

Université de Montréal

Expression du récepteur à
l'hormone folliculo-stimulante bovine et d'un anticorps
monoclonal anti-FSH bovine par des bactériophages

par

Mame Nahé Diouf

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en anatomie et physiologie vétérinaires

Août, 1994

©Mame Nahé Diouf, 1994

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Expression du récepteur à
l'hormone folliculo-stimulante bovine et d'un anticorps
monoclonal anti-FSH bovine par des bactériophages

présenté par:

Mame Nahé Diouf

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Goff, Alan K.
Dr. Lussier, Jacques G.
Dr. Silversides, David W.

Mémoire accepté le:.....

SOMMAIRE

Mots-clé: récepteur FSH bovin, anticorps monoclonal anti-bêta FSH bovine, fragment simple variable, expression par M13K07.

Nos objectifs de recherche consistaient à étudier le domaine de liaison du récepteur à l'hormone folliculo-stimulante bovine (rFSHb) et celui d'un anticorps monoclonal (AtMc) dirigé contre la sous-unité bêta de la FSH à l'aide d'un système d'expression utilisant les bactériophages. L'expression de protéine-fusion par les bactériophages génèreront les régions liantes du rFSHb et/ou de l'AtMc qui pourront être utilisées dans différents systèmes de détection de la FSH (e.g. RIA, ELISA, immunohistochimie). Pour le domaine extramembranaire (EM) du rFSH bovin consistant en 349 acides aminés, nous avons amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'un plasmide contenant l'ensemble de la portion EM du rFSH et de 6 oligonucléotides homologues à la séquence du rFSH, 3 fragments possédant les sites de restriction Sfi I en 5' et Not I en 3'. Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse et ont résulté en l'amplification des fragments souhaités: A1 de 348 pb (incluant les exons 1 à 4), B2 de 579 pb (composé des exons 4 à 9) et C3 de 468 pb (exons 9 et portion extramembranaire de l'exon 10). Les fragments ont été purifiés par Band-prep (Pharmacia) et clonés dans pGEM-T (Promega). Les clones positifs correspondant à chaque fragment ont été caractérisés par séquençage (Sanger-didéoxy) afin de vérifier l'intégrité de la séquence amplifiée et du cadre de lecture. Par la suite, les fragments choisis ont été clonés dans pCantab (Pharmacia) afin de permettre leur expression. Pour l'AtMc anti-FSH, nous avons purifié l'ARNm poly A d'un hybridome sécrétant un anticorps anti-bêta FSH préalablement caractérisé. Les ADN complémentaires ont été générés à l'aide d'un oligonucléotide poly-dT et de la transcriptase inverse (MMLV). L'amplification a été réalisée par PCR avec des amorces spécifiques aux régions hypervariables (CDR) des chaînes lourdes et légères (trousse

RPAS; Pharmacia) puis séparés par électrophorèse. Deux fragments correspondant aux chaînes légère (325 pb) et lourde (340 pb) ont été purifiés puis assemblés grâce à un pont peptidique (linker) codant pour un peptide de 15 acides aminés (Gly₄ Ser)₃. Cette construction résultant à un fragment variable simple chaîne (ScFV) a été réamplifiée par PCR, purifiée puis clonée dans pCantab. Des bactéries *Escherichia coli* souche TG1 ont été transformées avec les Pcantab ayant incorporé séparément les inserts (fragments du rFSH A1, B2, C3 et ScFV). Par la suite, les bactéries ont été infectées par le bactériophage M13K07 afin de permettre l'expression des inserts en position amino-terminale de la protéine capsulaire gp3 du phage. La FSH porcine purifiée par chromatographie d'immunoaffinité à partir d'une préparation commerciale (Schering; Canada) a été utilisée comme antigène afin de sélectionner par adsorption les phages exprimant la protéine-fusion. La capacité des bactériophages à lier la FSH a été étudiée par ELISA qui a utilisé un anticorps couplé à la peroxydase et dirigé contre la protéine majeure de capsid gp8. Les bactériophages recombinants exprimant les fragments A1, B2 et C3 du rFSH bovin et le ScFV de l'anticorps monoclonal anti-bêta FSH bovine ont reconnu la FSH porcine à l'ELISA. Toutefois, ils ont présenté des réactions croisées avec la LH bovine, l'ovalbumine de poule et des protéines virales. Il nous est impossible de définir au terme de ce projet de recherche si le manque de spécificité de ces bactériophages recombinants est imputable au système d'expresssion utilisé ou à la méthode ELISA élaborée pour les réactions croisées. D'autres études doivent être menées afin d'élucider ce phénomène.

1. 3 Expression des fragments variables d'un anticorps à de bactériophages.....	14
1. 3. 0 Généralités.....	14
1. 3. 1 Structure des immunoglobulines.....	15
1. 3. 2 Relations structure-fonction.....	15
1. 3. 3 Production d'anticorps.....	18
1. 3. 3. 1 Les anticorps polyclonaux.....	18
1. 3. 3. 2 Les anticorps monoclonaux.....	18
1. 3. 3. 3 Les anticorps coliclonaux.....	20
1. 4 Objectifs de recherche.....	23
CHAPITRE 2 MATERIEL ET METHODES.....	24
2. 1. Le récepteur de la FSH bovine.....	24
2. 1. 1 Production des fragments du rFSH bovin.....	24
2. 1. 1. 1 Amplification des fragments.....	24
2. 1. 1. 2 Isolation et purification des produits de PCR.....	27
2. 1. 1. 3 Ligation dans le phagemide pGem-T.....	27
2. 1. 1. 4 Transformation de bactéries XL1-Blue compétentes.....	28
2. 1. 1. 5 Digestion et purification des ADN plasmidiques.....	28
2. 1. 2 Caractérisation des fragments amplifiés.....	29
2. 1. 3 Transformation de <i>E. coli</i> TG1 par les fragments caractérisés.....	30
2. 1. 3. 1 Digestion par Not I et Sfi I.....	30
2. 1. 3. 2 Ligation dans pCantab.....	31
2. 1. 3. 3 Transformation de bactéries TG1 compétentes.....	33
2. 1. 4 Expression des fragments par les bactériophages...33	
2. 1. 4. 1 Infection par M13K07.....	33
2. 1. 4. 2 Sélection des bactériophages recombinants.....	34
2. 1. 4. 3 Infection de bactéries TG1 non compétentes.....	35
2. 1. 5 Etude de liaison des fragments du rFSH bovin.....	35

2. 2	L'anticorps monoclonal anti-bêta FSH.....	36
2. 2. 1	Culture des hybridomes.....	36
2. 2. 2	Synthèse de l'ADNc.....	37
2. 2. 2. 1	Isolation de l'ARNm.....	37
2. 2. 2. 2	Synthèse de l'ADNc.....	37
2. 2. 3	Amplification des régions variables des chaînes lourde et légère.....	37
2. 2. 4	Production de l'ADNc du fragment variable.....	38
2. 2. 5	Ligation dans les vecteurs pGem-T et pCantab.....	38
2. 3	Etude des réactions croisées.....	39
CHAPITRE 3 RESULTATS.....		40
3. 1	Les fragments du rFSH bovin.....	40
3. 1. 1	Production.....	40
3. 1. 2	Caractérisation.....	40
3. 1. 3	Expression par les bactériophages M13K07.....	47
3. 1. 4	Etude de liaison.....	47
3. 2.	L'anticorps monoclonal anti-bêta FSH.....	52
3. 2. 1	Extraction de l'ARN total des hybridomes.....	52
3. 2. 2	Synthèse de l'ADNc du fragment variable.....	52
3. 2. 2. 1	Production des chaînes lourde et légère.....	52
3. 2. 2. 2	Production du fragment simple.variable.....	52
3. 2. 3	Expression par les bactériophages M13K07.....	56
3. 2. 3. 1	Clonage dans pGem-T et pCantab.....	56
3. 2. 3. 2	Expression dans les bactériophages.....	56
3. 2. 4	Etude de liaison.....	56
3.2	Les réactions croisées.....	61
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....		68
4. 1	Les fragments du rFSH bovin.....	68
4. 2	L'anticorps monoclonal anti-bêta FSH.....	69
4.3	Le système d'expression par bactériophages.....	70
CONCLUSION.....		72
Annexe 1 Infection des bactéries transformées par M13K07.....		73

Annexe 2 Précipitation au polyéthylène glycol.....	74
Annexe 3 Infection de <i>E. coli</i> TG1 par les bactériophages recombinants sélectionnés.....	75
Annexe 4 ELISA.....	77
Annexe 5 ELISA.....	79
Annexe 6 Milieu minimum.....	81
 BIBLIOGRAPHIE.....	 82

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1:** Lecture à une densité optique de 410nm de la plaque d'ELISA pour l'étude de liaison des bactériophages recombinants exprimant le fragment A.1 du rFSH bovin.....49
- Tableau 2:** Lecture à une densité optique de 410nm de la plaque d'ELISA pour l'étude de liaison des bactériophages recombinants exprimant le fragment B.2 du rFSH bovin.....50
- Tableau 3:** Lecture à une densité optique de 410nm de la plaque d'ELISA pour l'étude de liaison des bactériophages recombinants exprimant le fragment C.3 du rFSH bovin.....51
- Tableau 4:** Lecture à une densité optique de 410nm de la plaque d'ELISA I pour l'étude de liaison des bactériophages recombinants exprimant ScFV anti-bêta FSH bovine.....58
- Tableau 5:** Lecture à une densité optique de 410nm de la plaque d'ELISA II pour l'étude de liaison des bactériophages recombinants exprimant ScFV anti-bêta FSH bovine.....59
- Tableau 6:** Lecture à une densité optique de 410nm de la plaque d'ELISA III pour l'étude de liaison des bactériophages recombinants exprimant ScFV anti-bêta FSH bovine.....60

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation du récepteur LH du rat démontrant les principaux domaines: extramembranaire, transmembranaire et intracellulaire.....	10
Figure 2a: Localisation et fonctions des différents domaines d'un IgG.....	16
Figure 2b: Conformation du site de liaison à l'antigène par les régions hypervariables des chaînes lourde et légère de l'anticorps (CDR) et les framework.....	17
Figure 3: Stratégie de l'amplification par polymérisation en chaîne des fragments A1, B2 et C3 à partir du domaine extramembranaire du rFSH bovin.....	26
Figure 4: Représentation du plasmide pCantab et localisation du site de clonage du ScFV et des fragments A1, B2 et C3 du rFSH bovin.....	32
Figure 5: Produits d'amplification par polymérisation en chaîne des fragments A1 (348 pb), B2 (468 pb), C3 (579 pb) du rFSH mis sur gel d'agarose de 1% et teints au bromure d'éthidium.....	41
Figure 6: Traduction en acides aminés des acides nucléiques composant le fragment A1-1.....	42
Figure 7: Traduction en acides aminés des acides nucléiques composant le fragment A2-2.....	43
Figure 8: Traduction en acides aminés des acides nucléiques composant le fragment B 14.2.....	44
Figure 9: Traduction en acides aminés des acides nucléiques composant le fragment B 18.2.....	45

