

Sommaire

GLOSSAIRE

PRÉSENTATION DU GEIHP	1
1. Le laboratoire	1
2. L'organisation	1
3. La thématique de recherche	1
I. INTRODUCTION	2
II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. <i>Scedosporium apiospermum</i>	3
1.1. Taxonomie	3
1.1.1. Caractères culturels	3
1.1.2. Morphologie macroscopique	3
1.1.3. Morphologie microscopique	3
1.1.4. Habitat	4
1.2. Pouvoir pathogène	4
1.2.1. Pathologies	4
a) Inoculation suite à un traumatisme	4
b) La dissémination invasive	5
c) La colonisation des cavités chez les patients atteints de mucoviscidose	5
1.2.2. Facteurs de virulence	6
1.2.3. Diagnostic	6
1.2.4. Thérapeutique	7
2. Les catalases	7
2.1. Les catalases typiques dites monofonctionnelles.	8
2.2. Les catalases-peroxydases	8
2.3. Les catalases non-héminiques dites à manganèse	8
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES	9
1. Matériel biologique	9
1.1. Souche utilisée	9
1.2. Entretien du champignon	9
1.3. Culture en milieu liquide	9
1.4. Extraction des constituants cellulaires	9
2. Fractionnement par chromatographie	9
2.1. Chromatographie échangeuse d'anions (CEA)	9
2.2. Chromatographie d'Interactions Hydrophobes	10
2.3. Chromatographie de Gel Filtration	10
2.4. Analyses électrophorétiques	11
2.4.1. Migration dans un gel de polyacrylamide	11
2.4.2. Coloration au Bleu de Coomassie	12
2.4.3. Coloration à l'argent	12
2.4.4. Western Blot	12
2.4.5. Immunodétection sur membrane	13
3. Recherche de l'activité catalasique	13
3.1. Par production d'oxygène	13
3.2. Coloration négative de Woodbury et Coll	14
4. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	15
5. Production d'anticorps monoclonaux	16
5.1. Immunisation des souris	16

5.2.	Amplification du myélocyte P3X63 Ag8	16
5.3.	Préparation et dépôt des macrophages	16
5.4.	Récupération des splénocytes	16
5.5.	Récupération des P3X63 Ag8.....	17
5.6.	Hybridation somatique (Fusion)	17
IV.	RÉSULTATS	17
1.	Analyse de l'extrait fongique de <i>Scedosporium apiospermum</i>	17
2.	Purification de la catalase A2.	19
2.1.	Purification partielle par DEAE	19
2.2.	Purification de la catalase A2.....	19
3.	Immunisation des souris	21
3.1.	Contrôle d'immunisation des souris.....	21
3.2.	Réactivité des IS en Western-Blot.....	22
4.	Fusion et clonage	22
4.1.	Rendement des fusions	22
4.2.	Criblage primaire	22
4.3.	Criblage secondaire.....	23
4.4.	Clonage	23
4.5.	Immunoréactivité sur membrane.....	23
V.	DISCUSSION	24
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	26
	ANNEXES.....	27
	BIBLIOGRAPHIE.....	33
	TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	1
	TABLE DES TABLEAUX.....	1
	TABLE DES ANNEXES.....	2

Glossaire

GEIHP : Groupe d'Etudes des Interactions Hôte-Pathogène

DEAE-Triacryl : DiEthylAminoEthyl Trisacryl

CV : Volume de Colonne

BSA : Bovine Serum Albumin

HRPO : Peroxydase Raifort

IgG : Immunoglobulines G

IS : Immunsérum

PBS : Phosphate Buffered Saline

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

YPD : Yeast Extract-Peptone-Dextrose

YPDA : Yeast Extract-Peptone-Dextrose-Agar

SVF : Sérum de Veau Fœtal

HAT : Hypoxanthine-Aminoptérine-Thymidine

ODP : OrthoPhénylène Diamine

RPMI : Roswell Parc Memorial Institute

Présentation du GEIHP

1. Le laboratoire

Le Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP) est reconnu comme une Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur – Equipe d'Accueil (UPRES-EA 3142). L'Unité comporte deux sous Equipes de recherche qui se focalisent sur les « Infections respiratoires chroniques d'origine fongique » et « Bactéries multi-résistantes et plus particulièrement sur *Acinetobacter baumannii* ». Cette EA de l'Université d'Angers fait partie de l'IFR ICAT « Interaction Cellulaires et Applications Thérapeutiques ».

Le GEIHP fait partie des laboratoires installés en 2010 dans de nouveaux locaux, situés à l'Institut de Recherche et d'Ingénierie en Santé. Le regroupement des équipes de recherche en santé sur le même site a pour but d'améliorer les interactions entre les différentes unités et de mutualiser les équipements.

Les recherches de cette unité ont un rayonnement national et international, du fait de nombreuses publications dans des revues internationales (Lancet Infectious Disease, Journal of Clinical Microbiology, etc...) et de ses collaborations avec d'autres laboratoires hospitaliers français (Lille, Rouen, Giens...).

2. L'organisation

L'équipe du GEIHP est aujourd'hui dirigé par le Pr Jean-Philippe BOUCHARA. Il est également responsable de la sous-équipe « infections respiratoires chroniques d'origine fongique », le Pr Marie Laure Jolly Guilloux est responsable de la sous-équipe « Bactéries multi-résistantes ».

L'unité accueille une équipe constituée de 11 enseignants-chercheurs, 2 enseignants-chercheurs non titulaires, 5 personnels IATOS (Ingénieurs, Techniciens, Agents techniques) et 6 doctorants.

3. La thématique de recherche

Les modifications environnementales, climatiques ou comportementales que nous connaissons depuis quelques années, ont favorisé l'émergence de nombreuses maladies infectieuses. La lutte contre ces maladies passe par la connaissance de l'écologie des microorganismes en cause et de leur mode de transmission, et par l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourrait résulter d'une meilleure compréhension de leur physiologie et de leurs mécanismes pathogéniques. Dans ce contexte, le projet scientifique du GEIHP porte sur deux thématiques :

- **Les infections respiratoires fongiques au cours de la mucoviscidose**, et notamment celles déterminées par *Scedosporium apiospermum* qui se situe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux en cause. L'équipe travaille sur les facteurs de virulence des champignons filamenteux associés à la mucoviscidose et l'épidémiologie moléculaire des infections fongiques au cours de la mucoviscidose.
- **Les pneumopathies nosocomiales à *Acinetobacter baumannii***, bactérie souvent multi-résistante à l'origine d'épidémies intra-hospitalières, notamment dans les services de réanimation.

I. Introduction

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques héréditaires graves dans la race blanche caucasienne, due à une mutation au niveau du gène codant pour la protéine Cystic Fibrosis Transmembranes (CFTR). Cette altération du gène génère un « cercle vicieux » entre infections et inflammation : les infections sont favorisées par l'inflammation qui affaiblit les défenses immunitaires du malade. Souvent, le pronostic vital des patients est directement lié aux infections et complications broncho-pulmonaires. *Scedosporium apiospermum* est le deuxième champignon filamenteux retrouvé dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose, derrière *Aspergillus fumigatus*.

Cependant, l'absence actuelle d'outils de diagnostic spécifiques et rapides rend la détection de *S. apiospermum* particulièrement difficile. Des méthodes ont été développées dans le but d'affiner la spécificité et la sensibilité du diagnostic, toutefois des réactions croisées avec différents champignons filamenteux sont possibles tels qu'*A. fumigatus*. Ainsi, de nombreuses études ont vu le jour, s'intéressant aux enzymes de ces champignons, décrites comme des facteurs de virulence et des marqueurs de l'infection. Suite à la découverte d'un diagnostic efficace chez *A. fumigatus* basé sur la détection de la catalase, l'idée est venue de réaliser une méthode de diagnostic similaire mais destinée à *S. apiospermum*.

Cette étude tente d'apporter des éléments de réponses concernant la préparation d'anticorps monoclonaux dirigés contre une catalase spécifique de *Scedosporium apiospermum*. Ces anticorps pourraient être utilisés à des fins diagnostiques chez les patients suspectés de colonisation et/ou d'infections à *S. apiospermum*. La réalisation d'une chromatographie d'affinité sur colonne sensibilisée par ces anticorps monoclonaux permettrait sa purification totale puis utilisation dans la recherche d'anticorps dirigés contre cette enzyme dans un test ELISA.

II. Revue bibliographique

1. *Scedosporium apiospermum*

1.1. Taxonomie

Les genres *Scedosporium* et *Pseudallescheria* sont des champignons filamenteux, ubiquitaires et saprophytes. *Scedosporium apiospermum* est un champignon filamenteux de la famille des Microascaceae, de l'ordre des Microascales, de la classe des Euascomycetes et de la division des Ascomycotina. On parle de *Scedosporium* pour la forme asexuée (anamorphe) et de *Pseudallescheria* pour la forme sexuée (téléomorphe).

Deux espèces de *Scedosporium* sont principalement responsables de pathologies humaines : *Scedosporium apiospermum* et *Scedosporium prolificans*. *S. apiospermum* est le deuxième champignon filamenteux retrouvé dans l'arbre respiratoire de patients atteints de mucoviscidose, derrière *Aspergillus fumigatus*. Le genre *Pseudallescheria* est composé de 7 espèces, différentes génétiquement et morphologiquement : *P. africana*, *P. angusta*, *P. boydii*, *P. desertorum*, *P. ellipsoidea*, *P. fimeti* and *P. fusoidea*.

1.1.1. Caractères cultureux

S. apiospermum pousse sur les milieux usuels de mycologie tels que le milieu Sabouraud ou le Yeast Extract-Peptone-Dextrose-Agar (YPDA), avec ou sans actidione. Le champignon est cultivable de 25 à 40°C avec un optimum à 30°C.

1.1.2. Morphologie macroscopique

Après 5 jours d'incubation les colonies ont un aspect cotonneux et laineux sur le recto, de couleur blanchâtre au début puis deviennent grises à marron en vieillissant avec un verso noir.

1.1.3. Morphologie microscopique

Il existe deux modes de reproduction asexuée par conidiogénèse :

- Le thallique solitaire (type *Scedosporium*), le plus courant, correspond à la formation de spores ovoïdes ou claviformes, à base tronquées, de 6-14 µm sur 5µm, appelées aleuries. Ces aleuries se forment à partir des filaments du thalle végétatif ou à partir de conidiophores non renflés, ancrés verticalement sur la cellule podale. **(Figure 1)**
- Le blastique percurrent (type *Graphium*), quant à lui, correspond à des anellides groupées en corémies, en forme de bouquet, et formant des spores hyalines plus fines, claviformes, allongées, de 2-3 µm sur 5-7 µm. **(Figure 2)**
- La reproduction sexuée est réalisée par *Pseudallescheria boydii* à l'aide de cleistothèces arrondies de 100 à 200 µm de diamètre, avec des asques sphériques de 10 à 15 µm. Ces cleistothèces contiennent des ascospores.

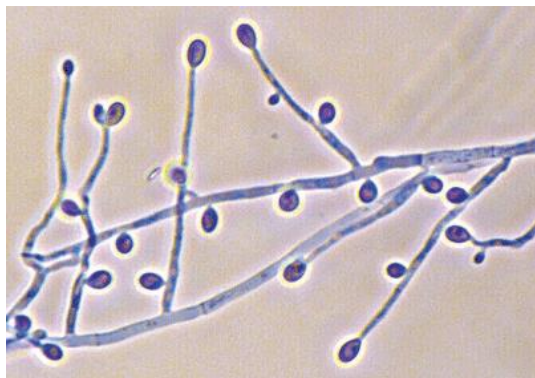


Figure 1 : Microphotographie des conidiophores et conidies de *S. apiospermum*.

[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Scedosporium/apiospermum.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Scedosporium/apiospermum.html)

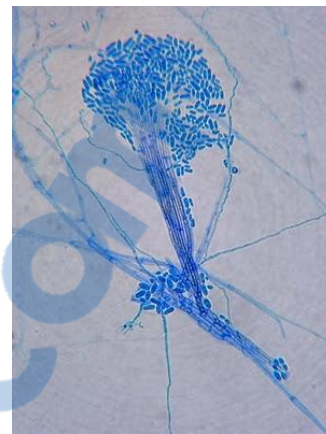


Figure 2 : Microphotographie de la forme asexuée de *S. apiospermum* de type *Graphium*. Conidiophores liés ensemble en aspect de germe de blé. (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.fr/2011/01/pseudallescheria-boydiiscedosporium.html>)

1.1.4. Habitat

Scedosporium apiospermum est un champignon ubiquitaire et saprophyte que l'on rencontre communément dans des milieux riches en matières organiques. On le retrouve dans les sols enrichis par les fumiers (terres agricoles, jardin), dans des environnements mal aérés et dans les eaux polluées comme les eaux d'égouts, la boue en mares stagnantes, les eaux issues de zones industrielles. Il croît de préférence en climat tempéré mais est thermotolérant et peut résister à de faibles proportions d'oxygène. Une forte concentration en azote a été mise en relation avec une abondance de ce champignon.

