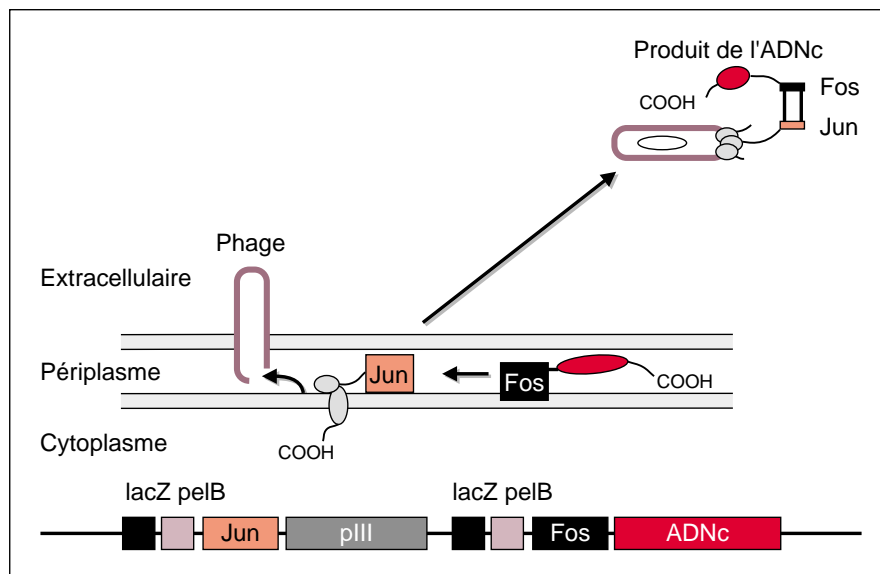


Figure 5. **Expression d'ADNc à la surface du phagemide pJuFo.** Les constructions Jun-pIII et Fos-ADNc sont sous le contrôle de deux promoteurs *lacZ* distincts. Le peptide signal *pelB* permet le passage des protéines dans l'espace périplasmique bactérien. La protéine Jun est fusionnée à la protéine pIII du phage et la protéine Fos est fusionnée au produit de l'ADNc. L'association Jun-Fos est rendue covalente à l'aide de ponts disulfures. L'ADNc et son produit exprimé en surface sont donc liés physiquement sur la même molécule de phage.

taille des protéines ne semble pas être un paramètre limitant; en revanche, la protéine doit supporter la sécrétion de pIII ou pVIII à travers l'environnement périplasmique oxydant de la bactérie lors de l'assemblage du phage. C'est pourquoi le système semble plus efficace pour des protéines normalement extracellulaires ou sécrétées. Cette application est fréquemment utilisée pour augmenter l'affinité d'un fragment d'anticorps pour l'antigène. Dans ce cas plusieurs stratégies de mutagenèse ont été envisagées. L'anticorps peut être muté de manière totalement aléatoire, soit en augmentant fortement le taux d'erreurs de la Taq polymérase, soit à l'aide d'une souche bactérienne mutatrice [22]. Une autre stratégie consiste à utiliser les techniques d'analyse structurale classiques pour identifier les résidus importants. Ensuite, deux à trois positions seulement sont mutées simultanément, ce qui réduit la complexité de la banque de mutants nécessaire, puis les positions optimales sélectionnées sont combinées pour obtenir le « meilleur mutant ». Nous avons choisi cette

approche « semi-rationnelle » d'analyse par résonance magnétique nucléaire et modélisation moléculaire suivie de mutagenèse aléatoire pour augmenter l'affinité d'un anticorps anti-phényloxazolone [23].

Importance du mode de sélection

Il est toujours possible d'éluer des phages après chaque tour de sélection, de les amplifier, et de recommencer... Il est, hélas, très fréquent d'être déçu: le ligand sous forme soluble ne se fixe plus sur la cible; il se fixe *in vitro* sur la cible purifiée, mais pas *in vivo*; il se fixe *in vivo* mais ne présente aucune activité, ce qui est gênant lors de la recherche d'agonistes ou d'antagonistes de récepteurs, lors de la recherche d'enzymes modifiées actives ou encore lors de la recherche d'anticorps bloquants ou d'anticorps catalytiques !