Figure 10: Traduction en acides aminés des acides nucléiques composant le fragment C8-2.....46

Figure 11: Produits de la digestion par Not I et Sfi I des clones recombinants de pGem-T portant les fragments du rFSH bovin par Not I et Sfi I mis sur un gel d'agarose de 1.5% et teints au bromure d'éthidium.....48

Figure 12: Visualisation de l'ARN total de l'hybridome anti-bêta FSH bovin sur un gel d'agarose pour ARN de 1%. Les bandes ont été teintes au bromure d'éthidium.....53

Figure 13: Produits de l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne de la partie variable des chaînes lourde (340 pb) et légère (325 pb). Ils ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1.5% et teints au bromure d'éthidium.....54

Figure 14: Produits de l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne du fragment variable simple chaîne (ScFV) mis sur gel d'agarose de 1% et teints au bromure d'éthidium.....55

Figure 15: Produits de la digestion par PVU II des clones pCantab recombinants mis sur un gel d'agarose de 1.5% et teints au bromure d'éthidium.....57

Figure 16: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le fragment A.1.....62

Figure 17: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le fragment B.2.....63

Figure 18: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le fragment C.3.....64

Figure 19: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le ScFV anti-bêta FSH bovine (Clone IB8).....65

Figure 20: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le ScFV anti-bêta FSH bovine (Clone IID9).....66

Figure 21: Comportement de différentes dilutions d'ascite contenant un anticorps monoclonal anti-bêta FSH.....67

ABREVIATIONS ET SIGLES

A: adénine
a.a: acide aminé
ABTS: 2', 2' azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diamonium
ABP: androgen binding protein
ADN: acide désoxyribonucléique
ADNase: enzyme de restriction de l'ADN
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN T₄ ligase: enzyme de ligation
 α : alpha
AMPc: adénosine monophosphate cyclique
ARN: acide ribonucléique
ARNase: enzyme de restriction de l'ARN
ARNm: acide ribonucléique messenger
ARNm poly A⁺: ARN avec queue poly adénosine
ARNt: acides ribonucléiques totaux
ATP: adénosine triphosphate
BamHI: enzyme de restriction
 β : bêta
C: cytosine
Ca_i⁺⁺: ion calcium divalent intracellulaire
Ca⁺⁺: ion calcium divalent
CDR: complementary determining regions (régions relativement constantes du paratope de l'anticorps)
CH: domaine constant de la chaîne lourde d'un anticorps
CL: domaine constant de la chaîne légère d'un anticorps
Co⁺⁺: ion cobalt
dNTP: désoxynucléotides triphosphates
DEPC: diéthyl pyrocarbonate
dNTP: désoxynucléotide triphosphates
D.O.: densité optique
DTT: dithiothreitol

EC: extracellulaire
EGF: epidermal growth factor
ELISA: enzyme linked immunosorbent assay
EM: extramembranaire
ecoRI: enzyme de restriction
eCG: hormone chorionique équine
EDTA: acide tétra-acétique éthylène diamine
FACS: fluorescence activated cell sorter
FSH: hormone folliculo-stimulante
HPRT: Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase
G: guanine
GnRH: gonadolibérine
gp3: protéine capsulaire du gène III de M13K07
gp8: protéine capsulaire du gène VIII de M13K07
GTP: guanosine triphosphate
hCG: hormone chorionique humaine
Ig: immunoglobuline
IGF-1: insulin like growth factor 1
Ig E: immunoglobuline E
Ig G: immunoglobuline G
Ig M: immunoglobuline M
IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
 κ : kappa
kb: kilo paires de bases
KD: kilodalton
lacZ: gène *lacZ*
 λ : lamba
LB: agar Luria-Bertani
LH: hormone lutéinisante
M: marqueurs de poids moléculaire
Mg⁺⁺: ion manganèse divalent
Mn⁺⁺: ion magnésium divalent
Na⁺: ion sodium monovalent
Ni⁺⁺: ion nickel divalent
Not I: enzyme de restriction
pb: paires de bases

PEG: polyéthylène glycol
PCR: réaction de polymérisation en chaîne (polymérase chain reaction)
pfu: unité de formation de plages
pCantab: plasmide (Pharmacia)
pGEM-T: plasmide (Promega)
PKA: protéine kinase A
PKC: protéine kinase C
pNPP: p-nitrophenyl phosphate
Pst I: enzyme de restriction
Pvu II: enzyme de restriction
ScFV: fragment simple chain variable (single fragment chain variable)
Sfi I: enzyme de restriction
SOBAG: milieu nutritif glucosé
rFSH: récepteur FSH
rFSHb: récepteur FSH bovin
rLH: récepteur LH
rLHr: récepteur LH de rat
rpm: rotation par minute
RIA: radioimmunoassay
RPSA: Système des phages recombinants (recombinant phage antibody systeme)
RT: réaction de transcription inversée
rTSH: récepteur TSH
U : unité internationale
T: thymine
Taq: polymérase *Thermus aquaticus*
TGF- β : transforming growth factor bêta
Tris: tampon Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TSH: hormone thyroïdo-stimulante
X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
2x YT: milieu nutritif bacto-tryptone

Je dédie ce travail....

à mes parents

à ma famille

pour leur soutien indéfectible

à mes ami(es) pour leur réconfort et soutien

REMERCIEMENTS

Je remercie le Docteur Jacques Lussier pour m'avoir initié aux techniques de laboratoire et dirigé ce présent travail avec disponibilité et support constants.

Mes remerciements vont également:

- Au Centre de Recherche pour le Développement International (**CRDI**) pour avoir financé ce programme de formation
- Au Docteur David W. Silversides pour ses discussions fructueuses et ses multiples conseils.
- A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet et plus particulièrement aux étudiants du laboratoire et au personnel du Centre de recherche en reproduction animale (**CRRA**).

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTERATURE

1. 0 INTRODUCTION

L'adénohypophyse synthétise trois hormones glycoprotéiques: l'hormone lutéinisante (**LH**: Luteinizing Hormone), thyroïdo-stimulante (**TSH**: Thyrotropin Stimulating Hormone) et folliculo-stimulante (**FSH**: Folliculo-Stimulating Hormone). Toutes les trois hormones sont composées de deux chaînes polypeptidiques alpha (α) et bêta (β) associées de façon non covalentes (Papkoff, 1974; Pierce et Parsons, 1981).

FSH et LH sont dénommées gonadotropines car elles exercent au niveau des gonades des effets permettant la régulation et le maintien des processus essentiels associés à la reproduction, telles: la gamétogénèse et la production d'hormones.

1. 1 L'HORMONE FOLLICULO-STIMULANTE

1.1.1 BIOSYNTHESE

Pour un bon nombre d'auteurs, la FSH et la LH sont sécrétées par un même type cellulaire de l'adénohypophyse appelé gonadotrope (Beauvillain et coll., 1975; Pelletier et coll., 1976; Austin et Short, 1984; Denef, 1986; Lloyd et Childs, 1988). Cependant, chez l'espèce bovine, Bastings et coll. (1991) ont démontré que ces hormones sont produites par deux cellules différentes, morphologiquement distinctes; il en est de même chez le rat (Tougard et Tixier-Vidal, 1994). De plus, une source extrahypophysaire de FSH a été détectée dans les cellules épithéliales de la prostate des primates et des rongeurs (Garde et Sheth, 1992) et dans les tumeurs mammaires chez la femme (Garde et coll., 1993).

La gonadolibérine (**GnRH**: Gonadotropin Releasing Hormone) produite et sécrétée par l'hypothalamus est un facteur de régulation neuro-hormonale des gonadotropines hypophysaires. En effet, elle stimule la synthèse et la relâche de la LH et FSH en accroissant d'une part l'activité transcriptionnelle de leurs gènes et d'autre part en augmentant le degré de polyadénylation des ARN messagers (ARNm). La résultante de ces faits est un accroissement de la stabilité et du nombre de transcrits pour la sous-unité alpha et bêta (Baat, 1993; Clayton, 1993; Counis et coll., 1993; Kiesel, 1993).

1.1.2 STRUCTURE GENOMIQUE ET PROTEIQUE

La FSH est une protéine globulaire glycosylée ayant un poids moléculaire compris entre 28 000 et 30 000 daltons. Les sous-unités alpha et bêta qui la composent sont synthétisées sous formes de précurseurs à partir d'ARNm différents (Godine et coll., 1980). Chaque sous-unité est codée par un gène unique composé de 4 exons et 3 introns pour la sous-unité alpha, 3 exons et 2 introns pour la sous-unité bêta. Chez l'espèce ovine, Guzman et coll. (1991) ont démontré l'existence de deux gènes distincts pour la FSH bêta; cependant, on ignore s'ils sont tous les deux exprimés. Jameson et coll. (1988) ont observé un seul transcrit chez la ratte et la vache alors que chez l'humain, le gène FSH bêta produit quatre transcrits de taille différente. Ces auteurs pensent que cette variation est due à l'utilisation de deux origines de transcription et deux sites de polyadénylation. Toutefois, la traduction et la régulation hormonale de ces différents transcrits ne sont pas encore élucidées.

1.1.3 RELATIONS STRUCTURE-FONCTION

Au sein d'une même espèce, la sous-unité alpha est identique pour toutes les hormones glycoprotéiques (Pierce et Parson, 1981). Contrairement à la sous-unité bêta, l'alpha est retrouvée sous forme libre. Son rôle n'est pas encore bien élucidé,

toutefois, elle aurait un effet stimulateur sur la différenciation des cellules lactotrophes *in vitro* (Peters et coll., 1984; Cupps, 1991; Clayton, 1993). La sous-unité bêta, tout en conférant l'activité biologique à l'hormone, présente des séquences d'acides aminés hautement conservées entre les espèces animales (Chappel et coll., 1983; Gharib et coll., 1990; Galway et coll., 1992; Luderer et Schwartz 1992; Haisenleder et coll., 1994). L'assemblage des sous-unités alpha et bêta en une structure tertiaire s'impose afin qu'il ait l'interaction hormone-récepteur (Pierce et Parsons, 1981; Chappel et coll., 1983; Dattatreyaumurty et Reichert, 1992; 1993).