1.2. Pouvoir pathogène

1.2.1. Pathologies

Scedosporium apiospermum est un agent pathogène opportuniste responsable d'un large panel de maladies, plus ou moins graves selon l'état de santé du patient. La présence de conditions locales ou générales favorables dans l'organisme de l'hôte (patients immunodéprimés, VIH, greffe, ...) accentue la dissémination et la pathogénicité du champignon [7]. Le champignon ne cause pas d'infections inter-humaines, ni inter-espèces. Il peut pénétrer dans l'organisme selon 3 modes.

a) Inoculation suite à un traumatisme

Ces infections concernent principalement les personnes immunocompétentes et sont les plus rares. Le champignon rentre grâce à une plaie provoquée par un choc, une piqûre, une blessure tellurique ou l'ingestion accidentelle d'eaux polluées et va provoquer des infections localisées des tissus mous, des os et des articulations. Les plus connues sont les mycétomes à grains blancs mais on trouve aussi des kératites, des otites, des arthrites septiques, des endophtalmies, des ostéomyélites, des rhinosinusites et des endocardites [6].

b) La dissémination invasive

Les infections concernant les immunodéprimés sont plus fréquentes ; elles affectent principalement les patients greffés, sous immunosupresseurs. De telles infections, en général disséminées, touchent les poumons, les sinus et le système nerveux central. Ainsi ces patients sont les sujets de balles fongiques asymptomatiques, d'infections pulmonaires invasives ou disséminées (qui ne se distingue pas de l'aspergillose pulmonaire sévère) et d'abcès cérébraux accompagnés d'une infection disséminée. Le diagnostic d'une dissémination invasive, qui touche principalement le système nerveux central, est assez fréquent chez les personnes ayant survécus à une noyade dans des eaux pouvant contenir *Scedosporium apiospermum* (eaux polluées, égouts, mares...).

c) La colonisation des cavités chez les patients atteints de mucoviscidose

S. apiospermum est capable de profiter d'un terrain fragilisé et de coloniser des cavités comme les poumons et les sinus par inhalation des spores. Il entraîne alors des allergies broncho-pulmonaires (ABP), des kystes fongiques pulmonaires, des sinusites, des otites et peut notamment s'observer dans l'appareil pulmonaire d'un patient atteint de pneumopathie chronique, dont la mucoviscidose. *S. apiospermum* est le deuxième champignon filamenteux rencontré dans les infections respiratoires chroniques dans le cadre de la mucoviscidose.

La mucoviscidose, ou fibrose kystique du pancréas, est la plus fréquente des maladies génétiques héréditaires graves dans la race blanche caucasienne et est transmise selon le mode autosomique récessif [1]. Il s'agit d'une exocrinopathie généralisée, touchant de nombreuses glandes, notamment les glandes sudoripares. Elle est causée par une mutation au niveau du gène Cystic Fibrosis (CF) situé sur le chromosome 7. Il code pour la protéine Cystic Fibrosis Transmembranes (CFTR) qui intervient, au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales, dans la régulation du canal chlore. La mutation $\Delta F508$ de ce gène, la plus répandue, cause un dysfonctionnement de cette protéine CFTR, ce qui a pour conséquence une diminution de la perméabilité épithéliale au chlore. Ce phénomène est associé, dans les voies aériennes, à une réabsorption accrue de sodium. Ainsi, une déshydratation des sécrétions bronchiques se crée, altérant la clairance mucociliaire et favorisant de ce fait les complications infectieuses et obstructives. Au final, l'épaississement des sécrétions des glandes exocrines s'associe à une déshydratation, provoquant une obstruction qui conduit à une altération progressive des parenchymes initialement normaux. La mucoviscidose réalise donc une exocrinopathie généralisée affectant également l'appareil respiratoire, le tube digestif et ses annexes (pancréas, foie et voies biliaires), mais également le tractus génital [6]. Dans le cadre de la mucoviscidose, les infections et complications bronchopulmonaires influent souvent sur le pronostic vital des patients. Ce met en place alors un « cercle vicieux » entre infections et inflammation : l'inflammation s'accompagne d'une défaillance locale des défenses immunitaires de l'hôte qui favorise à son tour les infections [1]. Ce cycle sans fin aboutit à une destruction tissulaire dans l'arbre bronchopulmonaire.

1.2.2. Facteurs de virulence

Scedosporium apiospermum est un pathogène opportuniste, récemment classé dans les pathogènes émergents. En effet, l'analyse de cas cliniques montre une évolution du spectre clinique avec une apparition de maladies opportunistes depuis 1980 [9]. De ce fait, de nombreuses études ont vu le jour vis-à-vis de ce champignon pour comprendre sa pathogénicité.

Les principaux facteurs de virulence de *S. apiospermum* sont les métalloprotéinases, les sérines-protéases et les sidérophores. Les métalloprotéinases possèdent la capacité de dégrader les tissus de l'hôte par élimination de la laminine et la fibronectine de la matrice extracellulaire. Cette fibronectine étant activatrice des macrophages, le champignon peut alors échapper aux défenses de l'hôte. De plus, ces peptidases extracellulaires sont capables de cliver les molécules d'Immunoglobulines G (IgG), les mucines et fétuines des surfaces des muqueuses et d'hydrolyser l'albumine et l'hémoglobine [6]. Chez les patients atteints de la mucoviscidose, des protéases produites par des agents pathogènes fongiques (*Aspergillus fumigatus*, *S. apiospermum*...) seraient responsables dans une moindre mesure de l'apparition des lésions pulmonaires. Elles dégraderaient les protéines de l'organisme hôte comme la laminine de la membrane basale et le fibrinogène ou de manière indirecte par des mécanismes d'hypersensibilité. Les sidérophores auraient la capacité de capter le fer contenu dans les protéines de l'hôte, notamment la ferritine et la transferrine. Cette capacité pourrait jouer un rôle important dans la diffusion de *S. apiospermum* dans le cerveau. A ce jour, 2 sidérophores de type hydroxamate ont été identifiés : l'acide dimérumique et le Na-méthyl coprogène B, ce dernier étant spécifique de *S. apiospermum*. Deux autres facteurs de virulence ont été découverts récemment : l' α -glucane ainsi qu'une Heat Shock Protein 60 (Hsp60) [10]. La catalase est quant à elle suspectée de jouer un rôle dans la pathogénicité du champignon mais son rôle est encore mal connu [11].

1.2.3. Diagnostic

Le diagnostic des infections à *S. apiospermum* est fondé sur les réponses histologiques et cytologiques de l'organisme infecté [9]. L'absence de méthode de diagnostic adaptée rend difficile l'évaluation de la responsabilité de ce champignon dans des infections parfois mortelles car les symptômes et les lésions infligés par *S. apiospermum* sont similaires à d'autres pathogènes fongiques plus connus comme *A. fumigatus*. Actuellement il y a plusieurs méthodes de diagnostics. La technique classique est basée sur la culture et l'identification du champignon selon des critères morphologiques. C'est une technique lente car le champignon peut nécessiter jusqu'à 14 jours de culture. Des milieux de culture plus sélectifs comme le milieu SceSel+ permettent de mieux isoler *S. apiospermum* des autres champignons filamenteux. Un examen direct est aussi possible grâce à des colorations histochimiques et par microscopie à fluorescence. Kaufman *et al.*, ont décrit la détection de *S. apiospermum* par microscopie à fluorescence avec des anticorps polyclonaux fluorescents [13]. Toutefois, les hyphes ramifiés et septés de ce champignon sont similaires à ceux d'*Aspergillus*, de *Fusarium* et d'espèces de champignons noirs, ce qui rend la différenciation difficile [6]. Une sérologie par électrosynérèse peut être réalisée mais des champignons tels qu'*Aspergillus fumigatus* peuvent présenter des réactions croisées. En revanche, un peptidorhamnomannane isolé par Pinto *et al.* et spécifique de *S. apiospermum* pourrait être utilisé comme antigène pour des méthodes de diagnostic sérologiques [12]. Enfin, les techniques de biologie moléculaire sont de plus en plus associées aux techniques classiques car elles permettent d'identifier

précisément le champignon [6]. Toutefois, le différentiel entre simple colonisation et infection ne peuvent être affirmés par cette approche. Wedde *et al* ont réussi à différencier *P. boydii* / *S. apiospermum* et *S. prolificans* par PCR conventionnelle [14]. D'autres techniques de PCR conventionnelles, en temps réel, multiplex ou par des puces d'oligonucléotides ont été développées mais restent lourdes à mettre en œuvre et ne sont pas encore accessibles à tous les laboratoires. Dans le cas de mycétomes, des radiologies peuvent aider au diagnostic.

1.2.4. Thérapeutique

Un diagnostic précis est primordial pour administrer le traitement antifongique adapté, cela s'applique encore plus pour les patients immunodéprimés. Pour les mycétomes et autres infections localisées, une intervention chirurgicale basée sur l'exérèse des tissus lésés est appliquée. *S. apiospermum* est résistant à l'amphotéricine B, à la 5 fluorocytosine et à la majorité des dérivés azolés. Seulement les azolés de type kétoconazole et l'itraconazole semblent donner de bonnes réponses thérapeutiques, utilisées avec les doses adéquates sur de longues durées. Le voriconazole et le ravuconazole, de nouvelles molécules classées dans les triazolés, ont une activité satisfaisante et constante. Il y a cependant une contradiction entre les résultats *in vitro* et *in vivo* concernant l'amphotéricine B. La méthode la plus prometteuse semble être une association de 2 antifongiques : l'amphotéricine B et le fluconazole. De plus, l'association d'antifongiques pourrait s'accompagner d'une stimulation du système immunitaire de l'hôte par l'interféron- γ [14] et par l'interleukine 15 [15], en particulier pour les infections disséminées.

2. Les catalases

Les catalases, ou H_2O_2 oxydoréductases (EC 1.11.1.6), sont des enzymes vitales présentes chez toutes les espèces vivant en aérobie. En effet elles participent à la détoxification de la cellule en catalysant la réaction de dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène gazeux (**Figure 3**). Les catalases ont donc pour principale fonction la préservation de l'organisme contre la production normale et l'accumulation d'eau oxygénée, hautement toxique pour la cellule [7]. En effet le peroxyde d'hydrogène, de même que l'ion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyle (OH), résultent de l'activité normale des oxydases ou de phénomènes d'auto-oxydation et se comportent comme des agents mutagènes [1], provoquant de graves dommages cellulaires (stress oxydatif, mutation, vieillissement, tumeurs...) se traduisant par des altérations protéiques.

Les catalases font partie des enzymes les plus étudiées, du fait de leur importance vitale pour les cellules. Goldberg et Hochman, en 1989, ont proposé une classification en fonction des propriétés physicochimiques, divisant les enzymes en 3 catégories : les catalases typiques, atypiques et catalases-peroxydases. Cependant, cette classification a été abandonnée, suite à l'apparition de nouvelles séquences de catalases, et remplacée par une classification basée sur les critères phylogénétiques [16,17]. Cette nouvelle classification différencie les catalases monofonctionnelles, les catalases-peroxydases et les catalases non-héminiques.

2.1. Les catalases typiques dites monofonctionnelles.

La majorité des catalases sont classées dans cette catégorie. Ce sont des enzymes constituées d'un groupement hémique et d'une grande (75 à 84 kDa) ou une petite sous-unité (55 à 69 kDa). Quatre résidus d'acide- α -aminés sont associés à l'atome de fer de l'hème pour dégrader l' H_2O_2 : l'histidine, la sérine, la tyrosine et l'asparagine [16]. L' H_2O_2 joue le rôle d'oxydant dans un premier temps puis de réducteur dans un second temps, lors de la dégradation du peroxyde d'hydrogène. Ces catalases sont classées en 3 clades. Le premier comprend principalement des catalases d'origine végétale, le second est constitué de catalases possédant une large sous-unité et sont d'origine bactérienne ou fongique. Ces dernières enzymes ont une structure stable et rigide qui pourrait expliquer par extrême résistance à la dénaturation thermique, au pH et à la protéolyse [16,18]. Le dernier clade comprend des catalases, formées d'une petite sous-unité. Elles sont présentes chez les bactéries, les archaebactéries, les champignons et chez d'autres eucaryotes.

Ces catalases ne suivent pas la cinétique de Michaelis-Menten. En outre, une concentration en H_2O_2 de 300 à 500 mM inactive la petite sous-unité. La grande sous-unité est quant à elle inhibée par une concentration en H_2O_2 supérieure à 3M [16].

2.2. Les catalases-peroxydases

Ces catalases bifonctionnelles sont formées d'une triade d'acide- α -aminés : le tryptophane 111 situé au niveau du site actif, la méthionine 264 et la tyrosine 238 [18]. Elles sont présentes dans les 3 trois règnes du vivant. Les enzymes de ce groupe sont des homodimères, possèdent un groupement hémique et leurs masses molaires varient entre 120 et 340 kDa [16]. Cependant, leurs séquences sont plus proches de celles des peroxydases des plantes que de celles des catalases typiques [18].

2.3. Les catalases non-hémiques dites à manganèse

Les enzymes de cette catégorie possèdent du manganèse à la place d'un hème, ainsi elles sont aussi nommées Mn-catalase. Jusqu'à aujourd'hui elles ne sont connues que chez les bactéries [18]. Après des expériences cristallographiques, il a été démontré que le centre catalytique est un groupement constitué de deux atomes de manganèse. Ces catalases sont des protéines homohexamériques formées de sous-unités de masse moléculaire d'environ 30 kDa. La réaction catalysée se fait en 2 temps. Après une oxydation du groupe dimanganèse par une molécule de H_2O_2 , une réduction de ces 2 atomes par une autre molécule de H_2O_2 a lieu [7]. Les catalases à manganèse ont toutes un taux d'élimination de l'eau oxygénée inférieur à celui des catalases des autres catégories.

III. Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Souche utilisée

La souche utilisée est la souche 4595 de *Scedosporium apiospermum* isolée initialement par le laboratoire de mycologie du CHU d'Angers à partir d'un prélèvement de liquide broncho alvéolaire et conservée sous forme lyophilisée puis déposée auprès de l'Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie de Mycologie (IHEM, Bruxelles, Belgique) sous le numéro IHEM 15155.

1.2. Entretien du champignon

Les cultures de *Scedosporium apiospermum* sont réalisées sur gélose Yeast Extract-Peptone-Dextrose Agar (YPDA) additionnée de Chloramphénicol (inhibant la croissance bactérienne) en boîte de Pétri. L'ensemencement se fait par dépôt en strie profonde d'un fragment de colonie dans une nouvelle gélose. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 9 jours.

1.3. Culture en milieu liquide

Les boîtes de pétri contenant des cultures du champignon sont raclées à l'aide d'un râteau stérile et d'eau stérile afin de récupérer les spores. Le matériel fongique obtenu est filtré sur une membrane stérile de porosité 40µm disposée sur un système de filtration stérile. Le filtrat contenant les spores est centrifugé à 3 500 tours/min pendant 5 min. Après centrifugation les spores sont dénombrées sur cellule de Malassez, puis sont distribuées dans des flasks contenant 200 mL de milieu Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) à raison de 10^7 spores/mL. Après une incubation de 7 jours à 37°C, les spores ont germé, le filament s'est développé et forme une galette à la surface du milieu de culture. Ces galettes sont récupérées, lavées en eau stérile par centrifugation puis congelées.

1.4. Extraction des constituants cellulaires

Les galettes fongiques sont broyées afin d'en extraire les constituants cellulaires. Elles sont broyées finement au mortier dans de l'azote liquide, puis à l'aide de microbilles de verre (mélange de 0,1-0,25 mm + 1 mm) au broyeur à CO₂ ou à puissance 30 pendant 6 min au vibrobroyeur. Le surnageant est ensuite centrifugé à 1 500 tours/min pendant 5 min pour éliminer les billes de verre puis à nouveau à 50 000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant limpide est récupéré et congelé, il constitue notre extrait brut.

2. Fractionnement par chromatographie

2.1. Chromatographie échangeuse d'anions (CEA)

Principe : C'est une méthode basée sur l'attraction ionique entre les charges de la phase stationnaire (gel) et la charge des composants d'un mélange dans des conditions de pH et de salinité définies. Dans le cas

d'une CEA, la matrice est chargée positivement. Ainsi, lors du passage d'un échantillon, les molécules portant des charges négatives accessibles à leur surface vont interagir avec la matrice. Les molécules étudiées sont ici des protéines, composées d'acides aminés, dont l'état d'ionisation varie en fonction du pH. Ainsi, à un pH inférieur au pHi de la protéine cette dernière sera globalement chargée positivement, à un pH supérieur au pHi elle sera globalement chargée négativement.

L'éluant est caractérisé par plusieurs critères comme le pH et la force ionique. Au début de la chromatographie, l'échantillon est injecté en présence d'un éluant de faible force ionique (faible concentration en sels) et à pH adapté, ici pH basique pour que les protéines soient chargées négativement. Ainsi elles vont interagir avec la phase stationnaire, contenant des cations à sa surface. Au fur et à mesure de la chromatographie, la force ionique de la phase mobile est augmentée. Les sels, étant chargés, vont entrer en compétition avec les protéines. Ces dernières vont être éluées progressivement de la matrice pendant l'élution et vont pouvoir être collectées.

Méthode : La colonne est composée de 10 mL de gel DEAE-trisacryl. Elle est d'abord lavée par une solution de NaCl à 1M, à un débit de 2 mL/min pendant 5 Volumes de Colonne (CV). Elle est ensuite équilibrée par du Tris 20 mM pH 7,5 à un débit de 2 mL/min pendant 2 CV. Parallèlement, l'échantillon est dilué dans du Tampon Tris 1M pH 7,5 jusqu'à atteindre une concentration finale en Tris de 20 mM puis centrifugé à 5 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant, contenant les composants solubles, est injecté dans la colonne à un débit de 1 mL/min. La colonne est ensuite lavée par du Tris 20 mM à un débit de 2 mL/min sur 2 CV. L'élution est réalisée par l'introduction d'un gradient de 0 à 25% de NaCl 1M sur 20 CV à un débit de 2 mL/min avec collecte de 4 mL par fraction. Enfin, la colonne est lavée par un palier à 1M de NaCl à un débit de 2 mL/min pendant 5 CV. Les fractions sont soit recueillies à 4°C pour analyse immédiate soit conservées à - 20°C pour une analyse ultérieure.

2.2. Chromatographie d'Interactions Hydrophobes

Principe : Il s'agit d'une méthode chromatographique de séparation des molécules biologiques grâce à l'interaction entre les groupements hydrophobes à leur surface et ceux de la phase stationnaire (phényl, etc...) [2].

Méthode : Les fractions chromatographiques de la CEA enrichies en catalase A2 sont diluées en sulfate d'ammonium jusqu'à atteindre une concentration de 1,75 M. Après centrifugation, le surnageant est introduit dans une colonne de phényl-Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia Biotech) préalablement équilibrée avec du sulfate d'ammonium à 1,75 M dans du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5. L'échantillon est ensuite élué par un gradient décroissant en palier de sulfate d'ammonium (1,75, 1,5, 1,25, 1,0, 0,75, 0,50, 0,25, 0,0 M), à un débit de 2 ml/min. Les fractions contenant l'activité catalasique A2 sont regroupées puis concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium à 3,6 M pour une troisième étape chromatographique.

2.3. Chromatographie de Gel Filtration

Principe : Cette méthode permet la séparation des molécules d'un mélange selon leur masse moléculaire [8]. Le gel est constitué de billes poreuses dont le diamètre des pores est calibré. Ainsi, l'élution se

fait dans l'ordre décroissant des masses moléculaires. Les molécules plus grandes que les pores vont être éluées rapidement, tandis que les molécules plus petites que les pores vont passer dans les billes et vont donc être ralenties.

Méthode : Cette dernière étape de purification a été effectuée sur une colonne de Sephacryl S300 (Pharmacia) avec un tampon phosphate salin (PBS) pH 7,5, à un débit de 1,3 ml / min. L'étalonnage a été réalisé avec du Bleu dextran (2000 kDa), de la thyroglobuline (669 kDa), de la ferritine (440 kDa), de la catalase (de foie de bovin) (232 kDa), de l'aldolase (158 kDa), de la chymotrypsine (25 kDa), de l'albumine de sérum bovin (67 kDa) et de la RNase A (13,7 kDa). La masse moléculaire de la protéine purifiée a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (K_{av} en fonction de $\log M_r$) une fois la valeur de K_{av} calculée à partir du volume d'élution mesuré.

2.4. Analyses électrophorétiques

2.4.1. Migration dans un gel de polyacrylamide

Principe : L'électrophorèse est une méthode de séparation dans un gel tridimensionnel par migration des protéines sous l'action d'un champ électrique. Les protéines vont migrer en fonction de leurs charges, positives ou négatives et/ou de leur masse moléculaire.

Un gel de polyacrylamide est le produit de la polymérisation et de la réticulation formée par la réaction de l'acrylamide monomère et de bis-acrylamide. La densité, la viscosité, l'élasticité et la résistance mécanique du gel sont déterminées par différents facteurs, notamment la concentration relative en monomère et en comonomère dans le mélange et du pourcentage total de ces 2 composants. Ainsi, plus la concentration en acrylamide est élevée plus le maillage est serré. Les molécules présentes dans l'échantillon vont alors migrer plus lentement dans le gel. Le N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et le persulfate d'ammonium (APS) sont des catalyseurs chimiques qui permettent d'initier et d'accélérer la polymérisation du gel en fournissant des radicaux libres.

Lors d'une électrophorèse en Sodium Dodécyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), le SDS, un détergent anionique, est utilisé et rajouté dans toutes les solutions (tampon électrophorèse, tampon échantillon, gel...). Il confère à toutes les molécules une charge négative. La migration ne dépend alors plus que de la masse moléculaire. Cependant, le SDS entraîne une dénaturation protéique par dépliement des chaînes polypeptidiques et donc une perte possible de l'activité biologique, notamment enzymatique, des protéines.

Lors d'une électrophorèse en PAGE-Natif, le SDS n'est pas ajouté aux solutions afin de garder les protéines à leur état natif, pour conserver leurs activités biologiques. La migration dépend alors de 2 éléments : la masse moléculaire et de la charge électrique. Une telle électrophorèse est nécessaire pour réaliser une coloration négative de Woodbury et Coll ou toute autre méthode permettant de localiser l'activité catalasique. Toutefois la masse moléculaire ne peut pas être déterminée.

Méthode : Les gels de polyacrylamide (**Annexe 2.1 et 2.2**) sont coulés entre 2 plaques de verre puis sont recouverts d'un gel d'empilement, le « stacking gel », à 4% de polyacrylamide (**Annexe 2.3**). Les gels sont conservés 1 mois dans du PBS-azide à 4°C.

Pour utilisation, les gels sont installés dans une cuve électrophorétique réfrigérée contenant le tampon d'électrophorèse (**Annexe 2.4**). Les échantillons sont dilués dans le tampon échantillon (**Annexe 2.8**), ensuite chauffés 2 min au bain marie bouillant pour le SDS-PAGE ou non chauffés pour le Native-PAGE puis déposés dans les puits. La migration est réalisée à 150 V pendant 15 min puis à 300 V jusqu'à ce que le front de migration atteigne environ 1 cm du bas du gel. Le gel est démoulé et peut faire l'objet d'une coloration négative pour le Native-PAGE (cf Chapitre III.2), d'une coloration au bleu de Coomassie ou à l'argent ou d'un électrotransfert pour le SDS-PAGE.

2.4.2. Coloration au Bleu de Coomassie

Cette technique permet de colorer les protéines qui apparaissent sous forme de bandes bleues sur un gel transparent. Après démoulage et élimination du « stacking gel » le gel est immergé dans un fixateur (**Annexe 3.1**) pendant 45 min puis est plongée dans le colorant de bleu de Coomassie (**Annexe 3.2**) pendant environ 18h. Il est ensuite éclairci par plusieurs bains de décoloration (**Annexe 3.3**) et est finalement conservé dans de l'eau distillée.

2.4.3. Coloration à l'argent

Principe : La coloration à l'argent permet de colorer les constituants à copule protéique séparés au cours d'une électrophorèse de type SDS-PAGE. Cette coloration est beaucoup plus sensible que la coloration standard au bleu de coomassie.

Méthode : Le gel est fixé pendant 18 heures dans une solution de méthanol-acide acétique-formaldéhyde (50%-12%-0,0185%) puis est incubé dans une solution d'éthanol à 50% 3 fois pendant 20 minutes. Le gel est ensuite plongé dans une solution de thiosulfate de sodium (0,02%) pendant 1 min puis est rincé dans de l'eau milli-Q 3 fois pendant 20 secondes. Le gel est alors incubé pendant 20 min dans une solution de nitrate d'argent-formaldéhyde (0,2%-0,028%) et est à nouveau rincé dans de l'eau milli-Q 3 fois pendant 20 secondes. Le gel est alors immergé dans une solution de carbonate-thiosulfate-formaldéhyde (6%-0,004%-0,0185%) durant un temps variable, de quelques secondes à plusieurs minutes, pour la révélation. La réaction est stoppée par immersion du gel dans une solution de méthanol-acide acétique pendant quelques minutes.

2.4.4. Western Blot

Principe : Le Western Blot est une technique d'électro-transfert des protéines contenues dans un gel d'électrophorèse de type SDS-PAGE sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon. Sous l'action d'un champ électrique les protéines vont migrer du gel vers la membrane, elles seront exposées ainsi à la surface de la membrane et seront alors plus facilement détectables.

Méthode : La méthode de transfert utilisée est de type semi-sec. La membrane utilisée est une membrane de type polyvinyl difluoride (PVDF) (Amersham Hybond-P) découpée aux dimensions du gel. Pour le transfert, un « sandwich » composé de 3 feuilles de papiers buvard imbibés de tampon blotting pH 8,3 (**Annexe 5.1**), puis de la membrane de PVDF, du gel de SDS-PAGE débarrassé du stacking gel et enfin 2 feuilles de papiers buvards également imbibés de tampon de transfert sont déposés dans le blotter semi-sec (Kem-En-Tec). Le transfert réalisé pendant 1h15 s'effectue à une intensité de 200 mA et à un voltage inférieur à 15V. Après transfert, la portion de membrane contenant les marqueurs de masse moléculaire est découpée puis colorée à l'amidoblack. Le reste de la membrane devant subir l'immunodétection est saturée dans du Phosphate Buffered Saline (PBS) additionné de lait à 10% à 4°C pendant 1 nuit, pour la saturation, puis est rincée abondamment en PBS.

2.4.5. Immunodétection sur membrane

Principe : Le principe de l'immunodétection sur membrane pour la mise en évidence de l'interaction antigène-anticorps est semblable à celui présenté pour la technique ELISA (cf Chapitre III.4). La différence se situe au niveau du substrat. Le substrat utilisé, le 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (DAB) est un substrat précipitant, contrairement à l'orthophénylène diamine (ODP). Le DAB va se lier à la peroxydase en tant que substrat et va y être dégradé, la réaction va former un produit coloré marron qui va précipiter sur place. Ainsi, ce phénomène permet de localiser les zones contenant le conjugué et donc les anticorps spécifiques de l'antigène recherché. En outre cette méthode permet de déterminer la masse moléculaire de l'antigène reconnu.