Des modes de sélection sophistiqués et plus adaptés à chaque problématique ont donc fait leur apparition. Le système SAP [24] ou SIP [25] permet de coupler la reconnaissance

Tableau I

PROTÉINES FONCTIONNELLES PRÉSENTÉES À LA SURFACE DE PHAGES

Protéines	Références
Facteurs de croissance/cytokines	
hGH	revue [5]
IL-8	revue [5]
CNTF	[28]
TNF	revue [5]
hIL6	[29]
hIL2	[30]
hIL3	revue [5]
hEGF	[27]
Récepteurs / Lectines	
Ricine (chaîne B)	revue [5]
Récepteur IgE (FcεRI chaîne α)	revue [5]
Récepteur PDGF	revue [5]
CD4	revue [5]
Protéine A (domaine B)	revue [5]
Enzymes	
Glutathion transférase	[31]
Phosphatase alcaline	revue [5]
Nucléase de staphylocoque	revue [5]
β-lactamase	[26]
Trypsine	revue [5]
Inhibiteurs de protéases	
Inhibiteur du précurseur amyloïde β (APPI)	revue [5]
Inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine (BPTI)	revue [5]
Inhibiteur de la coagulation associé aux lipoprotéines (LACI-DI)	[32]
Inhibiteur de la papaïne (cystatine)	[33]
Inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1)	revue [5]
Fragments d'anticorps et de récepteurs T	
Fab	revue [5]
scFv	revue [5], [34]
Chaîne α de récepteur T	[35]
Protéine à doigts de zinc Zif268	revue [5]
gag VIH	[36]
Peptide auriculaire natriurétique (ANP)	revue [5]

anticorps-antigène à l'infectiosité du phage. Les fragments d'anticorps exprimés à la surface de protéines pIII défectueuses sont sélectionnés sur une cible couplée à une pIII sauvage ou complémentaire. Seuls les phages porteurs d'anticorps liés à la cible-pIII sont infectieux et amplifiés dans *E. coli*. Soumillion *et al.* ont mis au point une méthode astucieuse pour sélectionner des enzymes selon leur activité catalytique [26]. La β-lactamase exprimée sur phage est incu-

bée avec un substrat inhibiteur suicide lié à la biotine. Lorsque l'enzyme est active, après réaction avec le substrat, les phages sont marqués à la biotine et se fixent sur des billes de streptavidine. L'enrichissement en phages porteurs d'enzyme active après un seul tour de sélection est très convaincant.

La recherche d'agonistes ou d'antagonistes de ligands naturels peut également être très décevante. En effet, de nombreux ligands sélectionnés

sur récepteur ne présentent ensuite aucune activité en terme de transmission du signal. Dans le laboratoire, nous avons développé un système de criblage fonctionnel permettant de détecter rapidement des agonistes ou antagonistes de l'EGF humain [27]. Une lignée stable a été établie qui exprime la luciférase sous le contrôle de l'*enhancer* SIE du gène *c-Fos* impliqué dans la voie de transmission du signal EGF. Lorsque cette lignée est stimulée par de l'EGF soluble ou du phage-EGF, une forte activité luciférase est mesurée. L'étude de plusieurs mutants de l'EGF exprimés à la surface du phage permet de détecter les positions cruciales de la molécule. La caractérisation de différents ligands, à la fois pour leur liaison au récepteur et pour leur activité de transmission, identifie rapidement les agonistes et antagonistes potentiels de l'EGF.

Conclusion

La technologie du *phage display* se développe dans de très nombreux laboratoires. Les limitations du système, taille des répertoires, maturation *in vitro*, sélections adaptées..., sont résolues progressivement. Les protocoles de sélection classiques sont aujourd'hui très simples et seules les connaissances de bactériologie classiques sont requises. Selon l'activité recherchée, le choix du mode de sélection peut s'avérer crucial. La sélection peut s'opérer sur cible fixée sur support solide (plaque ELISA, boîte de Pétri, immunotube, agarose) ou sur cible en solution, en général marquée à la biotine. Les conditions expérimentales: le milieu de saturation des sites non spécifiques, la présence de détergent lors des lavages, l'élution (pH acide, alcalin, infection directe sans élution, élution spécifique par compétition avec un ligand) sont à déterminer pour chaque problématique. La sélection sur cellules représente un enjeu très important mais les problèmes de bruit de fond restent difficiles à résoudre. Peu de résultats sont publiés par rapport aux efforts engagés.

La construction de banques est un investissement important. Dans les cas où des répertoires particuliers ne

sont pas requis, il semble plus judicieux d'obtenir des banques « prêtes à l'emploi » déjà construites qui sont distribuées par les laboratoires de recherche. La sélection de plusieurs banques différentes sur une même cible d'intérêt permet d'éviter de nombreuses déceptions. Les banques de longs peptides (30 à 40 acides aminés) qui sont théoriquement partielles, semblent cependant très efficaces puisqu'elles ont permis la sélection de clones spécifiques et affins alors qu'aucun peptide court n'avait pu être identifié (D. Capra, communication personnelle). Il semble que la structure des peptides soit en fait très importante. La présentation de molécules structurées (hélices α , feuillet β ...) représente aujourd'hui un axe de recherche important ■

Remerciements

Nous remercions Lutz Riechmann, Andrew Griffiths et Yvan Boublik pour leur discussions constructives. Nous remercions le professeur Gérard Lefranc pour sa correction critique et attentive. Nous remercions chaleureusement Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins ainsi que la fondation Marcel Mérieux pour leur accueil et l'organisation des sessions phages aux « Pensières ». Nous remercions le Centre National de la Recherche Scientifique, le ministère de l'Éducation nationale, de la Recherche et de la Technologie, le ministère des Affaires étrangères (Programme d'Actions Intégrées Franco-Britannique), l'Association pour la Recherche sur le Cancer, la Ligue pour la Recherche sur le cancer et la Société Française d'Immunologie.