La glycosylation de la FSH est nécessaire pour activer le récepteur et engendrer l'activité biologique de l'hormone (Keutman et coll., 1983; Calvo et coll., 1985; Berman et coll., 1985; Calvo et coll., 1985; Dahl et coll., 1988; Price, 1991). Par contre, la déglycosylation de l'hormone n'empêche pas sa liaison avec son récepteur (Reichert et Bhalla, 1974; Channing et coll., 1978; Saïram et Bhargavi, 1985; Frazier et coll., 1990; Combarnous, 1992). Les travaux de Saïram (1983) et Lui et coll. (1984) ont démontré que les hormones déglycosylées agissaient comme des antagonistes de l'hormone native car elles occupent le récepteur sans déclencher pour autant son activité.

Plusieurs formes de FSH ont été rapportées dans la littérature; on parle de microhétérogénéité ou d'isohormones. Cette production hétérogène de FSH par les gonadotropes résulte de la composition variable en résidus polysaccharidiques et plus spécifiquement en acides sialiques. Ces derniers augmentent la demi-vie de l'hormone dans le sang en la protégeant contre les enzymes hépatiques (Morrell et coll., 1971; Hara et coll., 1978; Chappel et coll., 1983; Matteri et Papkoff, 1987; Combarnous, 1992; Galway et coll., 1992). Les formes acides de la FSH ont une demi-vie plus longue que les formes basiques (Chappel et coll., 1983). Ulloa-Aguire et Chappel (1982) ont suggéré qu'elles auraient une affinité différente pour le récepteur à la FSH. De

plus, il a été démontré que les formes basiques stimulent moins le récepteur de la FSH que les formes acides et par conséquent elles agiraient comme des antagonistes (Dahl et coll., 1988). Des hormones hybrides biologiquement actives peuvent être formées en interchangeant des sous-unités ou des séquences des hormones natives (Reichert, 1972; Moyle et coll., 1994).

L'hormone gonadotrope chorionique équine (eCG) présente une homologie structurale et fonctionnelle avec la LH et FSH. En effet, elle a une activité LH si elle est testée dans un système équin et une double activité FSH et LH lorsqu'elle est utilisée dans un système hétérologue (bovin, ovin, porcin); (Bousfield et coll., 1987; Chopineau, 1993).

1. 1. 4 EFFETS BIOLOGIQUES AU NIVEAU DES GONADES

La FSH est essentiellement responsable des phénomènes lents (comparativement à l'ovulation) dans la reproduction telle la différenciation des cellules de la granulosa, de Sertoli et de la maturation des gamètes. Ces processus requièrent une stimulation plus constante que les variations rapides d'hormone rencontrées au niveau du sérum. La FSH augmente le nombre de ses propres récepteurs et, ceux de la LH (Richards et coll., 1976; Lapolt et coll., 1990) et de l'Epidermal Growth Factor (EGF); (Fujinaga et coll., 1992a, 1992b). Elle stimule la stéroïdogénèse en augmentant l'activité de l'aromatase au niveau des cellules de la granulosa et de Sertoli (Channing et coll., 1970; Wang et coll., 1982; Steele et Leung, 1993; Tapanainen et coll., 1993). La FSH stimule aussi la synthèse et/ou la sécrétion d'Androgen Binding Protein (ABP), de la transferrine, de l'activateur du plasminogène qui est impliqué dans le processus d'ovulation (Bardin et coll., 1988; Galway et coll., 1992; Heckert et Griswold, 1992), de l'IGF-1 (Hammond et coll., 1992; Closset et coll., 1989; Fujinaga et coll., 1992a, 1992b) tout en inhibant la production d'IGF Binding Protein (Baranao et Hammond, 1984). La régulation de la production d'activine, d'inhibine et de follistatine est régie par la

FSH (Lee et coll., 1981; Sharpe et coll., 1988; Rivier et coll., 1982; Findlay, 1993).

1. 1. 4. 1 Chez la femelle

La FSH joue un rôle important dans la régulation de la fonction ovarienne, elle est l'hormone-clé du recrutement et de la maturation folliculaire (Dorrington et Armstrong, 1979; Chappel et coll., 1983; Tapanainen et coll., 1993). En effet, la FSH influence la différenciation des follicules par la stéroïdogénèse (Channing et coll., 1970; Wang et coll., 1982; Galway et coll., 1992; Dobson et coll., 1992), la régulation des récepteurs à l'EGF, IGF et LH (Fujinaga et coll., 1992a, 1992b; Richards et coll., 1992). Si la LH et FSH agissent en synergie dans les phénomènes ovulatoires (Schwartz, 1974; Galway et coll., 1990; Wang et Greenwald, 1993), la FSH semble de plus en plus impliquée dans le processus de lutéinisation (Schwartz, 1974; LaBarbera et Ryan, 1981; Tapanainen et coll., 1993).

1. 1. 4. 2 Chez le mâle

Chez le rat, si la FSH est nécessaire pour initier la première vague de la spermatogénèse, sa fonction au niveau du testicule chez le rat adulte n'est pas définie (Heckert et Griswold, 1992; Misrahi et coll., 1993). Les travaux de Heckert et Griswold (1992) ont rapporté deux observations: premièrement, l'hypophysectomie chez le rat réduit la quantité de spermatozoïdes sans affecter la qualité; deuxièmement, l'analyse par buvardage révèle que l'ARNm du rFSH est à sa quantité maximale entre les stades XIV et II de la spermatogénèse puis il diminue considérablement entre les stades VII et VIII de la spermatogénèse. D'autre part, Kliesch et coll. (1992) ont détecté par hybridation *in situ* une augmentation de l'ARNm du rFSH au niveau des cellules de Sertoli de rat adulte juste avant la relâche du sperme au stade VIII avec un maximum au stade IX et X suivi d'une diminution du signal au stade XI et XII. La variabilité dans les résultats rapportés par ces auteurs (Heckert

et Griswold, 1992; Kliesch et coll., 1992) peut être due à la différence des populations de gamètes étudiées ainsi qu'à la sensibilité des méthodes utilisées. Néanmoins, leurs résultats communs démontrent que durant la spermatogénèse la FSH joue un rôle dans la régulation de l'expression du rFSH dans les cellules de Sertoli (Misrahi et coll. 1993).

Les travaux de Kilgour et coll. (1994) chez le bélier démontrent que la FSH est nécessaire lors de la différenciation de la spermatogonie A1 en spermatogonie B2, car une immunosuppression de la FSH provoque une diminution de la production des spermatogonies B2 sans que le nombre des spermatogonies A1 ne soit affecté.

Les observations de l'expression du rFSH selon le stade de la spermatogénèse souligne l'importance de la FSH dans l'initiation d'une nouvelle vague spermatique (Misrahi et coll., 1993).

1. 1. 5 REGULATION DE LA SYNTHÈSE DE LA FSH

Le rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la FSH est induite essentiellement par les stéroïdes (testostérone chez le mâle, oestrogènes et progestérone chez la femelle) et les peptides: follistatine et inhibine. Ces deux dernières, en effet, suppriment le niveau de base (steady level) de la FSH β directement au niveau des cellules gonadotropes (Mercer et coll., 1987; Attardi et coll., 1989; Carroll et coll., 1989; Lussier et coll., 1993; Haisenleder et coll., 1994). Inversement la FSH joue un rôle important dans l'expression *in vivo* de l'inhibine et de la follistatine en augmentant la production de l'ARNm (Lee et coll., 1981; Rivier et coll., 1982; Houde et coll., 1994). Les travaux de Phillips et coll. (1988) réalisés sur les cellules hypophysaires de mouton montrèrent que l'oestradiol inhibe de manière sélective le taux de transcription de la sous-unité FSH β . De récentes études rapportées par Haisenleder et coll. (1994), suggèrent que les stéroïdes ovariens particulièrement les oestrogènes agissent

directement sur la production de GnRH par les neurones. Ces observations concordent avec les suggestions de Gharib et coll. (1990), Dalkin et coll. (1992). La progestérone quant à elle réduit l'expression des gènes de la LH et FSH en diminuant d'une part le stimulus de la GnRH et d'autre part en agissant directement sur la cellule gonadotrope (Goodman et Karsch, 1980; Karsch et coll., 1987). L'activine à l'instar de l'inhibine agit indépendamment de la GnRH car elle induit la sécrétion de la FSH même sur des cellules hypophysaires insensibilisées à la GnRH (Haisenleder et coll., 1994). Les activines augmentent la synthèse de la FSH par conséquent la sécrétion de FSH. De manière plus spécifique, l'activine A stimule par sécrétion autocrine ou paracrine l'activité de la FSH en augmentant la stabilité post-transcriptionnelle de l'ARNm (Ling, 1986; Val et coll., 1986; Carroll et coll., 1989; Carroll et coll., 1991).

1. 2 LE RECEPTEUR DE LA FSH

1.2.1 STRUCTURE GENOMIQUE

Le récepteur de la FSH (rFSH) provient d'un gène unique. Sa partie codante comporte 10 exons séparés par 9 introns. Cette structure est similaire à celle du récepteur de la TSH (rTSH). Le gène du récepteur de la LH (rLH) quant à lui est constitué de 11 exons et 10 introns. Cette similitude structurale prône pour la théorie selon laquelle les récepteurs des hormones glycoprotéiques hypophysaires (FSH, LH, TSH) dériveraient d'un même gène ancestral qui aurait une structure identique à celle du rLH. L'évolution des gènes des rFSH et rTSH par conséquent, serait responsable de la perte d'un exon (Koo et coll., 1991; Heckert et coll., 1992; Moyle et coll., 1994).

1.2.2 STRUCTURE PROTEIQUE

Le rFSH est une protéine glycosylée constituée de 675 acides aminés (a.a) chez le rat (Sprengel et coll., 1990), 678 a.a

chez l'humain (Minegish et coll., 1991), le singe (Gromoll et coll., 1993), l'ovin (Yarney et coll., 1993) et le bovin (Houde et coll., 1994). Ce récepteur à l'instar de celui de la TSH et LH (Figure 1) est composé de trois principaux domaines: un large domaine extramembranaire amino-terminal, hydrophile, riche en leucine (348 a.a chez le rat, 349 a.a chez l'humain le singe, l'ovin et le bovin), un domaine transmembranaire composé de 7 segments (264 a.a) traversant séquentiellement la membrane cellulaire et un domaine intracellulaire carboxy-terminal hydrophile (63 a.a chez le rat, 65 a.a chez l'humain, bovin et ovin); (Strader et coll., 1989; Houde et coll., 1994). La richesse en leucine 1-11 est requise pour la création d'un récepteur LH/FSH chimérique qui peut répondre à la stimulation de la FSH (Braun et coll., 1991). Le domaine extramembranaire du rFSH mature possède des sites potentiels de glycosylation au nombre de 3 chez le rat, bovin et ovin, 4 chez l'humain et le singe. Ces sites sont aussi présents au niveau du rTSH et rLH (Mc Farland et coll., 1989; Parmentier et coll., 1989; Frazier et coll., 1990; Reichert et coll., 1991; Houde et coll., 1994)

L'analyse de l'expression du rFSH par buvardage réalisée sur des cellules de la granulosa et du testicule révèle divers transcripts majeurs et mineurs chez plusieurs espèces animales. La signification de ces transcrits n'est pas connue mis à part celui de 2.5 à 2.6 Kb qui code pour le récepteur mature (Sprengel et coll., 1990; Heckert et Griswold, 1991; Tilly et coll., 1992; Gromoll et coll., 1993; Yarney et coll., 1993; Houde et coll., 1994).