Méthode : La membrane est découpée en plusieurs pistes. Ces pistes sont incubées 2h à température ambiante sous agitation avec 1,5 mL d'Immunsérum (IS) de souris dilué au 1/100^{ème} en PBS additionné de Tween 20 à 0,05% (PBS-T) additionné de lait à 1% ou 1,5 mL de surnageant d'hybridome. Trois lavages de 5 min sous agitation en PBS-T sont effectués puis la membrane est incubée 1h sous agitation et à température ambiante avec 1,5 mL d'anticorps de chèvre (anticorps secondaires) anti-IgG (H+L) de souris conjugué à la peroxydase du raifort (HRPO) et dilué au 1/1000^{ème} en PBS-T additionné de lait à 1%. Trois lavages identiques aux premiers sont effectués. Les bandes sont alors mises dans une solution de révélation contenant 20 mg de DAB dilué dans 40 mL de Tris-HCL 0,1M pH 7,6 et additionné de 40 µL H₂O₂ 110 volumes. Après une incubation de 5 à 10 min la révélation est stoppée par un bain d'acide acétique à 5%.

3. Recherche de l'activité catalasique

3.1. Par production d'oxygène

Principe : Cette méthode est basée sur la réaction de dismutation de l'eau oxygénée ou du peroxyde d'hydrogène [2]. La catalase catalyse cette réaction chimique en produisant une molécule d'eau et une molécule de dioxygène gazeux (**Figure 3**). Cette dernière, étant visible à l'œil nu, sera donc le témoin de la réaction. Si on observe la présence de bulles alors il y a présence d'une catalase, dans le cas contraire elle est absente.

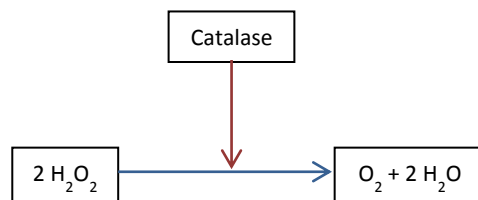


Figure 3 : Réaction de dismutation de l'eau oxygénée catalysée par la catalase.

Méthode : Sur une plaque de verre propre, 20 μL H_2O_2 dilué (30,6 μL H_2O_2 110 volumes + 3 mL Tampon phosphate 50 mM pH 7,2) sont ajoutés à 40 μL d'extrait ou de fraction chromatographique préchauffé à 37°C. Le dégagement d'oxygène est observé dans un délai de 5 min sur fond noir.

3.2. Coloration négative de Woodbury et Coll

Principe : Cette coloration s'applique aux gels de Native-PAGE et permet la localisation de la catalase par la mise en évidence de l'activité catalase directement en gel. En effet, la conservation à l'état natif de la catalase permet de garder la même conformation et donc de détecter l'activité enzymatique. Le réactif, le ferricyanure de potassium, réagit avec l'eau oxygénée, ce qui donne une coloration bleu-verte (**Figure 4**). Ainsi, lorsque la catalase est absente dans le gel, ce dernier présente une coloration bleu-vert. On observe des bandes claires (achromatiques) dans un gel bleu-vert, traduisant la présence de la catalase dans le gel.

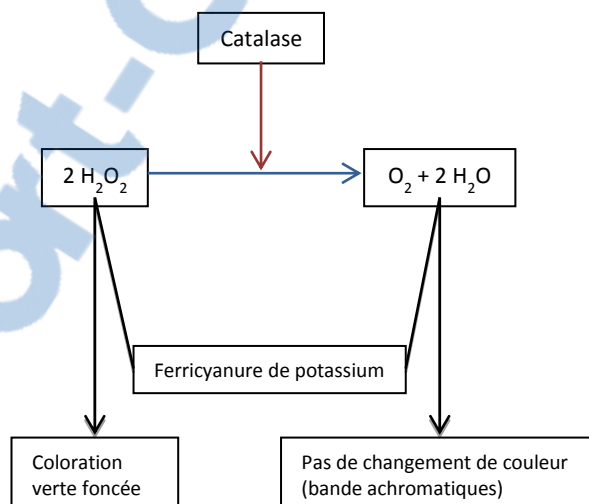


Figure 4 : Schéma du principe de la coloration négative de Woodbury et Coll pour la révélation de la catalase.

Méthode : Après électrophorèse en condition native, le stacking gel est éliminé et le gel est rincé sous agitation dans 3 bains d'eau distillée milli-Q de 15 min chacun. Le gel est ensuite immergé pendant 10 min à l'obscurité dans 100 mL d'une solution d'eau oxygénée diluée et préparée en extemporané (10 μL d'eau oxygénée à 110 volumes dans 100 mL d'eau milli-Q). Le gel est rincé 3 à 5 secondes dans un nouveau bain d'eau distillée milli-Q, puis est aussitôt immergé à l'obscurité dans un mélange contenant 28 mL de chlorure ferrique 2% filtré et 28 mL de Ferricyannure de potassium 2%. Lors de cette incubation le gel se colore en bleu-vert, hormis les zones contenant une activité catalase qui inhibe la réaction et qui apparaissent alors claires. Le

gel est abondamment rincé en eau milli-Q dans plusieurs bains puis est conservé dans de l'eau milli-Q et à l'obscurité.

4. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Principe : L'ELISA est une technique immunoenzymatique permettant la détection d'anticorps spécifique d'un antigène donné par l'utilisation d'un anticorps conjugué à une enzyme spécifique de l'anticorps recherché. L'enzyme conjuguée à l'anticorps appelé anticorps secondaire transforme un substrat incolore en un produit coloré et permet de visualiser l'interaction initiale entre l'antigène et l'anticorps recherché (**Figure 5**).

Dans un premier temps, l'antigène spécifique de l'anticorps recherché est déposé dans les puits d'une plaque de microtitration : c'est le « coating » ou adsorption. La fixation de l'antigène sur le plastique repose sur des interactions faibles de types hydrophobes et électrostatiques. Un lavage permet d'éliminer les antigènes non fixés. La deuxième étape est la saturation des surfaces libres du support en protéines, par du lait ou du sérum d'albumine bovine (BSA), afin d'éviter toutes liaisons non spécifiques ultérieures des anticorps. Un lavage permet d'éliminer toutes les protéines non adsorbées sur le plastique. Puis l'échantillon à tester, contenant potentiellement des anticorps dirigés contre l'antigène cible présent sur le plastique, est ajouté. Un nouveau lavage est réalisé afin d'éliminer tous les anticorps qui ne se sont pas fixés sur l'antigène. Le conjugué est alors déposé, il s'agit d'un anticorps conjugué à une enzyme et dont l'activité de l'anticorps est dirigée contre les déterminants antigéniques du premier anticorps (généralement des anticorps anti-Immunoglobuline d'une autre espèce animale). Un lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué qui ne s'est pas fixé puis le substrat et l'eau oxygénée sont ajoutés. La peroxydase, l'enzyme conjuguée, va dégrader l'eau oxygénée. L'OPD va alors être oxydé en un produit coloré orange. La réaction est stoppée par addition d'une solution dénaturante (acide ou basique).

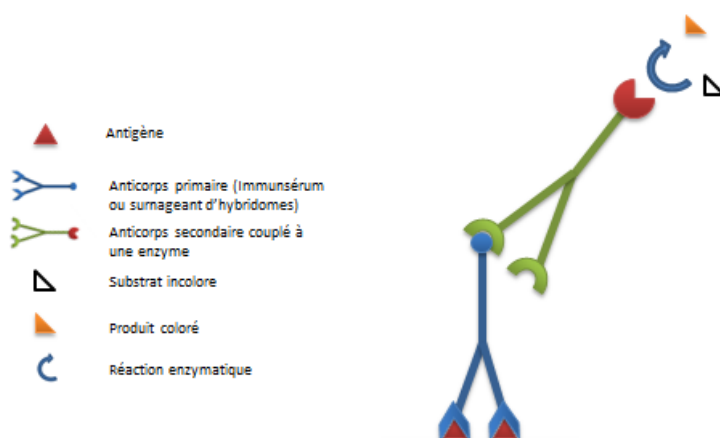


Figure 5 : Principe de la technique ELISA.

Méthode : L'extrait fongique (extrait brut, fraction chromatographique enrichie en catalase ou catalase purifiée) est dilué dans du tampon carbonate-bicarbonate 50mM pH 9,6 puis déposé à raison de 100 µL/puits. L'adsorption se fait à 37°C pendant 2 à 4h. Trois lavages avec 300 µL de PBS sont réalisés, puis les puits sont saturés par 250 µL/puits d'une solution de lait à 10% préparé en PBS, à 4°C pendant 18h. Trois lavages sont effectués avec 300 µL de PBS-T. Puis l'échantillon (IS de souris dilué ou surnageant de culture d'hybridome),

contenant de possibles anticorps spécifiques de l'antigène adsorbé, est déposé à raison de 100 µL/puits. La plaque est incubée à 37°C pendant 1h et lavée 3 fois en PBS-T. Le conjugué, des anticorps de chèvres anti-IgG (H+L) de souris conjugués à la HRPO, est dilué au 1/4000 dans du PBS-T additionné de lait à 1% et ajouté à raison de 100µL/puits. Les plaques sont incubées 1h à 37°C et lavée 3 fois en PBS-T. Ensuite, 200 µL de la solution de révélation de l'activité peroxydase comprenant le substrat et composé de 40 mL de tampon citrate – phosphate 0,15M pH 5, de 30 mg d'ODP et de 40 µL d'H₂O₂ 110 volumes sont déposés dans chacun des puits. L'ensemble est incubé 15 min à l'obscurité. La réaction est stoppée par ajout de 50 µL/puits d'acide sulfurique 1M. L'absorbance est mesurée à 490 nm.

5. Production d'anticorps monoclonaux

5.1. Immunisation des souris

Trois souris BALB/c femelles ont été immunisées par 4 injections espacées d'une semaine par voie sous cutanée de 50 µL de catalase A2 purifiée antérieurement par une doctorante de l'unité de recherche (cf chapitre III.2.2 et III.2.3). La première injection est composée de 50 µL de catalase purifiée mélangée avec 50 µL d'adjuvant de Freund complet, les 3 injections suivantes sont faites en présence de l'adjuvant de Freund incomplet. L'immunisation a été évaluée par ELISA, selon le protocole décrit au chapitre 2.V.

5.2. Amplification du myélocyte P3X63 Ag8

Le myélocyte P3X63 Ag8 traité par Mycoplasme Removal Agent (MRA) et congelé en 2005 a été amplifié en milieu Roswell Parc Memorial Institute 1640 (RPMI) additionné de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) à 20%. Celui-ci est entretenu par repiquage bi-hebdomadaire et amplifié en flask de culture cellulaire par dédoublement journalier.

5.3. Préparation et dépôt des macrophages

Les macrophages péritonéaux collectés par lavage de la cavité péritonéale avec du RPMI provenant de 2 souris BALB/c sont mis en suspension dans 50 mL de RPMI et maintenus dans la glace. Les suspensions sont centrifugées à 2 500 tours/min pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris par 20 mL de RPMI glacé puis les suspensions sont de nouveau centrifugées à 2 500 tours/min pendant 10 min à 4°C. Les macrophages sont dénombrés en cellule de Malassez. Enfin, le culot est repris par 200 mL de milieu Hypoxanthine-Aminoptérine-Thymidine (HAT) (RPMI+SVF 20%+gentamicine+glutamine+HAT). Cent microlitres de cette suspension sont déposés dans les plaques de culture de 96 puits. Les macrophages qui vont se multiplier pendant quelques jours constituent la couche nourricière facilitant ainsi la pousse des hybridomes.

5.4. Récupération des splénocytes

La rate de la souris, sélectionnée après contrôle d'immunisation par ELISA, est perfusée par 100 mL de RPMI préchauffé à 37°C. Le liquide obtenu est centrifugé à 1 000 tours/min pendant 10 min à température ambiante. Le culot est repris par 20 mL de RPMI préchauffé à 37°C. Les splénocytes sont centrifugés à 1 000

tours/min pendant 10 min à température ambiante. Durant la centrifugation le dénombrement est fait sur cellule de Malassez sur un aliquot dilué au 1/6 en NH_4Cl 1,7 M afin de dénombrer les splénocytes nucléés.

5.5. Récupération des P3X63 Ag8

Les cellules myélomateuses en phase de culture exponentielle sont récupérées puis centrifugées à 1 000 tours/min pendant 10 min à température ambiante. Le culot est repris par 20 mL de RPMI préchauffé à 37°C puis les cellules sont dénombrées en cellule de Malassez.