RÉFÉRENCES

1. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228: 1315-7.
2. Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988; 73: 305-18.
3. Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990; 249: 386-90.
4. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 433-55.
5. Clackson T, Wells JA. *In vitro* selection from protein and peptide libraries. *Trends Biotechnol* 1994; 12: 173-84.

6. Cortese R, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, Galfre G, Pessi A, Tramontano A, Sollazzo M. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. *Curr Opin Biotechnol* 1995; 6: 73-80.
7. Westendorf JM, Rao PN, Gerace L. Cloning of cDNAs for M-phase phosphoproteins recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 714-8.
8. Cortese R, Monaci P, Luzzago A, Santini C, Bartoli F, Cortese I, Fortugno P, Galfre G, Nicosia A, Felici F. Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Curr Opin Biotechnol* 1996; 7: 616-21.
9. McLafferty MA, Kent RB, Ladner RC, Markland W. M13 bacteriophage displaying disulfide-constrained microproteins. *Gene* 1993; 128: 29-36.
10. Scott JK, Loganathan D, Easley RB, Gong X, Goldstein IJ. A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5398-402.
11. Choo Y, Klug A. Physical basis of a protein-DNA recognition code. *Curr Opin Struct Biol* 1997; 7: 117-25.
12. Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* 1996; 380: 364-6.
13. Matthews DJ, Goodman LJ, Gorman CM, Wells JA. A survey of furin substrate specificity using substrate phage display. *Protein Sci* 1994; 3: 1197-205.
14. Greenwood J, Willis AE, Perham RN. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J Mol Biol* 1991; 220: 821-7.
15. Barbas CF III. Recent advances in phage display. *Curr Opin Biotechnol* 1993; 4: 526-30.
16. Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorick BD, Hughes JN, *et al.* Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J* 1993; 12: 725-34.
17. Hoogenboom H, Winter G. Bypassing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*. *J Mol Biol* 1992; 227: 381-8.
18. Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ, *et al.* Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* 1994; 13: 3245-60.
19. Barbas CF III, Collet TA, Amberg W, Roben P, Binley JM, Hoekstra D, Cababa D, Jones TM, Williamson RA, Pilkington GR, *et*

- al.* Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J Mol Biol* 1993; 230: 812-23.
20. Jacobsson K, Frykberg L. Phage display shot-gun cloning of ligand-binding domains of prokaryotic receptors approaches 100% correct clones. *Biotechniques* 1996; 20: 1070-6.
21. Cramer R, Jaussi R, Menz G, Blaser K. Display of expression products of cDNA libraries on phage surfaces. A versatile screening system for selective isolation of genes by specific gene-product/ligand interaction. *Eur J Biochem* 1994; 226: 53-8.
22. Low NM, Holliger PH, Winter G. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J Mol Biol* 1996; 260: 359-68.
23. Riechmann L, Weill M. Phage display and selection of a site-directed randomized single-chain antibody Fv fragment for its affinity improvement. *Biochemistry* 1993; 32: 8848-55.
24. Duenas M, Borrebaeck CAK. Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and phage replication. *Bio/Technology* 1994; 12: 999-1002.
25. Krebber C, Spada S, Desplancq D, Krebber A, Ge L, Pluckthun A. Selectively-infective Phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel *in vitro* selection for Protein-ligand interactions. *J Mol Biol* 1997; 268: 607-18.
26. Soumillion P, Jespers L, Bouchet M, Marchand BJ, Winter G, Fastrez J. Selection of beta-lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J Mol Biol* 1994; 237: 415-22.
27. Souriau C, Fort P, Roux P, Hartley O, Lefranc M-P, Weill M. A simple luciferase assay for signal transduction activity detection of epidermal growth factor displayed on phage. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 1585-90.
28. Saggio I, Gloaguen I, Poiana G, Laufer R. CNTF variants with increased biological potency and receptor selectivity define a functional site of receptor interaction. *EMBO J* 1995; 14: 3045-54.
29. Toniatti C, Cabibbo A, Sporena E, Salvati AL, Cerretani M, Serafini S, Lahm A, Cortese R, Ciliberto G. Engineering human interleukin-6 to obtain variants with strongly enhanced bioactivity. *EMBO J* 1996; 15: 2726-37.
30. Buchli PJ, Wu Z, Ciardelli TL. The functional display of interleukin-2 on filamentous phage. *Arch Biochem Biophys* 1997; 339: 79-84.
31. Widersten M, Mannervik B. Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants. *J Mol Biol* 1995; 250: 115-22.
32. Markland W, Ley AC, Lee SW, Ladner RC. Iterative optimization of high-affinity proteases inhibitors using phage display. I. Plasmin. *Biochemistry* 1996; 35: 8045-57.