1. 2. 3 LOCALISATION

Le rFSH est présent au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules de Sertoli chez le mâle et les cellules de la granulosa chez la femelle (Maxson et coll., 1985; Bardin et coll., 1988; Tapanainen et coll., 1993). Wandji et coll. (1991) ont décrit la présence des rFSH au niveau des follicules primordiaux

du fœtus bovin. La présence des rFSH au niveau du *corpus luteum* (corps jaune) est controversée. En effet, Manns et coll. (1984) à l'aide de la technique de radiorécepteur essai ont rapporté la présence des dits récepteurs au niveau du corps jaune, cependant, les travaux de Houde et coll. (1994) n'ont pas noté la présence de transcrits pour le rFSH par buvardage de l'ARN. Les résultats de Houde et coll. (1994) sont en accord avec les observations de Chopineau et coll. (1993).

1.2.4 RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DU rFSH

De manière générale, l'hypothèse émise expliquant l'interaction entre l'hormone et son récepteur stipule que les régions les plus conservées entre le rFSH, rTSH, rLH interagissent avec la sous-unité alpha de l'hormone tandis que celles composées de séquences spécifiques à chaque récepteur auront des interactions avec la sous-unité bêta (Roche et coll., 1992; Morris et coll., 1993; Moyle et coll., 1994). Ainsi, toutes les deux sous-unités de l'hormone participent à la liaison avec le récepteur (Dias et coll., 1984; Reichert et coll., 1991). En comparant les domaines extramembranaires du rLH/hCG et rFSH, Sprengel et coll. (1990) ont noté une homologie de 50 pour cent. Considérant ce fait, ils ont suggéré que les séquences non homologues sont impliquées dans la liaison du récepteur avec l'hormone spécifique. En utilisant des peptides synthétiques Dattatreyamurty et Reichert (1992) ont démontré que la séquence d'acides aminés 9-30 du rFSH bovin (non homologue au rTSH et LH/hCG) lie spécifiquement la FSH. Cependant, cette liaison est de moindre affinité comparativement à celle du récepteur tout entier. Selon Moyle et coll. (1994), les résidus codés par les exons 5 et 6 du rFSH sont impliqués dans la spécificité de la liaison de ce récepteur avec la FSH car ils empêcheraient la liaison de la hCG au rFSH.

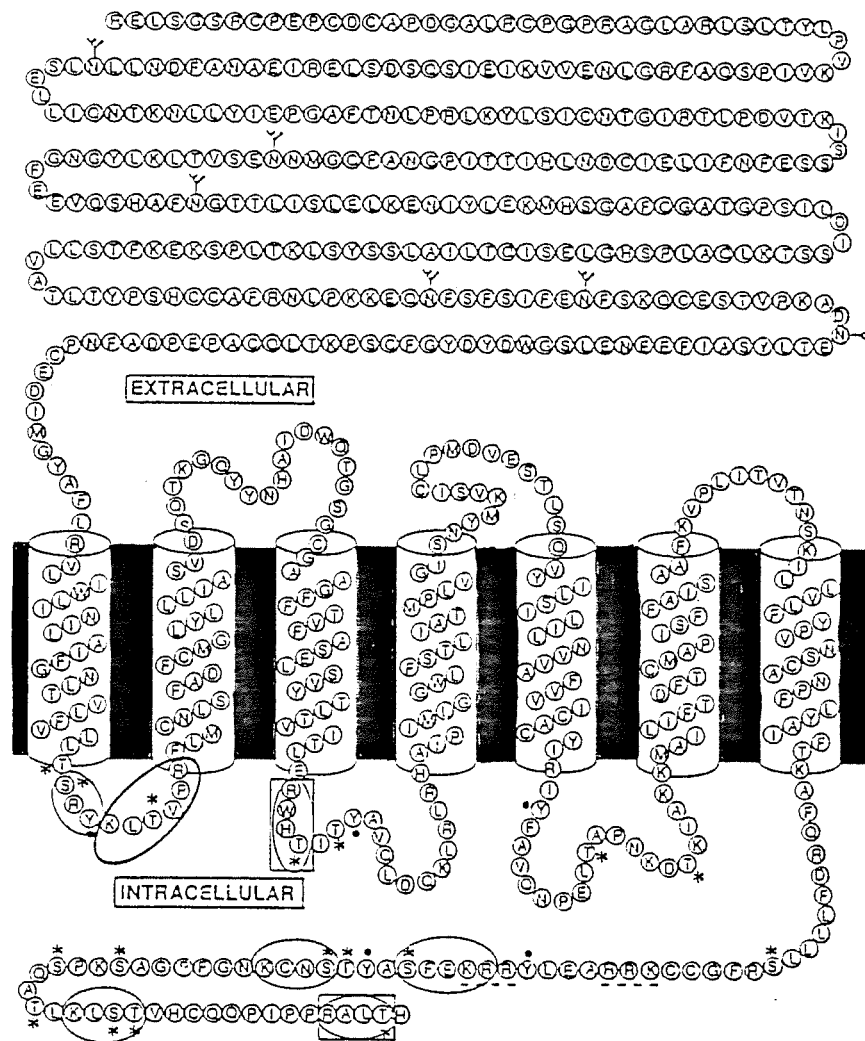


Figure 1. Représentation du récepteur LH du rat démontrant les principaux domaines: extramembranaire, transmembranaire et intracellulaire (Segaloff et Ascoli, 1993).

La conformation du domaine transmembranaire est spécifique à l'ensemble des récepteurs se couplant à la protéine G. En effet, avec une forte homologie (70 à 80 pour cent) entre les récepteurs de la FSH, LH, TSH, ce domaine est impliqué dans l'activation de la protéine G (Sprengel et coll., 1990; Luderer et Schwartz, 1992; Misrahi et coll., 1993). Le domaine intracellulaire quant à lui présente une partie amino-terminale très conservée entre les trois types de récepteurs tandis que la partie carboxy-terminale est variable d'un récepteur à un autre. Ce constat a permis d'établir l'hypothèse selon laquelle pour chaque récepteur donné la partie carboxy-terminale du domaine intramembranaire posséderait une fonction spécifique (Misrahi et coll., 1993). Les résidus des acides aminés constituant le domaine intracytoplasmique carboxy-terminal ainsi que les boucles intracellulaires du domaine transmembranaire présentent des sites potentiels de phosphorylation qui seraient impliqués dans le processus d'inactivation rapide du récepteur (Dohlman et coll., 1991).

1.2.5 MECANISME D'ACTION DE LA FSH

1.2.5.1 Système de l'adénylate cyclase et de la protéine G

Les sous-unités alpha et bêta de la FSH participent toutes les deux à la liaison avec le récepteur (Dias et coll., 1984; Reichert et coll., 1991; Moyle et coll., 1994). Le complexe hormone-récepteur s'associe à la protéine G stimulatrice (Gs) qui est composée de trois chaînes protéiques alpha, bêta et gamma. Cette protéine Gs active l'adénylate cyclase, enzyme qui transforme l'adénosine triphosphate (ATP) en 3' 5' monophosphate d'adénosine cyclique (AMPc). Ce dernier considéré comme second messenger active à son tour la protéine kinase A (PKA) laquelle en se phosphorylant stimule des enzymes qui produiront les réponses biologiques escomptées par le signal de la FSH (Richards et coll., 1979; Knecht et coll., 1983a; 1983b; Linder et Gilman, 1992; Steele et Leung, 1993). Ainsi plusieurs effets de la FSH peuvent

être obtenus en incubant les cellules cibles avec de l'AMPc et ses analogues ou tout agent qui augmente la concentration intracellulaire d'AMPc telles la forskoline et la toxine de *Vibrio cholerae* (Hunzicker-Dunn et LaBarbera, 1986). A l'inverse, les antagonistes de l'AMPc inhibent les réponses biologiques (Erickson et coll., 1975; Richards et coll., 1979).

La capacité de l'adénylate cyclase à répondre à la FSH dépend de la dose, la durée et la fréquence d'exposition à la FSH (Woody et LaBarbera, 1989). L'habilité de l'adénylate cyclase à traduire le signal de la FSH chez le fœtus est diminuée comparativement chez l'animal adulte. Ceci expliquerait selon Wandji et coll. (1992) la faible réponse des cellules de la granulosa à l'action de la FSH chez le veau âgé d'une semaine. La capacité de l'adénylate cyclase à répondre aux gonadotropines est différente selon le stade du développement folliculaire (Jonassen et coll., 1980). A cet effet, Nakamura et coll. (1991) ont suggéré l'existence d'un facteur intracellulaire qui modifierait le système de l'adénylate cyclase en fonction du développement folliculaire.

1. 2. 5. 2 Implication du calcium

Lors de la liaison de la FSH à son récepteur, la concentration du calcium intracellulaire (Ca_i^{++}) augmente dans les cellules de la granulosa (Flores et coll., 1990; Flores et coll., 1992) et de Sertoli (Grasso et coll., 1991; Gorczynska et Handelsman, 1991). Toutefois, l'effet direct de la FSH sur le système lipidique, soit du phosphatidylinositol dans les cellules cibles n'a pas été démontré (Means et coll., 1980; Reichert et Dattatreyaumurty, 1989). Cette hausse de Ca_i^{++} par la FSH est médiée ni par le PKA ni par l'AMPc (Flores et coll., 1990; Grasso et coll., 1990; Grasso et Reichert, 1990; Flores et coll., 1992) car l'apport exogène d'AMPc ou les activateurs de l'adénylate cyclase ne parviennent pas à reproduire cet effet (Flores et coll., 1990). Le processus par lequel se produit ce phénomène demeure incompris (Flores et Veldhuis, 1993).