5.6. Hybridation somatique (Fusion)

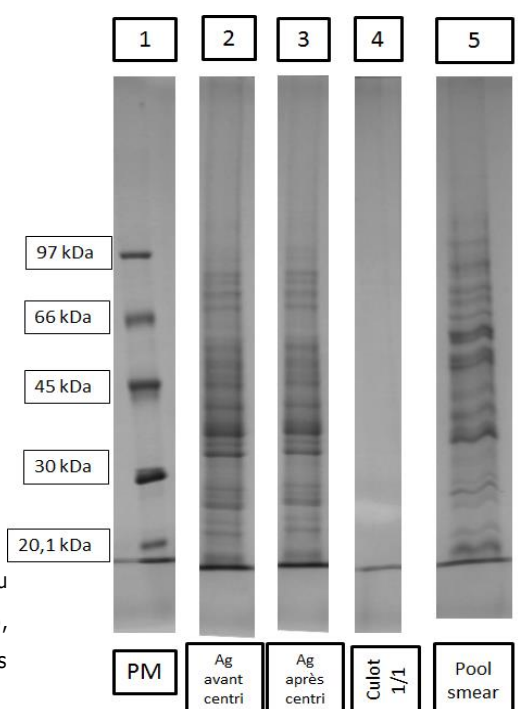
Les 2 suspensions cellulaires sont mélangées afin de respecter un ratio de 5 splénocytes nucléés pour 1 cellule myélomateuse. Après centrifugation de cette suspension, le culot est cassé à l'öse. Puis 1 mL d'un mélange (RPMI (1,4 mL) - Polyéthylène Glycol (PEG) (1g) - 140 μL de Diméthylsulfoxyde (DMSO)) stérilisé par filtration et maintenu à 37°C sont ajoutés au culot cellulaire au goutte à goutte sous agitation. Après incubation d'1 min à 37°C, le mélange est centrifugé à 1 200 tours/min pendant 1 min 30, puis à nouveau incubé à 37°C durant 1 min. Six millilitres de RPMI sont ajoutés à raison de 100 μL toutes les 5 secondes, puis 9 mL de RPMI maintenu à 37°C. Les cellules sont centrifugées à 1 200 tours/min pendant 10 min, le culot de cellules est repris par 200 mL de milieu HAT. Les cellules sont distribuées à raison de 100 μL /puits dans les plaques de culture cellulaire où reposent depuis la veille les macrophages.

IV. Résultats

1. Analyse de l'extrait fongique de *Scedosporium apiospermum*

L'extrait fongique utilisé a été obtenu par broyage à l'azote liquide et au broyeur à CO_2 en présence de billes de verre. L'analyse par SDS-PAGE et la coloration au bleu de Coomassie de cet extrait fongique révèle la présence de plusieurs composants protéiques de masses moléculaires comprises entre 10 et 100 kDa (**Figure 6**, piste 2). Cet extrait après décongélation s'est avéré trouble, toutefois l'analyse du matériel écarté par centrifugation (**Figure 6**, piste 4) ne révèle la perte conséquente d'aucun constituant, et l'analyse du surnageant semble analogue à l'extrait initial (**Figure 6**, piste 3). Ainsi, l'extrait fongique obtenu après broyage sera centrifugé afin d'éviter toute obstruction de la colonne de chromatographie et seul le surnageant sera injecté dans la colonne.

Figure 6 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE (5-15%) et coloration au bleu de Coomassie de l'extrait fongique brut (Piste 2), de l'extrait centrifugé (Piste 3), du culot (Piste 4) ou du pool des fractions chromatographiques obtenues après CEA contenant l'activité catalasique A2 (Piste 5).



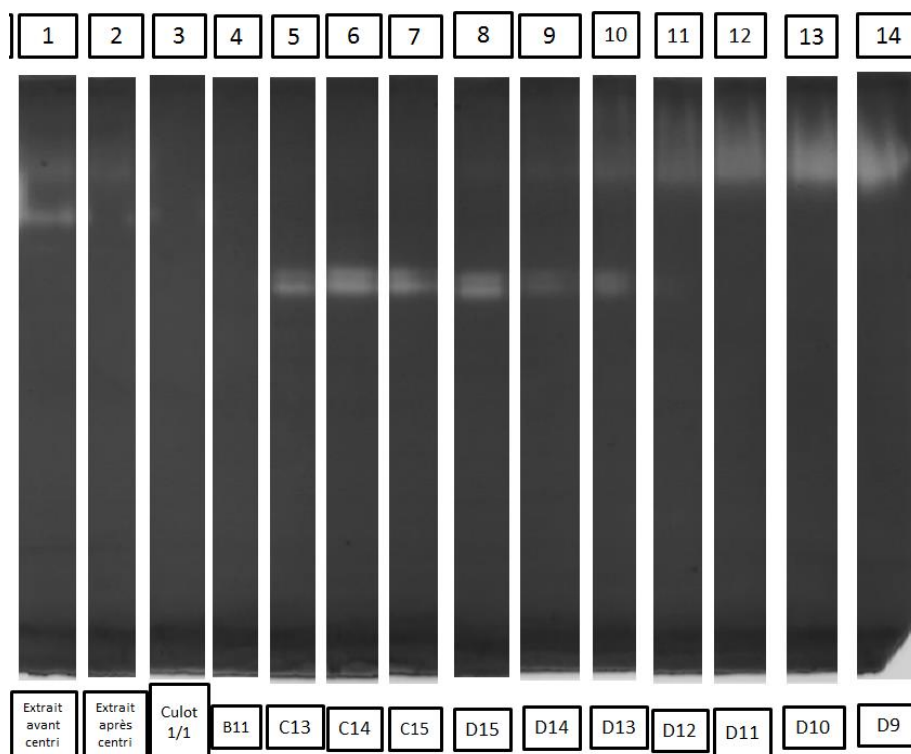


Figure 7A : Analyse par Native-PAGE et coloration de Woodbury et Coll de l'extrait fongique avant (Piste 2) et après centrifugation (Piste 3) et des fractions chromatographiques obtenus au cours de la CEA (les zones décolorées révèlent la présence d'une activité catalasique)



Figure 7B: Analyse par Native-PAGE et coloration de Woodbury et Coll des fractions chromatographiques obtenus au cours de la CEA (les zones décolorées révèlent la présence d'une activité catalasique)

Cet extrait analysé par coloration négative du gel natif révèle 3 zones d'activité catalasique (**Figure 8**). L'enzyme qui migre le moins loin forme une bande étalée en forme de trainée (smear) : c'est la catalase A2. On observe un peu plus bas 2 bandes proches l'une de l'autre et de faible intensité : il s'agit de la catalase A1. La bande qui migre le plus loin, de forte intensité, constitue la catalase A1'

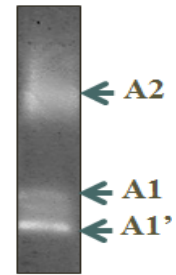


Figure 8 : Analyse par Native-PAGE (5-15%) des 3 catalases de *S. apiospermum* obtenues après décongélation et centrifugation de l'extrait fongique.

2. Purification de la catalase A2.

2.1. Purification partielle par DEAE

L'extrait fongique a été centrifugé puis les composants contenus dans le surnageant ont été séparés par CEA sur gel de DEAE à l'aide d'un gradient croissant linéaire de NaCl (0-25 mM). Le chromatogramme obtenu au cours de la CEA présente 7 pics majeurs d'absorbance à 280 nm (**Figure 9**).

Plusieurs zones possédant une activité catalase ont été mises en évidence au sein des fractions C13 à E1 de cette chromatographie par la recherche de dégagement de bulles d'O₂ sur verre en présence d'H₂O₂. L'analyse par Native-PAGE révèle la séparation des 3 catalases observées initialement dans l'extrait fongique (**Figure 7A et 7B**) :

- Une première bande épaisse et claire contenue dans les fractions C13 à D13 (**Figure 7A**, pistes 5-10), correspondant à des conductivités comprises entre 7,87 mS/cm et 10,877 mS/cm. Il s'agit de la catalase A1.
- Une deuxième zone claire plus diffuse (smear) est observée dans les fractions D13 à D5 (**Figure 7A**, pistes 10-14 ; **Figure 7B**, pistes 1-4), ayant une conductivité comprise entre 10,353 mS/cm et 15,445 mS/cm. Il s'agit de la catalase A2.
- Une troisième bande fine et claire est retrouvée dans les fractions D4 à D1 (**Figure 7B**, pistes 5-8), de conductivité comprise entre 15,498 mS/cm et 17,394 mS/cm. Elle correspond à la catalase A1'.

L'analyse en SDS PAGE puis la coloration au Bleu de Coomassie des fractions enrichies en catalase A2 (pool smear) révèle un nombre plus faible de composants que l'extrait brut (**Figure 6**, piste 5). Certains constituants de l'extrait initial ont été concentrés au cours de la chromatographie, cependant la catalase A2 n'a pas pu être repérée au sein de ce profil électrophorétique par cette méthode. Ces fractions toutefois enrichies en catalase A2 constitueront notre source antigénique pour le criblage des anticorps monoclonaux.

2.2. Purification de la catalase A2

La catalase A2 a été purifiée préalablement à ce stage par un processus comprenant 3 chromatographies successives : une échange d'anions identique à celle que nous avons réalisée suivie d'une

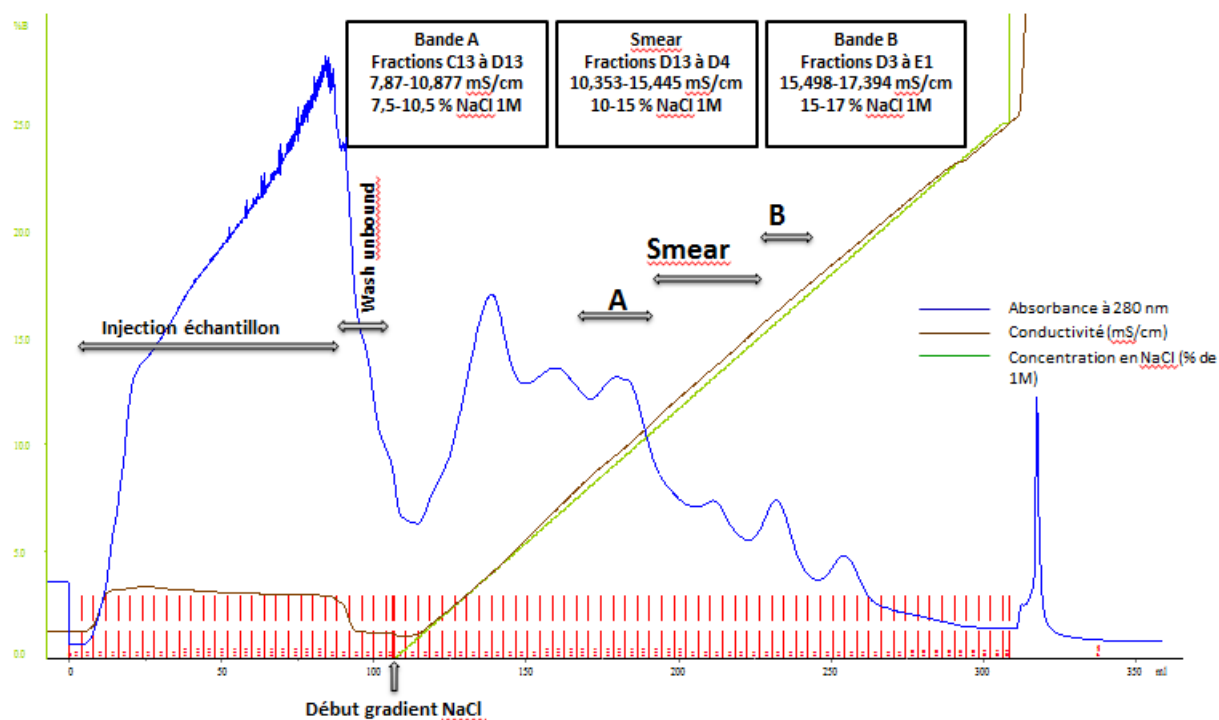


Figure 9 : Chromatogramme de la chromatographie échangeuse d'anions sur gel DEAE du surnageant de l'extrait fongique brut après centrifugation.

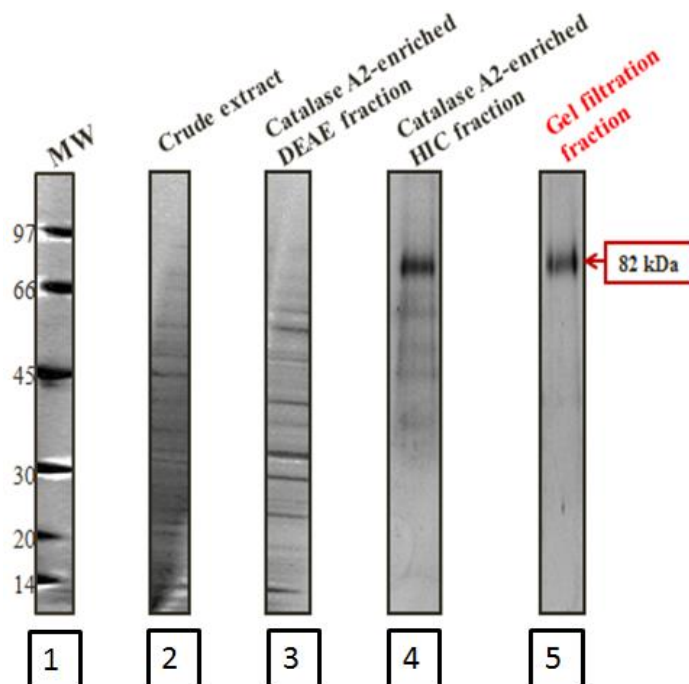


Figure 10 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE (5-15%) et coloration à l'argent des fractions enrichies en catalase A2 au fur et à mesure du processus de purification. (Source: Towards a standardized test for serodiagnosis of scedosporiosis, S. MINA)

d'interactions hydrophobes (HIC) et enfin d'une gel filtration (GF). L'analyse en SDS-PAGE avec un gel en gradient de 5 à 15% d'acrylamide des fractions enrichies en catalase A2 montre la concentration progressive en un composant de 82 kDa à partir de la chromatographie d'HIC, celui-ci étant le seul matériel (glyco) protéique colorable à l'issue du processus (**Figure 10**, piste 5). Le matériel ainsi obtenu à l'issue du processus de purification et contenant l'activité catalase de type A2 a été utilisé pour l'immunisation de 3 souris.