RÉFÉRENCES

33. Tanaka AS, Sampaio CA, Fritz H, Auerswald EA. Functional display and expression of chicken cystatin using a phagemid system. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 389-95.

34. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990; 348: 552-4.

35. Onda T, LaFace D, Baier G, Brunner T, Honma N, Mikayama T, Altman A, Green DR. A phage display system for detection of T cell receptor-antigen interactions. *Mol Immunol* 1995; 32: 1387-97.

36. Tsunetsugu YY, Tatsumi M, Robert V, Devaux C, Spire B, Chermann JC, Hirsch I. Expression of an immunogenic region of HIV by a filamentous bacteriophage vector. *Gene* 1991; 99: 261-5.

Christelle Souriau

Étudiante en thèse

The Duc Hua

Étudiant en stage postdoctoral

Marie-Paule Lefranc

Professeur universitaire, université Montpellier II

Mylène Weill

Maître de conférences, Université Montpellier II. Laboratoire d'immunogénétique moléculaire, Institut de génétique moléculaire, UMR Cnrs 5535, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

Summary

Phage display technology, a wide range of applications

The phage display is becoming a very powerful technology. Filamentous phages can present on their surface either peptides, proteins or antibody fragments. Peptide libraries are selected on antibodies to rapidly map epitopes, or on purified target to identify interaction sites. Selection on receptors identifies new therapeutic ligands while selection on enzymes identifies new substrates. New protocols are leading to selection on more complex targets as cells, patient serums or tissues. Combinatorial antibody libraries represent a performant alternative to hybridoma technology. Libraries constructed from immunised repertoires allow rapid selection of high affinity binders. Libraries constructed from naive repertoires allow isolation of low affinity antibodies against a large range of antigens without the need of immunisation. Naive libraries are particularly interesting to isolate human or anti-self antibodies. A large number of biologically active proteins have been expressed on phage and submitted to several rounds of modification/selection on target. This « *in vitro* evolution » represents an excellent tool for structure-function analysis. This review summarises several applications which are developed in an increasing number of laboratories.

TIRÉS À PART

M. Weill.

SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE

Séance du 13 mai 1998 - 16 heures - La Mélatonine

Y. TOUITOU (Hôpital Pitié-Salpêtrière - Paris) - La mélatonine, un agent de synchronisation

A. D. STROSBURG (CNRS - Paris) - Récepteurs de la mélatonine, Structure et fonctions

P. CHEMINEAU (INRA - Tours) - Mélatonine et reproduction

J. SERVIÈRE (INRA - Jouy-en-Josas) - Rôle des mitochondries dans le vieillissement

CHU Pitié-Salpêtrière, 91, boulevard de l'Hôpital,
75013 Paris, France (salle 219)

Renseignements : Secrétariat de la Société de Biologie, Collège de France,
3, rue d'Ulm, 75231 Paris Cedex 05 - Tél./Fax : 01 44 27 13 40

Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule

Enseignement Pratique

9 mars-10 avril 1998

Responsables du cours : A. Dautry-Varsat et D. Louvard

Secrétariat des Enseignements et des Stages

Institut Pasteur,

28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
Tél. : 01 45 68 81 41 ou 01 40 61 33 62 - Fax : 01 40 61 30 46

EMBO WORKSHOP

25-28 mars 1998

St. Catherine's College, University
of Oxford, Royaume-Uni

Protein Folding and Misfolding inside
and outside the Cell

Organisateurs: John Ellis, Chris Dobson, Chris Leaver

Principaux thèmes

- The principles of protein folding, from both theoretical and experimental viewpoints.
- The roles of molecular chaperones, with emphasis on protein folding *in vivo*.
- Protein misfolding and aggregation, with emphasis on the molecular origins of human diseases associated with protein folding.

Renseignements complémentaires

<http://www.ocms.ox.ac.uk/ocms/EMBOworkshop.html>

Secrétariat: Lindsay Battle,
Oxford Centre for Molecular
Sciences, New Chemistry
Laboratory, South Parks Road,
Oxford, UK, OX1 30T.
Telephone: +44 1865 275698.
Fax: +44 1865 275905
Email:
Lindsay.Battle@ocms.ox.ac.uk