1. 2. 5. 3 Facteurs influençant la liaison FSH-rFSH

L'IGF-1 et le Transforming Growth Factor bêta (TGF- β) agissent au niveau des cellules de la granulosa en augmentant l'activité de la FSH médiée par l'AMPc (Adashi et coll., 1988; Adashi et coll., 1989). Les ions Mn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} stimulent la liaison de la FSH à son récepteur par contre, les ions Co^{++} , Na^+ , Ni^{++} inhibent cet effet en changeant l'affinité du récepteur (Andersen et Reichert, 1982; Reichert et Dattatreya Murty, 1989). La température semble jouer un rôle dans la liaison FSH-rFSH; cette dernière est réversible à 4°C et irréversible au-dessus de 30°C (Andersen et coll., 1983). De plus, la glycosylation des hormones est nécessaire pour l'obtention d'une réponse biologique au niveau des cellules cibles puisque la FSH déglycosylée stimule faiblement l'adénylate cyclase (Calvo et coll., 1986; Dahl et coll., 1988; Matzuk et coll., 1989; Sprengel et coll., 1990).

1. 2. 6 DYNAMIQUE ET REGULATION DU rFSH CHEZ LA FEMELLE

1. 2. 6. 1 Dynamique

Durant le proestrus, la FSH augmente le nombre de ses propres récepteurs et ceux de la LH; ceci est possible soit en accroissant l'activité transcriptionnelle du gène ou en augmentant la stabilité de l'ARNm. Ces deux faits rehaussent l'activité de la FSH au niveau de la cellule cible (Tilly et coll., 1992). Toutefois, l'action prolongée de la FSH de même que le pic préovulatoire de LH, FSH ou une dose ovulatoire de hCG entraînent une diminution de ces dits récepteurs et par conséquent une baisse de l'action de FSH (Richards et coll., 1976; Richards, 1980, Knecht et coll., 1983a; Houde et coll., 1994). La formation du corps jaune coïncide avec une nouvelle augmentation des rLH (Richards et coll., 1976; LaPolt et coll., 1990; Nakamura et coll., 1991).

1. 2. 6. 2 La régulation

Selon Themmen et coll. (1991), la régulation du rFSH peut se faire par au moins deux mécanismes, soit: 1) une régulation rapide s'effectuant par l'internalisation du récepteur (down regulation) dans la cellule cible empêchant ainsi la liaison de la FSH ou par la phosphorylation de ce dernier 2) soit par une régulation plus lente au niveau post-transcriptionnel. Ce dernier mécanisme s'effectue par le biais de l'AMPc.

1. 3 EXPRESSION DES FRAGMENTS VARIABLES D'UN ANTICORPS A L'AIDE DES BACTERIOPHAGES.

1. 3. 0 GENERALITÉS

L'immunité humorale est médiée en partie par des glycoprotéines dénommées anticorps appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig). Présents en suspension dans le sérum, les anticorps sont aussi détectables à la surface des lymphocytes B différenciés qui les synthétisent. Ces derniers au terme de leur différenciation sont appelés plasmocytes. Ils sécrètent les Ig dans le sérum. Chaque plasmocyte ne synthétise qu'un seul type d'Ig: celui qui a été sélectionné au niveau du lymphocyte B parental (Lipinski et Herzenberg, 1981; Abbas et coll., 1991; Tizard, 1992). Les lymphocytes B proviennent de la moëlle osseuse; ils se retrouvent aussi au niveau des plaques de Peyer de l'intestin, la rate et la bourse de Fabricius chez les oiseaux.

Le plasmocyte meurt rapidement en culture. Toutefois, il existe des tumeurs plasmocytaires (myélomes) dans lesquelles les plasmocytes cancéreux se multiplient indéfiniment produisant ainsi en grande quantité un seul type d'Ig. Un anticorps amorce ses effets biologiques en se liant à l'antigène. Ce dernier peut être défini comme toute substance se liant spécifiquement à un anticorps (Abbas et coll., 1991; Tizard, 1992; Salaméro, 1993).

1. 3. 1 STRUCTURE DES IMMUNOGLOBULINES

A l'image des autres protéines, les Ig peuvent être classées en fonction de leur poids moléculaire, mobilité électrophorétique et leur structure antigénique. Toutefois, elles présentent une similarité structurale et quelques caractéristiques physico-chimiques communes telles la charge et la solubilité. Les anticorps sont composés de quatre chaînes polypeptidiques qualifiées de lourdes (55 à 70 KD) et légères (environ 24 KD) (Abbas et coll., 1991; Tizard, 1992). Chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde par des ponts disulfures, et ce même type de liaison permet l'assemblage des deux chaînes lourdes (Figure 2a). Ils existent deux types de chaînes légères: la chaîne kappa (κ) et la chaîne lambda (λ). Bien que présentant des séquences en acides aminés non homologues, aucune différence fonctionnelle entre ces deux types de chaînes n'a été rapportée (Abbas et coll., 1991). Le ratio chaîne λ /chaîne κ varie selon l'espèce animale; ainsi, le rat et la souris possèdent 95% de chaînes κ , l'humain 70% tandis que les bovidés et les équidés ont 95% de chaînes λ (Tizard, 1992).

1. 3. 2 RELATIONS STRUCTURE-FONCTION

Les deux régions variables de l'anticorps (paratopes) lient l'antigène sur des épitopes définis. Le paratope est formé par des séquences d'acides aminés de la chaîne lourde et légère. L'étude détaillée de cette région révèle qu'elle est composée de trois courts segments hypervariables (CDR: Complementarity Determining Regions) de 6 à 10 aa séparés par quatre segments relativement constants (Framework regions) (Williams et coll., 1990; Tizard, 1992) (Figure 2b). Les chaînes lourde et légère comportent aussi des régions constantes. Ainsi, pour chaque chaîne légère, il existe un seul domaine constant (CL: Constant Light chain). La chaîne lourde possède trois domaines constants (CH: Constant Heavy chain) appelés CH1, CH2, CH3, cependant, les IgM et IgE ont un autre domaine surnuméraire CH4. Les domaines CH1 et CL stabilisent le paratope tandis que le domaine CH2 constitue le

site d'activation du complément. Une zone charnière composée de 12 acides aminés (en majorité des prolines) localisée entre les domaines CH2 et CH1 permet la conformation adéquate de l'immunoglobuline (Tizard, 1992).

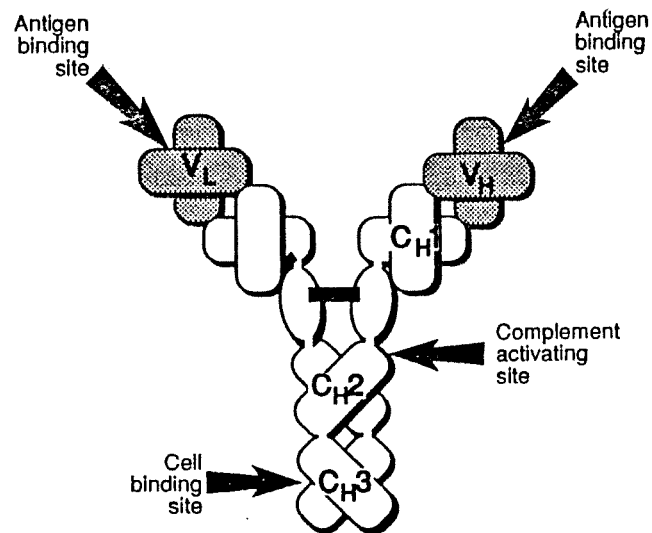


Figure 2a. Localisation et fonctions des différents domaines d'un IgG (Tizard, 1992).

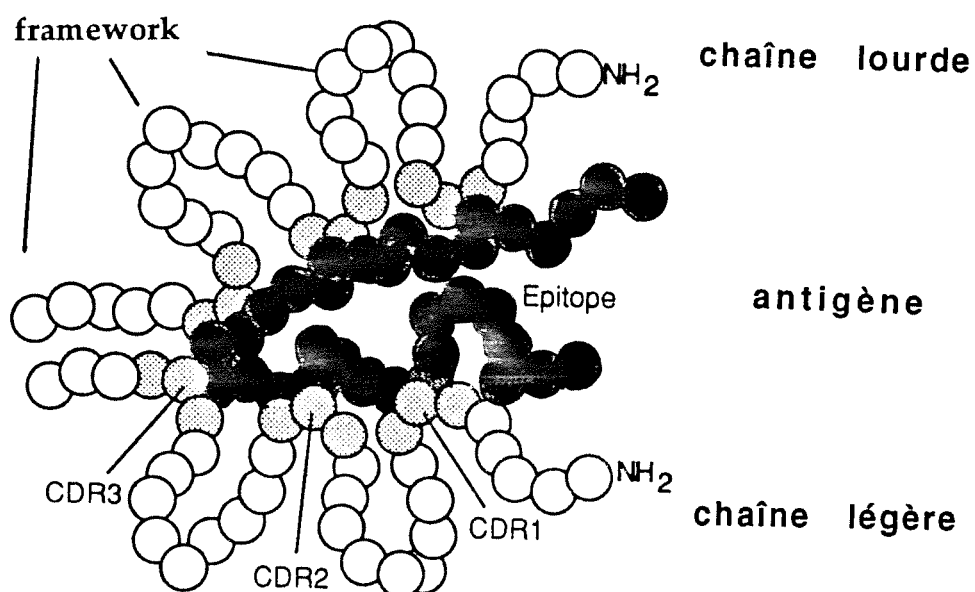


Figure 2b. Conformation du site de liaison à l'antigène par les régions hypervariables des chaînes lourde et légère de l'anticorps (CDR) et les framework (Tizard, 1992).

1. 3. 3 PRODUCTION D'ANTICORPS

1. 3. 3. 1 LES ANTICORPS POLYCLONAUX

De manière classique, pour obtenir un anticorps, un animal est immunisé par injections d'un antigène purifié ou non. Le sérum de cet animal qualifié d'antisérum peut être enrichi par diverses méthodes afin d'isoler les anticorps recherchés (Ey et coll., 1978; Mc Kinney et Parkinson, 1987; Harlow et Lane, 1988). Il s'agit cependant d'un mélange d'anticorps différents dont le seul point commun est qu'ils reconnaissent plus ou moins bien le même antigène. De très nombreuses familles d'anticorps sont ainsi produites par la réponse immunitaire, on parle d'anticorps polyclonaux.

1. 3. 3. 2 LES ANTICORPS MONOCLONAUX

En 1975, Kohler et Milstein ont mis au point une technique qui a permis la production et le développement de cellules hybrides (hybridomes) suite à la fusion de myélomes et de lymphocytes B. Ainsi, les hybridomes ont acquis la particularité de se multiplier en culture tout en produisant un type d'anticorps aux qualités définies. Chaque hybridome donne naissance à une lignée cellulaire ou clone, d'où le qualificatif monoclonal est utilisé pour l'anticorps produit. Spécificité, homogénéité et la production en quantité illimitée aussi bien *in vitro* (le surnageant de culture) qu'*in vivo* (liquide d'ascite) traduisent les caractéristiques des anticorps monoclonaux qui leur prévalent un intérêt considérable. La production d'anticorps monoclonaux comprend trois grandes étapes: l'immunisation de l'animal, la production de l'hybridome et enfin le développement d'une méthode adaptée de criblage.