3. Immunisation des souris

3.1. Contrôle d'immunisation des souris

La réponse des anticorps des souris immunisées avec la catalase A2 partiellement purifiée a été évaluée par technique ELISA. Cette technique a dû être mise au point. Pour cela, les concentrations optimales de l'extrait enrichie en catalase A2 et la dilution optimale des immunosérums de souris ont été évaluées par la méthode du damier à l'aide des sérums pré-immuns et des sérums prélevés après 3 injections de l'immunogène.

Les souris n°2 et 3 ont été retenues en raison d'un différentiel plus important entre les valeurs d'absorbance après 3 injections et le sérum pré-immun (**Figure 11**). D'autre part, les conditions opératoires retenues pour le criblage des hybridomes par ELISA sont une dilution au 1/100 de la fraction enrichie en catalase A2 obtenue après DEAE et une dilution au 1/100 des IS de souris lorsque ceux-ci seront utilisés en tant que témoin positif au cours de la phase de criblage des hybridomes.

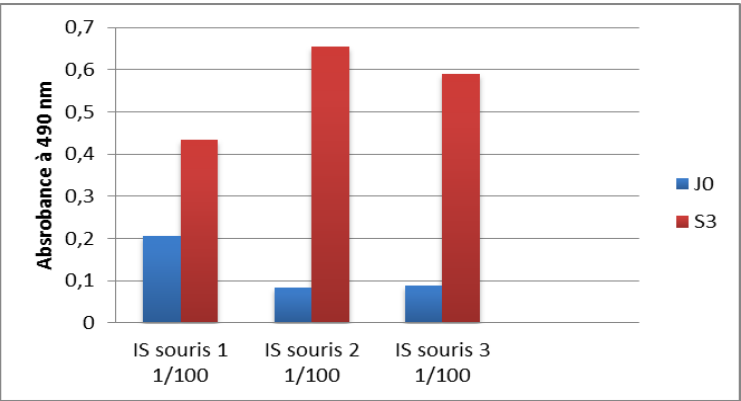
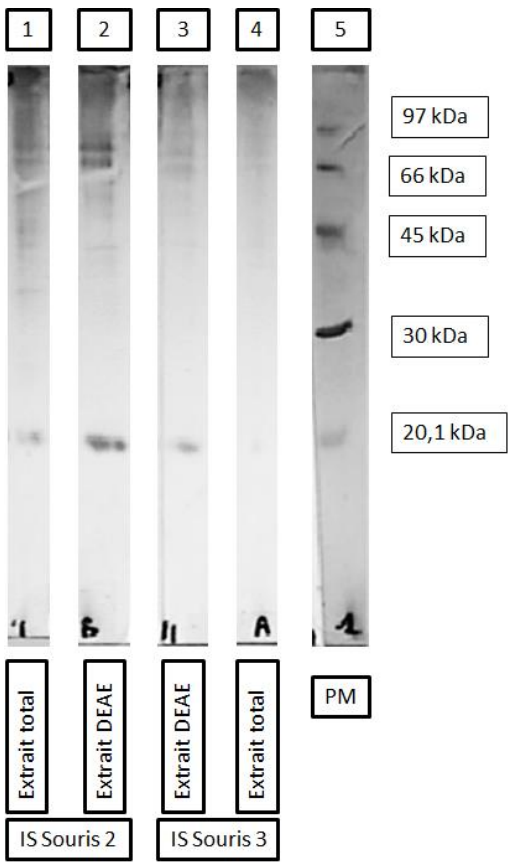


Figure 11 : Réactivité par technique ELISA des sérums de souris à JO (sérum préimmun) et S3 (après 3 injections).

Figure 12 : Analyse par SDS-PAGE 12,5% puis par immunoblot de l'extrait fongique total (Pistes 1 et 4) et de l'extrait enrichie en catalase A2 après CEA (Pistes 2 et 3) par les immunosérums des souris 2 (Pistes 1 et 2) et 3 (Pistes 3 et 4).



3.2. Réactivité des IS en Western-Blot

Les sérums des souris 2 et 3 ont été testés par immunoblot vis à vis d'un extrait total fongique, de la fraction enrichie en catalase A2 par DEAE et de la catalase A2 purifiée. Les IS de souris ont été dilués au 1/100^{ème} et le conjugué anti-IgG (H+L) de souris a été dilué au 1/1000^{ème}. Les bandes révélées par l'IS de la souris 2 sont de faible intensité mais plusieurs bandes sont visibles, notamment une de 85 kDa (**Figure 12**). Il pourrait s'agir de la catalase A2. Une autre bande plus épaisse et intensément colorée présente une masse moléculaire de 20 kDa. Les pistes révélées avec l'IS de la souris 3 donnent le même profil mais les bandes sont d'intensité plus forte. L'extrait total contient une bande à 85 kDa et une à 20 kDa de faible intensité. L'extrait DEAE contient les mêmes bandes plus intenses à 85 kDa et 20 kDa et une troisième bande à 74 kDa. Il peut être remarqué que la P20 semble plus abondante dans la fraction de DEAE enrichie en catalase A2 que dans l'extrait initial.

4. Fusion et clonage

Voir **Annexe 6**.

4.1. Rendement des fusions

Les fusions 1 et 2 réalisées ont donné lieu respectivement à 729 et 514 puits contenant des hybridomes à l'issue de la sélection sur milieu HAT. Certains puits contiennent 2 à 4 clones. Les fusions 1 et 2 ont donné respectivement 1101 et 638 clones, soit un total de 1739 clones pour les 2 fusions. Avec un nombre initial de $3,69.10^7$ splénocytes le rendement global des fusions est de 0,003%.

4.2. Criblage primaire

La grande majorité des puits (>90%) ont donné des absorbances très faibles situées entre 0,050 et 0,060 Unité d'Absorbance (UA). Nous avons donc retenu comme valeur seuil une absorbance égale au double des puits considérés comme négatifs, soit une valeur seuil de 0,100 UA. Parmi les puits sélectionnés, 31 d'entre eux ont donné des absorbances inférieures à 0,200 au premier criblage et des absorbances inférieures à 0,100 lors du second passage. Ceux-ci ont donc été abandonnés. Les puits considérés comme positifs lors du premier criblage et non confirmés ultérieurement peuvent s'expliquer par des faux positifs ou un choix de seuil un peu bas. Dix-huit hybridomes ont donné des absorbances entre 0,200 et 0,499 au premier passage. Parmi ceux-ci, 8 ont redonnés une absorbance supérieure à 0,100, 9 ont donné une absorbance non significative et 1 n'a pas encore été retesté. Enfin, 8 hybridomes ont donné des absorbances supérieures à 0,500 lors du premier criblage. Après un deuxième criblage, 5 ont été confirmés (9D11, 12C9, 2F3, 20D9, 6F8) et 3 ont donné des absorbances bien inférieures à 0,100. Pour les puits 9F4 et 17D9, un faux positif ou une perte de la capacité de sécrétion de l'hybridome peuvent être à l'origine de ces résultats. Pour le 9F5 qui contenait 3 clones, s'ajoute à ces possibilités l'hypothèse de l'« étouffement » du clone positif par les 2 autres. Le criblage, réalisé sur 1 mois, des hybridomes par technique ELISA avec l'extrait enrichi en catalase A2 a donc permis de sélectionner 13 puits d'hybridomes. Ces puits ont fait l'objet du criblage secondaire.

4.3. Criblage secondaire

La fraction enrichie en catalase A2 contient de multiples protéines, comme l'a démontré l'analyse en SDS-PAGE. C'est pourquoi les surnageants de culture des hybridomes sélectionnés précédemment ont été testés vis à vis de la catalase A2 purifiée et de l'extrait enrichi en catalase A2 lors d'une même expérience. Six puits ont donné des absorbances inférieures à 0,100 sur les 2 catalases et 2 puits n'ont pas encore été testés. Six autres puits ont donné des valeurs d'absorbances significatives sur l'extrait enrichi en catalase A2 mais pas avec la catalase A2 purifiée. Enfin, 4 puits ont présentés une absorbance significative sur les 2 antigènes (9D11, 12C9, 5F11 et 11F2).

4.4. Clonage

Les puits d'hybridomes dont les valeurs d'absorbances ont été les plus significatives ont été clonés. Au total, 23 puits ont été clonés à raison de 1 cellule par puits, en théorie. Parmi eux, 14 présentent de nombreux clones, 8 n'ont donné que peu de clones et 1 n'a donné aucun clone. Ces clones ont été testés vis-à-vis de l'extrait enrichi en catalase A2. Pour les 4 puits retenus positifs sur l'extrait enrichi en catalase A2 et la catalase A2 purifiée (9D11, 12C9, 5F11 et 11F2), les sous clones obtenus ont donné des valeurs d'absorbances égales ou supérieures aux puits d'origine. Ceci a permis de sélectionner les hybridomes sécrétant l'anticorps recherché parmi les autres hybridomes pouvant être présents dans le même puits. De plus, cela confirme la positivité des puits d'hybridomes initialement sélectionnés et la spécificité observée lors du criblage secondaire. Sur 6 puits réactifs avec l'extrait enrichi en catalase A2 mais négatifs avec la catalase A2 purifiée, 5 ont été clonés et 1 a été perdu.

4.5. Immunoréactivité sur membrane

A ce jour, seulement 3 puits ayant présenté une pousse suffisante ont pu être analysés en immunoblot. Le surnageant de culture du puits 19F1 donne le signal le plus important. Il réagit majoritairement avec un constituant d'environ 35 kDa. D'autres constituants sont malgré tout également révélés mais avec une intensité du signal plus faible. Le surnageant de culture du puit 12C9 ne montre aucun signal spécifique dans la mesure où les molécules faiblement révélées le sont aussi avec le surnageant du puits 19C6. Ce dernier se caractérise toutefois par la reconnaissance de 2 composants de masse moléculaire de 21 kDa et 56 kDa.

V. Discussion

L'objectif de ce travail était l'obtention d'anticorps monoclonaux anti catalase A2. La purification de cette enzyme est relativement fastidieuse, non seulement par le nombre de chromatographies à réaliser mais aussi par la technique de coloration négative en gel natif de polyacrylamide qui est la seule technique de mise en évidence spécifique de cette enzyme. L'obtention d'un anticorps dirigé contre cette enzyme apporterait une aide non négligeable pour sa recherche au sein des fractions chromatographiques par une technique ELISA. La purification de l'enzyme pourrait également être réalisée à l'aide de ces anticorps, grâce à une unique chromatographie d'affinité après sensibilisation d'un gel par l'anticorps monoclonal qui présenterait une forte affinité pour l'enzyme.

Dans le contexte du diagnostic des infections respiratoires d'origine fongique et notamment dans le cas des aspergilloses, la recherche d'anticorps dirigés contre la catalase de ce champignon est une des méthodes retenues comme les plus pertinentes. Toutefois, on ne peut écarter l'existence de réactions croisées entre les catalases d'*Aspergillus* et celles de *Scedosporium*. Dans une telle situation, un sérum de patient infecté par *Scedosporium* peut être considéré comme faussement infecté par *Aspergillus* si celui-ci est testé vis-à-vis de la catalase d'*Aspergillus*, et inversement.

L'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope spécifique de la catalase de *Scedosporium* pourrait écarter cette erreur de diagnostic. En effet, si cet anticorps spécifique est mis en compétition avec l'immunsérum à tester vis-à-vis de la catalase de *Scedosporium sp*, la disparition ou diminution forte du signal traduira la présence dans le sérum du patient d'anticorps anti catalase de *Scedosporium*. La fixation d'anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques communs aux 2 genres ne devrait pas affecter le signal obtenu. En anatomopathologie, la présence de filaments permet de poser le diagnostic de certitude d'une infection fongique. Toutefois les filaments de différents genres, notamment ceux de *Scedosporium* et d'*Aspergillus*, ont une morphologie similaire *in vivo*. Le couplage à un fluorophore ou à une enzyme d'un anticorps monoclonal reconnaissant un antigène spécifique de *Scedosporium* pourrait permettre de poser le diagnostic différentiel plus rapidement entre ces 2 genres sans attendre le résultat de la culture. Pour

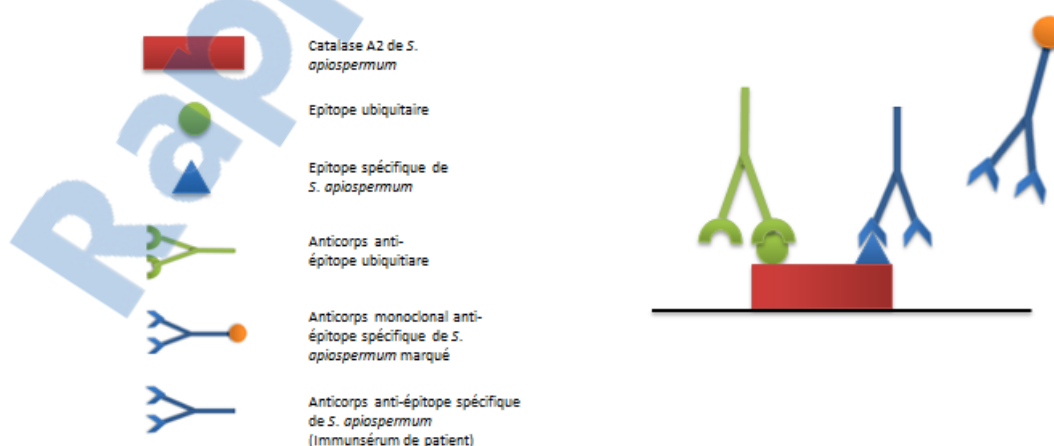


Figure 13 : Principe d'un test ELISA de type compétitif pour la mise en évidence d'anticorps sériques spécifiques de la catalase de *Scedosporium apiospermum*.

le développement d'un tel anticorps, l'option retenue a été d'immuniser avec la catalase A2 purifiée, afin de réduire les possibles immunosuppressions occasionnées par d'autres constituants fongiques.