Immunisation

Une immunisation efficace dépendra à la fois de la forme, la nature, quantité et voie d'inoculation de l'antigène, l'utilisation d'adjuvant mais aussi du choix de l'espèce et de la lignée de l'animal à immuniser. Il est recommandé que l'animal à immuniser soit le plus éloigné possible dans l'évolution de la source de l'antigène afin d'éviter les problèmes de tolérance au soi (Harlow et Lane, 1988; Mercier, 1990; Salaméro, 1993).

Production des hybridomes

Les myélomes utilisés dans les fusions ont subi une variation génétique se traduisant par la déficience en une enzyme: l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) qui rend ces cellules inaptes à vivre dans un milieu sélectif. Ce caractère sera pris en considération lors de la sélection après la fusion.

Les cellules spléniques de l'animal immunisé et les myélomes sont fusionnées *in vitro* habituellement avec le polyéthylène glycol (PEG). Ce dernier provoque la fusion des membranes cytoplasmiques formant ainsi des cellules bi ou polynuclées. Il faut noter que même lors des fusions les plus efficaces rarement plus de 1 pour cent des cellules auront fusionnées et 1 sur 10^5 formera des hybrides viables (Salaméro, 1993). Après la fusion, les hybrides sont mis en culture dans un milieu sélectif contenant un inhibiteur des synthèses *de novo* des bases puriques et pyrimidiques telle l'aminoptérine. Dans ce milieu, seuls survivront les hybrides cellulaires (hybridomes) qui ont reçu des deux parents l'information génétique suffisante pour synthétiser l'enzyme-clé impliquée dans la voie métabolique de synthèse des acides nucléiques comme la cellule splénique et pour proliférer en culture comme le myélome (Kölher et Milstein, 1975; Lipinski et Herzenberg, 1981; Harlow et Lane, 1988).

Développement d'une méthode de criblage

La méthode de criblage est fonction de la source de l'antigène utilisé; l'ELISA et l'immunoprécipitation sont d'utilisation fréquente. La technique classique de production des anticorps monoclonaux a connu beaucoup d'innovations telles l'utilisation de cytofluorographe (FACS: fluorescence activated cell sorter) permettant le tri des cellules selon leur fluorescence (Lipinski et Herzenberg, 1981; Mercier, 1990), la mise au point d'un grand nombre de méthodes de fusion dirigée qui favorisent le couplage physique des cellules de myélome avec les plasmocytes qui sécrètent l'anticorps désiré (Salaméro, 1993). Malgré les innovations, produire des anticorps monoclonaux s'avère laborieux et coûteux. A cela, s'ajoute le fait que les hybridomes en culture peuvent arrêter de sécréter l'anticorps désiré suite à une perte chromosomique (Lipinski et Herzenberg, 1981).

1. 3. 3. 3 ANTICORPS COLICLONAUX

Les techniques de génie génétique, la manipulation de l'ADN recombinant et les technologies de transfection de gènes ont rendu possible la production de divers fragments correspondant à des domaines fonctionnels bien particuliers de l'immunoglobuline (Cwirla et coll., 1990; Clackson et coll., 1991). C'est ainsi que l'utilisation d'une simple chaîne fragment variable (ScFV: single chain fragment variable) qui est constitué des régions variables de la chaîne lourde et légère reliées par un peptide (linker) semble très prometteuse. Dans la majorité des cas, ces fragments sont clonés dans *Escherichia coli* (*E. coli*) afin d'y être exprimés (Hoogenboom et coll., 1991; Takkinen et coll., 1991; Whitlow et Filpula, 1991; Marks et coll., 1992). La production de ScFV est possible grâce à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant des amorces d'oligonucléotides dont les séquences consensus correspondent aux framework (Dumont 1990; Winter et Milstein, 1991). Chez la souris, la mise au point des amorces à

partir des chaînes kappa est plus aisée car les chaînes légères lambda ne représentent que 5 pour cent. Afin d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc) correspondant à la région variable des chaînes lourdes et légères, l'ARNm est extrait des lymphocytes B contenus dans la rate ou des hybridomes (Legros et Soussi, 1993). Suite aux réactions d'amplification par PCR, chaînes lourde et légère sont reliées à l'aide d'un oligonucléotide codant pour un peptide qui permettra une orientation tridimensionnelle adéquate visant à recréer le paratope. Cette construction est introduite dans un vecteur dont le choix dépendra en grande partie du système d'expression utilisé (eucaryote ou procaryote) mais aussi de la nature du fragment amplifié et de son utilisation ultérieure. Par exemple, l'expression d'anticorps a été rapportée au niveau des cellules de: mammifère (Legros et Soussi, 1993), de levure, végétale (Hiatt et coll., 1989; Hiatt, 1990; Mercier, 1990) et d'insecte (Putliz et coll., 1990; Reis et coll., 1992).

Dans le cas de l'expression chez *E. coli*, plusieurs approches sont actuellement développées; parmi celles-ci, l'expression par bactériophage (phage display technology ou recombinant phage antibody) utilisant particulièrement le bactériophage filamenteux non lytique M13 (Rasched et Oberer, 1988; Smith, 1988). Dans ce système, la bactérie *E. coli* devient chroniquement infectée et produit continuellement des phages. La propagation du phage se fait aussi horizontalement (infection des bactéries voisines saines) que verticalement (transmission du matériel génétique du phage dans les bactéries-filles au cours du cycle de division); (Nelson et coll., 1981; Legros et Soussi, 1993).

Le bactériophage M13K07 est constitué d'une molécule d'ADN simple brin circulaire recouverte d'une capsid. Parmi les protéines composant la capsid, deux présentent un grand intérêt: la protéine majeure (2700 à 3000 copies) codée par le gène *VIII* (gp8) et la protéine mineure (3 à 5 copies) codée par le gène *III* (gp3); (Lin et coll., 1980; Grant et coll., 1981; Rasched et Oberer, 1986; Devlin et coll., 1990). La gp3 est impliquée dans les

phénomènes d'adsorption du phage sur le pili de la cellule-hôte (Goldsmith et Konigsberg, 1977; Lopez et Webster, 1983), de la pénétration et la réplication du matériel viral (Jazwinski et coll., 1973; Marco et coll., 1974; Nelson et coll., 1981). La partie amino-terminale de gp3 est orientée vers l'extérieur, elle est responsable de l'adsorption du phage sur le pili bactérien. La partie carboxy-terminale est ancrée dans la capsid (Crissman et Smith, 1984). Des peptides, des fragments protéiques et plus spécifiquement des fragments ScFV ont pu ainsi être coexprimés à la surface des bactériophages avec la partie amino-terminale de la gp3 à la manière d'une protéine-fusion. Ces bactériophages sont ainsi capable de lier spécifiquement un antigène donné (Ward et coll., 1989; Devlin et coll., 1990; McCafferty et coll., 1990). Il est donc possible de sélectionner un bactériophage ayant une spécificité antigénique par adsorption à l'antigène couplé à un support donné (McCafferty et coll., 1990; Cwirla et coll., 1990; Clackson et coll., 1991; Robertson, 1993; Bradbury et coll., 1993). Pour la détection des bactériophages, un anticorps anti-gp8 couplé à une enzyme chromogène (e.g. peroxydase ou phosphatase alcaline) est utilisé (Amberg et coll., 1993). Certains auteurs tels Huse et coll. (1989), Gram et coll. (1992) et Amberg et coll. (1993) ont utilisé le bactériophage lambda (λ) avec autant de succès que le bactériophage M13.

1. 4 OBJECTIFS

L'étude de la cinétique de la FSH chez l'espèce bovine connaît beaucoup de controverses (Glencross, 1990). En effet, selon que les méthodes de dosages soient homologues (Oxender et coll., 1972; Bolt et Rollins, 1983) ou hétérologues (Akbar et coll., 1974; Schams et Schallenberger, 1976; Dobson, 1978) les concentrations plasmatiques de FSH varient. Dans le but de contribuer à l'élaboration d'une méthode de dosage non radioactive sensible et spécifique à la FSH, l'objectif principal de nos travaux était orienté dans la production de deux types de bactériophages recombinants, l'un exprimant la partie variable (ScFV) d'un anticorps monoclonal anti-bêta FSH bovine tandis que l'autre type exprimant un fragment correspondant à des segments du domaine extra-membranaire rFSH bovin.

La biologie moléculaire s'est avérée être un outil privilégié pouvant permettre d'atteindre cet objectif. En effet, grâce aux techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR: Polymerase Chain Reaction), un ScFV anti-bêta FSH et trois fragments du rFSH bovin ont été produits. Ils ont été co-exprimés avec la protéine III de capsid (gp3) du bactériophage M13K07 en utilisant le système d'expression par bactériophages. Les types de bactériophages ainsi produits, qualifiés de recombinants pourraient être utilisés dans la mise au point d'un ELISA spécifique et sensible pour détecter la FSH bovine et celles des autres espèces animales. De plus, les bactériophages recombinants exprimant les fragments du récepteur FSH contribueront à l'étude de la relation structure-fonction des différents domaines du récepteur en permettant de mieux comprendre l'implication des exons dans la liaison avec la FSH. Aucune information n'était disponible lors de l'initiation de ce projet mis à part celles incluses dans la publication de Dattatreyamurty et Reichert (1992).

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2. 1 LE RECEPTEUR DE LA FSH BOVINE

2. 1. 1 Production des fragments du rFSH bovin

Le récepteur de la FSH bovine (rFSHb) a été caractérisé par Lambert (1993) et Houde et coll. (1994). En se basant sur les résultats de leurs travaux, trois fragments correspondant au domaine extramembranaire du dit récepteur ont été produits par amplification (Figure 3). A cet effet, des amorces oligonucléotidiques sens et antisens homologues aux domaines à amplifiés du rFSHb ont été synthétisées à l'Institut Armand-Frappier (Laval, Québec).

2. 1. 1. 1 Amplification des fragments

A chaque amorce sens, un site de restriction de l'endonucléase Sfi I a été inséré à l'extrémité 5' tandis que l'amorce anti-sens abritait un site de restriction de l'endonucléase Not I à l'extrémité 5'. L'emplacement spécifique de ces sites d'enzyme de restriction a permis leur clonage dans le phagemide et leur expression dans le cadre de lecture requis. D'autres sites d'enzymes de restriction à l'occurrence EcoR I, Pst I ou BamH I selon le fragment de récepteur considéré ont été rajoutés respectivement en bout 5' en respectant le cadre de lecture afin de produire les peptides correspondant dans le cadre des études ultérieures.

Amorces sens (site EcoR I souligné, Sfi I en caractères gras)

A: 5'- GAATTCCTGGCCCAGCTGGCCTGCCATCATCGACTCTGTCAC -3'

B: 5'- GAATTCCTGGCCCAGCTGGCCAGAATTGAAAAGGCCAACAACTG -3'

C: 5'- GAATTCCTGGCCCAGCTGGCCGATATTTCAAGAACCAGGATCCGTTTC-3'

Amorces anti-sens (site de Not I en caractères gras)

1: 5'- (BamH I) GGATCCTTATGCGGCCGCCAGATATCGGAGGTTGGGAAGGTT-3'

2: 5'- (Pst I) CTGGAGTTATGCGGCCGCCGTTTGGCGCCTCCAGTTTGC-3'

3: 5'- (Pst I) CTGGAGTTATGCGGCCGCTCTGAGAATATCATCCCCATGAT-3'

Suite à l'amplification, les trois fragments escomptés A1, B2 et C3 du rFSHb auront la taille respective de 348, 579 et 468 paires de bases (pb). L'amplification de ces derniers a été réalisée par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir de l'ADNc du rFSHb provenant de Houde et coll. (1994). L'enzyme polymérase provenant de *Thermophilus aquaticus* (Ampli Taq ADN polymérase de Perkins-Elmer Cetus) a été utilisée pour les trois amplifications. Chaque réaction d'amplification s'est effectuée dans un volume final de 100,5µl dont 1µl d'ADN plasmidique contenant l'insert correspondant au domaine extramembranaire du rFSHb isolé par la technique de Magic mini Prep (Pharmacia), 1µl de l'amorce-sens (20mM), 1µl de l'amorce anti-sens (20mM), 1µl d'un mélange de déoxynucléotides triphosphates (dNTP 20mM de chaque nucléotide), 10µl de tampon PCR 10x (500mM Tris pH 9, 15mM MgCl₂, 200mM ammonium acétate), et 86,5µl d'eau stérile. Ce volume après avoir été recouvert de 50µl d'huile minérale a été placé dans le thermocycleur (Ericomp) afin d'y subir 3 minutes (min) de dénaturation à 95°C suivies de 4 min à 72°C pour l'élongation. C'est durant cette période que 0,5µl d'Ampli Taq a été rajouté dans chaque tube. Suite à cela, les conditions d'amplification appliquées ont été de 35 cycles comprenant chacun 40 secondes (sec) à 95°C, 40 sec à 55°C et 90 sec à 72°C. Les produits de ces trois amplifications ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose.

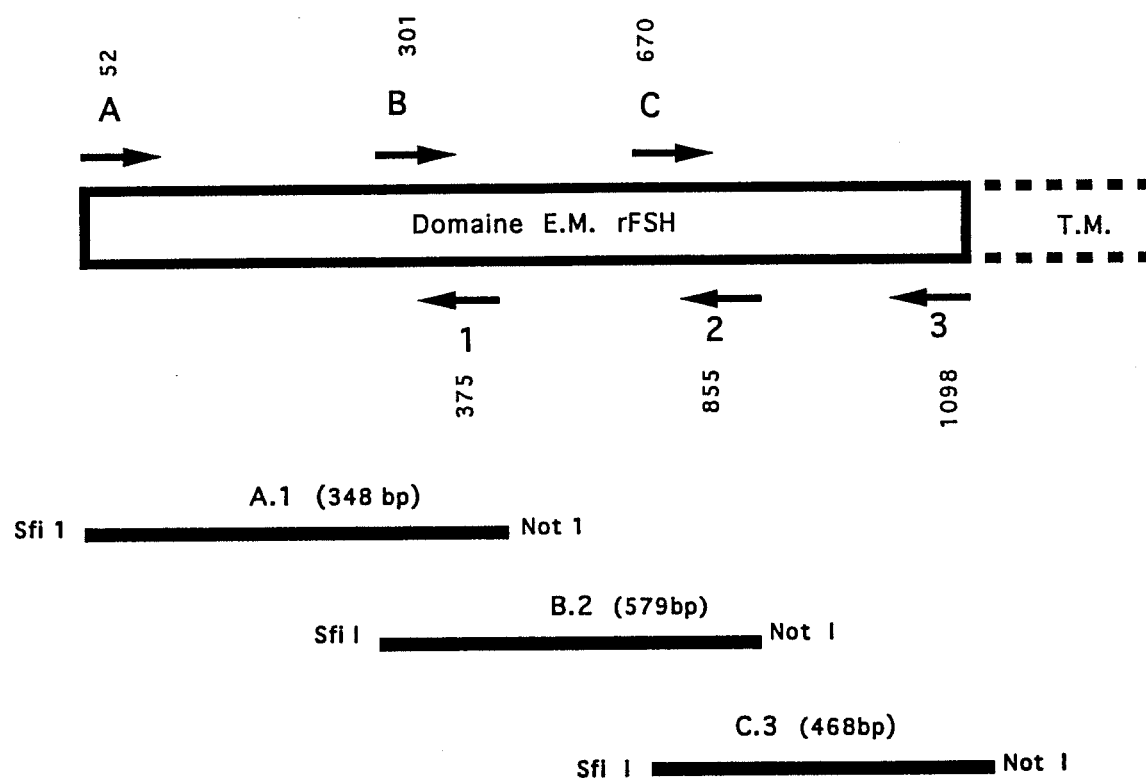


Figure 3. Stratégie de l'amplification par polymérisation en chaîne des fragments A1, B2 et C3 à partir du domaine extramembranaire du rFSH bovin.

2. 1. 1. 2 Isolation et purification des produits de PCR

Suite à la réaction d'amplification, 20 μ l du produit de chaque amplification ont été séparés sur un gel d'agarose de 1,5% selon le protocole décrit par Sambrook et coll. (1989). Cette méthode utilisant le bromure d'éthidium comme agent intercalaire a permis de visualiser grâce aux rayons ultra-violets les fragments d'ADN amplifiés présents sous forme de bandes. Ces dernières ont été coupées du gel à l'aide d'un scapel puis purifiées par l'utilisation de la trousse Sephaglas Band Prep (Pharmacia) afin de récupérer les fragments d'ADN A1, B2 et C3. Ainsi purifiés, ces fragments d'ADN ont été remis sur un gel de 1,5% et pour une seconde fois, les bandes ont été isolées et purifiées selon le protocole décrit ci-avant.

2. 1. 1. 3 Ligation dans le phagemide pGem-T

Les fragments A1, B2 et C3 amplifiés et purifiés ont été insérés dans un vecteur plasmidique pGem-T (Promega). Le choix de ce vecteur a été guidé d'une part par le fait que pGem-T linéarisé porte à ses extrémités des nucléotides thymine libres. D'autre part, l'enzyme Ampli Taq lors de la réaction d'amplification ajoute des adénosines aux extrémités des fragments amplifiés. A la lumière de ces faits, la ligation dans pGem-T a permis de réaliser une bonne efficacité d'insertion du produit amplifié. Les ligations, pour l'ensemble de nos travaux se sont effectuées dans un volume final de 10,8 μ l dont 8 μ l d'ADN purifié, 1 μ l de vecteur à l'occurrence pGem-T, 1 μ l de tampon T4 DNA ligase 10x (Promega) et 0,24U de ligase T4 (Promega). Les réactions ont été incubées toute la nuit à 16°C. Suite à la ligation, le terme de recombinant sera utilisé pour tout vecteur (dans ce cas pGem-T) qui aurait incorporé en guise d'insert l'un des fragments du rFSHb soit A1, B2 ou C3. Tout le volume des trois ligations a été utilisé séparément pour transformer des bactéries compétentes.

2. 1. 1. 4 Transformation de bactéries XL1-Blue compétentes

Les bactéries compétentes en vue d'une transformation chimique ont été préparées selon la technique décrite par Sambrook et coll. (1989) qui utilise le chlorure de calcium (Sigma) et le chlorure de rubidium (Sigma). Des bactéries *Escherichia coli* souche XL1-Blue compétentes ont été transformées par les phagemides pGem-T recombinants selon la technique de Sambrook et coll. (1989). Cette transformation permet à la bactérie arborant le vecteur plasmidique recombinant ou non d'acquérir la résistance à l'ampicilline. De plus, parmi les bactéries résistantes à l'ampicilline, il est possible de distinguer par la coloration les colonies bactériennes qui ont incorporées le vecteur plasmidique recombinant (elles sont blanches) de celles qui en sont dépourvues (bleues). L'absence de coloration est due à une incapacité d'alpha-complémentation causée par l'insertion d'ADN étranger dans le site de clonage multiple faisant que le gène lac Z ne soit pas opérationnel. A l'opposé, les bactéries ayant incorporé uniquement pGem-T ont le gène lac Z fonctionnel. Ceci, leur permet par alpha-complémentation d'acquérir la coloration bleue en présence d'isopropylthio-b-D-galactosidase (IPTG) et 5-bromo-4 chloro 3 indolyl-b-D galactosidase ou X-gal (Sambrook et coll., 1989; Watson et coll., 1993; Ausubel et coll., 1994). Un certain nombre de bactéries blanches ont été repiquées dans 4ml de milieu Luria-Bertani (LB) avec ampicilline. A partir de chaque bouillon de culture, l'ADN plasmidique a été isolé après lyse alcaline des bactéries selon la méthode décrite par Sauders et Burke (1990).

2. 1. 1. 5 Digestion et purification des ADN plasmidiques

Les différents ADN récupérés après la lyse alcaline ont été digérés par les enzymes de restriction Pst I et EcoR I pour les fragments B2 et C3, EcoR I et BamH I pour le fragment A1. Pour chaque échantillon, la digestion s'est effectuée durant toute la nuit à 37°C dans un volume total de 35µl dont 0,8U de EcoR I (High

Concentred; Promega), 0,12U de Pst I ou 0,1U BamH I (Promega) selon le fragment considéré, 22,4 μ l d'eau stérile, 3,5 μ l de Buffer B (Promega) et 8 μ l d'ADN plasmidique. Suite à la digestion, l'électrophorèse sur un gel d'agarose de 1% a permis la séparation des différents fragments d'ADN. En se basant sur la taille de ces derniers, l'ADN plasmidique des bactéries considérées comme positives pour chaque fragment du rFSHb (c'est-à-dire celles qui ont incorporé le vecteur recombinant) a été utilisé à nouveau pour transformer des bactéries XL1-Blue compétentes. Après la seconde transformation, les colonies bactériennes blanches ont été repiquées dans 4ml de milieu LB avec ampicilline. L'ADN plasmidique a été purifié tel que suggéré par la trousse de Magic mini prep (Promega). Cette dernière permet d'obtenir de l'ADN plasmidique de meilleure qualité comparativement à la méthode de lyse alcaline ordinaire.