Le développement d'un anticorps monoclonal est un projet qui nécessite plusieurs mois entre le début d'immunisation et l'obtention de l'anticorps monoclonal recherché et cloné. En effet il est conditionné par la croissance plus ou moins lente des cellules et nécessite un suivi journalier des cultures. S'ajoute à cela la réalisation parfois concomitantes des criblages primaires puis secondaires et la sélection des clones en fonction des résultats obtenus. La stratégie de criblage retenue consiste en un criblage primaire avec l'extrait enrichi en catalase A2 et donc très partiellement purifiée dans le but d'alléger la quantité de travail au niveau de la purification, dans la mesure où un nombre considérable de puits devaient être évalués (plus de 1 000). Ce criblage primaire a permis de réduire considérablement les puits à tester vis-à-vis de la catalase purifiée. A l'issue de ce travail, 4 clones semblent plus particulièrement prometteurs et notamment 2 (9D11 et 12C9) dont l'absorbance est élevée et constante.

La réactivité de l'anticorps monoclonal 9D11 n'a pu être évaluée en immunoblot, faute d'une faible croissance cellulaire. L'immunoblot avec l'anticorps monoclonal 12C9 ne permet pas de statuer quant à sa spécificité vis-à-vis de la catalase A2, même si celui-ci semble reconnaître en ELISA la catalase A2 purifiée. En effet même si celle-ci semble pure en SDS-PAGE et coloration à l'argent, l'immunsérum des souris immunisées montre en immunoblot une réactivité sur plusieurs composants de 20 kDa, 85 kDa et 74 kDa (**Figure 8**) lorsqu'il est testé sur la catalase A2 prépurifiée. Il révèle également en immunoblot un composant de 110 kDa au sein de l'échantillon contenant la catalase purifiée. Ceci démontre donc que la préparation de catalase purifiée est légèrement contaminée.

D'autre part, lors d'un SDS-PAGE les échantillons sont soumis à une double dénaturation par le SDS et la chaleur. L'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal est peut être dénaturé, expliquant l'absence de réaction en immunoblot. Pour éclaircir ce point un électrotransfert à partir d'un gel natif pourra être tenté, suivi d'une immunodétection sur membrane. Les signaux obtenus pour l'anticorps 19C6 sont de faible intensité, et les premiers résultats nécessitent une confirmation. Seul l'anticorps monoclonal 19F1 donne un résultat concluant en immunoblot, avec fixation sur un composant de 48 kDa. Cette masse est très différente de celle des sous-unités de la catalase A2 (82kDa). Ce résultat est en accord avec celui de l'ELISA qui ne révélait pas d'interactions avec la catalase purifiée.

Beaucoup de travail doit encore être réalisé. Les clones retenus devront tous être testés en immunoblot et isotypés. Leur spécificité vis-à-vis de la catalase A2 de *Scedosporium* à l'exclusion de celles d'*Aspergillus* devra être évaluée.

Conclusion et perspectives

Scedosporium apiospermum est un pathogène fongique opportuniste et émergent, faisant l'objet d'un nombre d'études croissant. En effet, en l'absence de diagnostic spécifique et rapide et de fortes similitudes avec *Aspergillus fumigatus*, le nombre d'infections graves dûes à *S. apiospermum* sont sans doute encore sous-estimées car mal identifiées. *S. apiospermum* est principalement étudié dans le cadre de la mucoviscidose où il est à l'origine d'infections et de complications broncho-pulmonaires.

Les clones obtenus après fusion semblent donner des résultats positifs en ELISA vis-à-vis de la catalase A2 purifiée. Pour autant, les clones sélectionnés testés en immunoblot sur la catalase A2 purifiée montrent une réactivité sur plusieurs bandes. De plus, plusieurs composants sont révélés en immunoblot par l'immunsérum des souris immunisées vis-à-vis de l'enzyme purifiée. La catalase A2 purifiée qui a servi à l'immunisation des souris n'est donc peut-être pas totalement pure. Les résultats ne peuvent alors pas affirmer la spécificité des anticorps monoclonaux.

Statuer quant à la spécificité des anticorps monoclonaux nécessite un échantillon de catalase A2 totalement purifiée. Pour cela, une nouvelle purification de la catalase A2 devra être réalisée en réduisant le nombre de fractions regroupées à l'issue de chaque chromatographie afin d'accroître le facteur de purification, même si le rendement est diminué. Le produit obtenu pourra être analysé par électrophorèse bi-dimensionnelle afin de vérifier sa pureté. Suite à cela, un électrotransfert à partir d'un gel natif contenant la catalase totalement pure pourra être tenté, suivi d'une immunodétection sur membrane. Enfin, les anticorps monoclonaux devront être isotypés et leur spécificité vis-à-vis de la catalase A2 de *Scedosporium* à l'exclusion de celles d'*Aspergillus* devra être évaluée.

L'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope spécifique de la catalase de *Scedosporium* pourrait être utilisée pour le développement d'une méthode diagnostique des infections fongiques à ce champignon. De tels anticorps permettraient aussi d'éviter les réactions croisées avec les champignons du genre *Aspergillus*, source d'erreurs de diagnostic. De plus, ils permettront une purification rapide et totale de la catalase par une simple chromatographie d'affinité ou sa recherche plus aisée dans les fractions chromatographiques par méthode ELISA.

Annexes

ANNEXE 1 : MILIEUX DE CULTURE

1- Milieu gélose d'YPDA

Chloramphénicol	0,5 g
Yeast Extract	5 g
Peptone	10 g
Glucose	20 g
Agar Agar	20 g
Eau distillée	1 000 mL

2- Milieu liquide d'YPD

Chloramphénicol	0,5 g
Yeast Extract	5 g
Peptone	10 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1 000 mL

ANNEXE 2 : SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE

Les formules indiquées sont celles utilisées pour des gels SDS-PAGE. Pour le PAGE-Natif le SDS est omis pour l'ensemble de ces solutions.

1- Solutions de polyacrylamide (37,5:1) à 40% pour gel homogène

GELS HOMOGENES 12,5%	1 gel	2 gels	3 gels	4 gels
Acrylamide stock (mL)	9,38	18,75	28,13	37,5
Tampon Tris SDS pH 8,8 (mL)	15	30	45	60
Eau distillée (mL)	5,62	11,25	16,87	22,5
APS 10% (µL)	75	150	225	300
TEMED (µL)	7,5	15	22,5	30
Volume total (mL)	30	60	90	120

2- Solutions de polyacrylamide (37,5:1) à 40% pour gel en gradient 5-15%

SOLUTION 5%	1 gel	2 gels	3 gels	4 gels
Acrylamide stock (mL)	1,95	3,9	5,85	7,8
Tampon Tris SDS ph 8,8 (mL)	7,78	15,56	23,35	31,12
Eau distillée (mL)	5,83	11,65	17,48	23,31
APS 10% (μL)	38,9	77,8	116,7	155,6
TEMED (μL)	3,89	7,78	11,67	15,56
Volume total (mL)	15,6	31,2	46,8	62,4

SOLUTION 15%	1 gel	2 gels	3 gels	4 gels
Acrylamide stock (mL)	5,85	11,7	17,55	23,4
Tampon Tris SDS ph 8,8 (mL)	7,78	15,56	23,34	31,12
Eau distillée (mL)	1,93	3,85	5,78	7,71
APS 10% (μL)	38,9	77,8	116,7	155,6
TEMED (μL)	3,89	7,78	11,67	15,56
Volume total (mL)	15,6	31,2	46,8	62,4

3- Stacking gel à 4% à partir de solution de polyacrylamide à 40% (37,5:1)

STACKING GEL 4%	1 gel	2 gels	3 gels	4 gels
Acrylamide stock (mL)	1	2	3	4
Tampon Tris SDS pH6,8 (mL)	5	10	15	20
Eau distillée (mL)	4	8	12	16
APS 10% (μL)	100	200	300	400
TEMED (μL)	10	20	30	40
Volume total (mL)	10	20	30	40

4- Tampon électrophorèse (SDS-PAGE)

Tris (MM=121,1)	15,15 g	30,30 g
SDS (MM=288,4)	5 g	10 g
Glycine (MM= 75,07)	72 g	144 g
Eau distillée qsp	5 L	10 L
pH=8,3 à vérifier		

5- Tampon Tris-SDS pH 8,8 (Tris 0,75 M – SDS 0,2%)

Tris (MM=121,1)	9,09 g	18,18 g	45,45 g
SDS (MM=288,4)	0,2 g	0,4 g	1 g
Ajuster le pH à 8,8 avec de l'HCl 1N			
Eau distillée	qsp	100 mL	200 mL
Conserver à 4°C			

6- Tampon Tris-SDS pH 6,8 (Tris 0,75 M – SDS 0,2%)

Tris (MM=121,1)	3,03 g	6,06 g	15,15 g
SDS (MM=288,4)	0,2 g	0,4 g	1 g
Ajuster le pH à 6,8 avec de l'HCl 1N			
Eau distillée	qsp	100 mL	200 mL
Conserver à 4°C			

7- Persulfate d'ammonium 10% (APS)

Ammonium persulfate (mm=228,2)	1 g
Eau distillée	10 mL
Aliquoter par 500 µL	
Conserver à -2°C (ne décongeler qu'une seule fois)	

8- Tampon échantillon pour SDS-PAGE (5xCC) (Tris 312,5 mM, SDS 10,2% (P/V), glycérol 75%, pH 6,8)

A préparer dans une éprouvette à chaud			
Tris (MM=121,1)	0,757 g	1,514 g	
SDS (MM=288,4)	2,049 g	4,098 g	
Glycérol	15 mL	30 mL	
Bleu de bromophénol	1 mg	2 mg	
Ajuster le pH à 6,8 avec de l'HCl			
Eau distillée	qsp	20 mL	40 mL

ANNEXE 3 : COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE**1- Fixateur SDS-PAGE (isopropanol 25%, acide acétique 10%)**

Isopropanol	250 mL	500 mL	1 000 mL
Acide acétique glacial	100 mL	200 mL	400 mL
Eau distillée	qsp	1 000 mL	2 000 mL
Laisser agiter 1h avant utilisation			

2- Colorant Bleu de Coomassie (bleu 0,1%, méthanol 25%, acide acétique 10%)

Coomassie blue (R 250) (MM=826)	1 g	2 g
Méthanol	250 mL	500 mL
Acide acétique glacial	100 mL	200 mL
Eau distillée qsp	1 000 mL	2 000 mL

3- Décolorant électrophorèse (méthanol 25%, acide acétique 10%)

Méthanol	250 mL	500 mL	1 000 mL
Acide acétique	100 mL	200 mL	400 mL
Eau distillée qsp	1 000 mL	2 000 mL	4 000 mL

ANNEXE 4 : SOLUTIONS POUR L'IMMUNODETECTION EN ELISA**1- Tampon citrate-phosphate 0,15 M pH 5 (Pour la révélation de l'activité peroxydase en ELISA)**

Acide citrique 49 mL

Phosphate de Sodium 51 mL

Contrôler le pH à 5, ajuster avec phosphate de sodium si besoin

A préparer extemporanément

2- Solution d'acide citrique

Acide citrique (MM : 192,13) 21 g

Eau distillée q.s.p 1 000 mL

Conserver à 4°C

3- Solution de phosphate de sodium (Na₂HPO₄)

Phosphate disodique (12H₂O) 53,7 g

Eau distillée q.s.p 1 000 mL

Conserver à 4°C

4- Solution de révélation de l'activité peroxydase en ELISA et révélation

Tampon citrate-phosphate 0,15 M pH 5 40 mL 80 mL

Orthophénylène diamine 30 mg 60 mg

Laisser dissoudre 5-10 min à l'obscurité

H₂O₂ (110 vol) 40 µL 80 µL

5- Acide sulfurique 1 M (solution d'arrêt de la peroxydase en ELISA)

Acide sulfurique (18 N ou 36 M) 13,9 mL

Eau distillée qsp 1 000 mL

Conserver à température ambiante

6- Tampon Carbonate-Bicarbonate de Sodium 50 mM pH 9,6 (solution de dilution d'antigènes)

Carbonate de Sodium	20 mL	40 mL	80 mL
Bicarbonate de Sodium	42,5 mL	85 mL	170 mL
Eau distillée qsp	250 mL	500 mL	1 000 mL

A préparer extemporanément, conserver à court terme à 4 °C.

7- PBS-Tween 20 0,5‰ (P/V) (solution de lavage ELISA, Blot)

Tween 20	0,5 g	1 g	1,5 g
PBS	1 L	2 L	3 L

8- PBS-Lait 10% (P/V) (solution de saturation ELISA, Blot)

Lait écrémé	5 g	10 g	20 g
PBS	50 mL	100 mL	200 mL

9- PBS-Tween 0,5‰ - lait 1% (solution de dilution d'anticorps et de conjugué)

PBS-Tween 0,5‰	9 mL	18 mL	27 mL	36 mL
PBS-lait 10%	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL

ANNEXE 5 : SOLUTIONS POUR ELECTROTRANSFERT SUR MEMBRANE**1- Tampon Blotting (Tris 48 mM, Glycine 39 mM, SDS 0,0375% (P/V), méthanol 20%, pH 8,3)**

Tris (MM=121,1)	5,81 g
Glycine (MM=75,07)	2,93 g
SDS (MM=288,4)	0,375 g
Méthanol	200 mL
Eau distillée qsp	1 000 mL

Conserver à 4°C

2- Solution de révélation de l'activité peroxydase en Blot et révélation

DAB (Diaminobenzidine)	5 mg	10 mg	20 mg
Tampon TRIS-HCl 0,1 M pH 7,6	10 mL	20 mL	40 mL
Agiter pendant 10 min sur agitateur magnétique (solubilisation partielle)			
Vérifier le pH à 7,6 et ajuster avec NaOH			
Ajouter H ₂ O ₂ (110 vol)	10 µL	20 µL	40 µL

3- Solution d'arrêt de l'activité peroxydase en Blot (acide acétique 5%)

Acide acétique (glacial)	25 mL
Eau milli-Q qsp	500 ml

ANNEXE 6 : TABLEAU RECAPITULATIF DES CLONAGES

	Puits fusion	criblage 1	criblage 2					
		catalase A2 enrichie	catalase A2 enrichie	catalase A2 purifiée	sous clones	DO sous clone	catalase A2 enrichie	catalase A2 purifiée
	9D11	723	555 63	487	9D11-D6	678 (499)	82	154
	12C9	638	544 1316	364	12C9-C2	466 (1218)	516	498
					12C9-C8	512 (1114)	572	540
					12C9-E2	599 (1375)	548	473
					12C9-E8	559 (1216)	ND	ND
	2F3	874	343	82	2F3-F6	130 1399	166	93
					2F3-E3	1399		
	20D9	680	219	90	20D9-B3	396 (777)	201	186
					20D9-B4	440 (810)	466	86
					20D9-C8	375 (695)	ND	ND
	9F5	601	44 56	96				
	6F8	821	81 363	55 64	6F8-C7	231		
					6F8-D3	533		
	17D9	561	73	65				
	9F4	539	58 57 60		PERDU			
	19F1	371	283 713	106	19F1-C3	602 (711)	382	285
					19F2-C10	662 (738)	452	273
					19F1-C12	583 (775)	470	297
					19F1-G6	602 (879)	ND	ND
					19F1-D8	664 (769)	ND	ND
	12A2	419	ND	ND	12A2-G8	328 (291)		
	19C6	303	143 256 496	68 152	19C6-F4	455 (746)		
					19C6-G4	183 (207)		
					19C6-E6	1095		
					19C6-F6	1229		
	20B10	391	91 43	88 49	20B10-D10	132 (312)		
					20B10-C9	232		
	6C7	335	121	69	6C7-B8	95		
					6C7-C9	138 (335)		
					6C7-F9	130 (172)		
					6C7-D10	631		
	5F11	380	81 248 160	56 220	5F11-C7	173 (172)		
					5F11-C11	1014		
					5F11-E9	340		
	11F2	218	285 61	140 51	11F2-B7	1425		
					11F2-B5	787		
	9A5	424	70 276 372	54 114				
	4C7	473	134 248	81				
	14D6	393	66 53 152	59 76	14D6-F5	329		
	9F11	332	69 43	63 48				

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des valeurs d'absorbances à 490 nm obtenus lors des criblages primaires et secondaires des puits d'hybridomes, des clones et des sous clones obtenues après clonage. Deux valeurs d'absorbances alignées sont issues d'une même expérience.

Bibliographie

- [1] CIMON B., 1999. Infections fongiques dans la mucoviscidose: étude épidémiologique et caractérisation des exoprotéases et des catalases de *Scedosporium apiospermum*." U.F.R. des Sciences Médicales, Angers. Doctorat en Biologie – Santé. 165p.
- [2] PERSEPTIVE BIOSYSTEMS, 1996. The Busy Researcher's Guide to Biomolecule Chromatography: 135-154.
- [3] DE HOOG G.S, MARVIN-SIKKEMA FEMKE D., LAHPOOR GREETJE A., *et al.*, 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* 37: 71-78.
- [4] HOCQUETTE A., GRONDIN M., BERTOUT S., and MALLIE M., 2005. *Acremonium*, *Beauveria*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Onychocola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scedosporium* and *Scopulariopsis* fungi responsible for hyalohyphomycosis. *Journal of Medical Mycology* 15(3) : 136-149.
- [5] VINATIER J-F., 1999. Rôle des champignons dans la pathologie respiratoire au cours de la mucoviscidose : études épidémiologiques et cliniques. Faculté de Médecine, Angers. Diplôme d'état de docteur en médecine : 150.
- [6] MINA S., 2011. Etude des constituants des tubes germinatifs de *Scedosporium apiospermum*. Université Libanaise, Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie. Mémoire de Master 2 Recherche. 51p.
- [7] LE GLOANEC P., 2012. Purification d'une catalase de *Scedosporium apiospermum*. Mémoire de stage, Institut Universitaire de Technologie d'Angers. 28p.
- [8] PHARMACIA FINE CHEMICALS, 1979. Filtration sur gel théorie et pratique. Uppsala : Pharmacia Fine Chemicals. 61p.
- [9] GUARRO J., KANTARCIOGLU A.S., HORRE R., *et al.*, 2008. *Scedosporium apiospermum* : changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Medical mycology*, 44: 295-327.
- [10] FIGUEIREDO R.T., FERNANDEZ P.L., 2010. Molecular detection and characterization of fungal heat shock protein 60. *Mycoses*, 54: 344-349.
- [11] NUCCI M., 2003. Emerging moulds : *Fusarium*, *Scedosporium* and *Zygomycetes* in transplants recipients. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16: 607-612.
- [12] PINTO M. R., MULLOY B., *et al.*, 2001. A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. *Microbiology*, 147: 1499-1506.
- [13] KAUFMAN L., STANDARD P. G., *et al.*, 1997. Immunohistologic identification of *Aspergillus spp.* and other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2206-2209.
- [14] MUNOZ P., MARIN M., *et al.*, 2000. Successful outcome of *Scedosporium apiospermum* disseminated infection treated with Voriconazole in a patient receiving corticosteroid therapy. *Clinical Infectious Disease*, 31: 1499-1501.
- [15] WINN R. M., GIL-LAMAIGNERE C., 2005. Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against *Fusarium spp.* and *Scedosporium spp.* *Cytokine*, 31: 1-8.
- [16] HEBRARD M., 2010. Etude des systèmes antioxydants dans le métabolisme et la virulence de *Salmonella tiphimurium*. Thèse de doctorat : Microbiologie moléculaire et Biotechnologie. Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II : 130p.
- [17] MAYFIELD J. E., and DUVALL M. R., 1996. Anomalous phylogenies based on bacterial catalase gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 42: 469-471.

[18] CHELIKANI P., FITA I., LOEWEN C., 2004. Diversity of structure and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Science, 61: 192-208.

Sites Web:

[19] <http://www.univ-angers.fr/fr/recherche/unites-et-structures-de-recherche/pole-sante/geihp.html>
(24/04/2013)

[20] http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=geihp&source=web&cd=2&ved=0CDgQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.aeres-evaluation.fr%2Fcontent%2Fdownload%2F16650%2F264048%2Ffile%2FB2012-EV-0490970N-S2UR120003161-RD.pdf&ei=Ev3UZSaBcXPbrJgOgC&usg=AFQjCNGScU3HmPI_n52RNG0PJueloSKLew&bvm=bv.45580626,d.d2k (24/04/2013)

Table des illustrations

Figure 1 : Microphotographie des conidiophores et conidies de <i>S. apiospermum</i>	4
Figure 2 : Microphotographie de la forme asexuée de <i>S. apiospermum</i> de type <i>Graphium</i> . Conidiophores liés ensemble en aspect de germe de blé.....	4
Figure 3 : Réaction de dismutation de l'eau oxygénée catalysée par la catalase.....	13
Figure 4 : Schéma du principe de la coloration négative de Woodbury et Coll pour la révélation de la catalase.....	14
Figure 5 : Principe de la technique ELISA.....	15
Figure 6 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE (5-15%) et coloration au bleu de Coomassie de l'extrait fongique brut (Piste 2), de l'extrait centrifugé (Piste 3), du culot (Piste 4) ou du pool des fractions chromatographiques obtenues après CEA contenant l'activité catalasique A2 (Piste 5).....	17
Figure 7A : Analyse par Native-PAGE et coloration de Woodbury et Coll de l'extrait fongique avant (Piste 2) et après centrifugation (Piste 3) et des fractions chromatographiques obtenus au cours de la CEA (les zones décolorées révèlent la présence d'une activité catalasique).....	18
Figure 7B : Analyse par Native-PAGE et coloration de Woodbury et Coll des fractions chromatographiques obtenus au cours de la CEA (les zones décolorées révèlent la présence d'une activité catalasique).....	18
Figure 8 : Analyse par Native-PAGE (5-15%) des 3 catalases de <i>S. apiospermum</i> obtenues après décongélation et centrifugation de l'extrait fongique.....	19
Figure 9 : Chromatogramme de la chromatographie échangeuse d'anions sur gel DEAE du surnageant de l'extrait fongique brut après centrifugation.....	20
Figure 10 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE (5-15%) et coloration à l'argent des fractions enrichies en catalase A2 au fur et à mesure du processus de purification.....	20
Figure 11 : Réactivité par technique ELISA des sérums de souris à JO (sérum préimmun) et S3 (après 3 injections).....	21
Figure 12 : Analyse par SDS-PAGE 12,5% puis par immunoblot de l'extrait fongique total (Pistes 1 et 4) et de l'extrait enrichie en catalase A2 après CEA (Pistes 2 et 3) par les immunosérums des souris 2 (Pistes 1 et 2) et 3 (Pistes 3 et 4).....	21
Figure 13 : Principe d'un test ELISA de type compétitif pour la mise en évidence d'anticorps sérique spécifique de la catalase de <i>Scedosporium apiospermum</i>	24

Table des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des valeurs d'absorbances à 490 nm obtenus lors des criblages primaires et secondaires des puits d'hybridomes, des clones et des sous clones obtenues après clonage. Deux valeurs d'absorbances alignées sont issues d'une même expérience.....	3
---	---

Table des Annexes

ANNEXE 1 : MILIEUX DE CULTURE.....	27
ANNEXE 2 : SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE.....	27
ANNEXE 3 : COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE.....	29
ANNEXE 4 : SOLUTIONS POUR L'IMMUNODETECTION EN ELISA.....	30
ANNEXE 5 : SOLUTIONS POUR ELECTROTRANSFERT SUR MEMBRANE.....	31
ANNEXE 6 : TABLEAU RECAPITULATIF DES CLONAGES.....	32

RESUME

Scedosporium apiospermum est le deuxième champignon filamenteux retrouvé dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose, derrière *Aspergillus fumigatus*. Ce dernier présente de nombreuses similitudes avec *S. apiospermum*, d'où la nécessité de trouver une méthode de diagnostic spécifique pour les différencier.

Les enzymes de ces champignons sont décrites comme des facteurs de virulence et des marqueurs de l'infection, d'où le nombre croissant d'études à leur sujet. Suite à la découverte d'un diagnostic efficace chez *A. fumigatus* basé sur la détection de la catalase, l'idée est venue de réaliser une méthode de diagnostic similaire mais destinée à *S. apiospermum*.

Cette étude tente d'apporter des éléments de réponses concernant la préparation d'anticorps monoclonaux dirigés contre une catalase spécifique de *Scedosporium apiospermum*. Ces anticorps pourraient être utilisés à des fins diagnostics chez les patients suspectés de colonisation et/ou d'infections à *S. apiospermum*.

Mots clés : *Scedosporium apiospermum*, Anticorps monoclonaux, Catalase

ABSTRACT

Scedosporium apiospermum is the second filamentous fungus found in the sputum of patients suffering from cystic fibrosis, behind *Aspergillus fumigatus*. This last shares many similarities with *S. apiospermum*, hence the need for a specific diagnostic method to differentiate them.

The enzymes of these fungi are described as virulence factors and markers of infection, explaining the growing number of studies about them. Suit to the discovery of an effective diagnosis for *A. fumigatus* based on the detection of catalase, the idea came to make a similar method of diagnosis, but for *S. apiospermum*.

This study attempts to provide some answers concerning the preparation of monoclonal antibodies directed against a specific catalase *Scedosporium apiospermum*. These antibodies could be used for diagnosis in patients suspected of colonization and / or infection with *S. apiospermum*.

Key-words: *Scedosporium apiospermum*, Monoclonal antibodies, Catalase