2. 1. 2 Caractérisation des fragments amplifiés

Le séquençage des fragments amplifiés a permis de définir les acides nucléiques constituant l'insert en l'occurrence les fragments du rFSH et d'autre part de déceler des éventuelles mutations ou délétions qui pourraient modifier le cadre de lecture des fragments A1, B2 et C3 en comparaison au récepteur natif. Le séquençage a été effectué par la méthode didéoxy de Sanger (Sambrook et coll., 1989; Ausubel et coll., 1994) à partir de l'ADN provenant des Magic miniprep à l'aide des amorces nucléotidiques T7, SP6 ou bGAL B selon le cas provenant de l'Institut Armand Frappier. Les autres produits utilisés lors du séquençage tels le tampon d'annelage, l'enzyme de polymérisation (T7 Polymérase), les bases puriques (adénine, guanine) et pyrimidiques (cytosine, thymine) proviennent de la trousse T7 Sequencing de Pharmacia. Les produits des réactions de séquençage ont été séparés sur un gel de polyacrylamide de 6% pendant une durée de migration variant de 3 à 8 heures selon la taille du fragment considéré.

Amorces nucléotidiques utilisées pour le séquençage des fragments A1, B2 et C3 du rFSH:

T7 5'- TAATACGACTCACTATAGGG

SP6 5'- GATTTAGGTGACACTATAG

bGAL B 5'- TGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCA

2. 1. 3 Transformation de *E. coli* XL1-Blue par les fragments caractérisés

A la lumière des résultats du séquençage, les clones plasmidiques qui ont présenté peu ou pas de mutations par rapport au récepteur natif ont été choisis pour la suite des travaux.

2. 1. 3. 1 Digestion par Sfi I et Not I

Les ADN plasmidiques ont été digérés par Not I et Sfi I afin de récupérer l'insert incorporé dans le phagemide pGem-T. Le phagemide pCantab (Fig. 4; Pharmacia) dans lequel les inserts ont dû être clonés, a été préalablement digéré par ces dites enzymes de restriction. Cette double digestion a été réalisée en deux temps car Sfi I et Not I nécessitent des tampons, température et durée d'incubation différents. Dans un premier temps, les fragments A1, B2 et C3 ont été digérés séparément par Sfi I dans les proportions suivantes: 40µl d'ADN de l'insert isolé par Magic mini prep, 5µl de tampon Sfi I 10x (100mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 100mM MgCl₂, 10mM DTT et 1mg/ml BSA <sans DNase>) et 0,4U d'enzyme Sfi I (Pharmacia); le volume final pour cette première réaction est de 50µl. Pour le phagemide, 3,4µg de pCantab a été utilisé; le volume final ayant été rajusté avec de l'eau stérile comparativement aux digestions précédentes. Ces volumes recouverts par de l'huile minérale ont été incubés à 50°C pendant 5 heures. Après cette incubation, les tubes ont été chauffés à 85°C pendant 25 min afin de désactiver Sfi I. Les échantillons ont été par la suite ramenés à la température

ambiante pendant 20 min environ avant que ne soit amorcée dans un deuxième temps, la digestion de Not I. Cette dernière a été réalisée en ajoutant dans les tubes précédents: 2 μ l de NaCl 5M, 5 μ l de tampon Not I 10x (100mM Tris-HCl pH 8, 100mM MgCl₂, 0,2% Triton X-100 et 10mM DTT), 35 μ l d'eau stérile et 1,1U Not I (Pharmacia) puis l'incubation a duré toute la nuit à 37°C.

Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1,5% qui a permis de visualiser sous formes de bandes les fragments du rFSHb et le phagemide pCantab. Conformément aux procédés décrits précédemment (section 2. 1. 1. 2) les bandes ont été coupées et les différents fragments d'ADN purifiés en vue de la ligation dans pCantab.

2. 1. 3. 2 Ligation dans pCantab

Pour l'expression ultérieure des fragments du rFSHb A1, B2 et C3 dans les bactériophages M13K07, le phagemide pCantab été utilisé. Ce vecteur possède l'origine de réplication du phage M13K07 et la résistance à l'ampicilline. La localisation spécifique des sites de restriction de Sfi I (2316 pb) et Not I (2368 pb) a permis une insertion unidirectionnelle des inserts lors du clonage. A cet effet, les fragments A1, B2 et C3 préalablement digérés par Sfi I et Not I ont été clonés dans pCantab qui a été digéré au préalable par ces mêmes enzymes. Les conditions de ligation sont identiques à celles décrites dans la section 2. 1. 1. 3.

Fragment A1, B2 ou C3

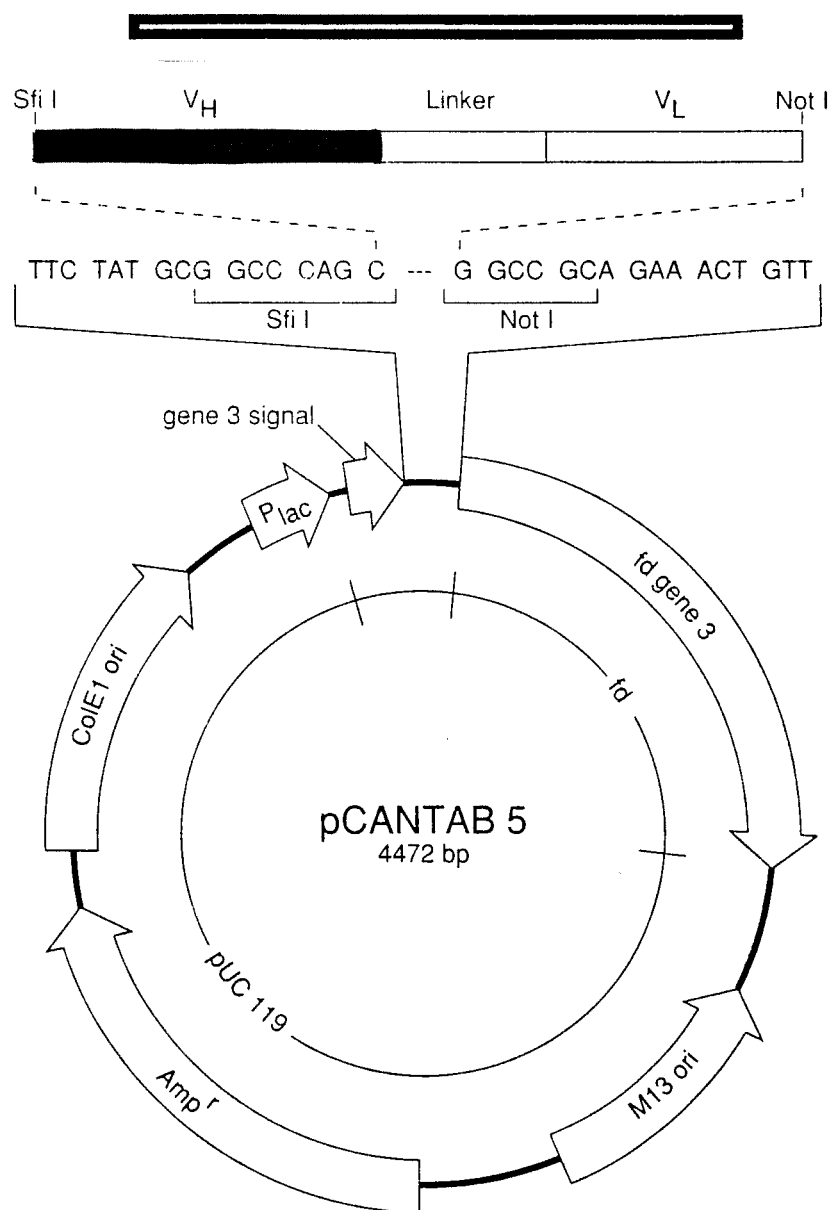


Figure 4. Représentation du plasmide pCantab et localisation du site de clonage du ScFV et des fragments A1, B2 et C3 du rFSH bovin.

2.1.3.3 Transformation de bactéries TG1 compétentes

La souche TG1 d'*Escherichia coli* provenant de Pharmacia a été utilisée afin de multiplier le phagemide pCantab recombinant avant que ce dernier ne soit incorporé dans le bactériophage. Les bactéries ont été rendues compétentes pour une transformation chimique. La transformation proprement dite des bactéries TG1 par pCantab recombinant a été réalisée selon la technique décrite par Sambrook et coll. (1989), suivie de leur ensemencement sur gélose contenant le milieu SOBAG agar (Sambrook et coll., 1989). Dans ce cas, la sélection des bactéries recombinantes n'a pas été réalisée sur la base de la couleur des colonies car le système d' α -complémentation est inexistant dans TG1 et pCantab. Néanmoins, la digestion des ADN plasmidiques par EcoR I a permis de distinguer les bactéries recombinantes de celles qui ont incorporé pCantab dépourvu d'insert.

2. 1. 4 Expression des fragments par les bactériophages

2. 1. 4. 1 Infection par M13K07

Suite à la digestion de EcoR I, les clones bactériens considérés comme positifs c'est-à-dire abritant le pCantab recombinant ont été infectés par les bactériophages M13K07 selon le protocole suggéré par Pharmacia (Annexe 1). Ces bactériophages non lytiques infectent les bactéries. Ceci permet aux bactériophages néoformés d'incorporer dans leur matériel génétique le pCantab recombinant. Deux antibiotiques ont donc été utilisés: la kanamycine (50mg/ml) et l'ampicilline (50mg/ml). La résistance à la kanamycine est apportée par M13K07 tandis que pCantab est responsable de la résistance à l'ampicilline. Par conséquent, ces deux antibiotiques ont permis la multiplication sélective des bactéries recombinantes c'est-à-dire celles qui sont non seulement infectées par le bactériophage M13K07 mais hébergeant aussi le pCantab recombinant.

Après cette infection, les phages libérés dans le milieu par les bactéries recombinantes ont été récupérés. Un titre de phages de 10^{10} à 10^{11} pfu/ml (unité de formation de plages) est requis avant de procéder à la sélection des bactériophages. Si tel n'est pas le cas, les phages ont été concentrés par précipitation à l'aide du polyéthylène glycol (PEG; Annexe 2).

2. 1. 4. 2 Sélection des bactériophages recombinants

Le terme de bactériophage recombinant est utilisé pour tout bactériophage qui coexprime avec la protéine 3 de capsid (gp3) un fragment du rFSHb A1, B2 ou C3 selon le cas. Les bactériophages recombinants du fait de leur protéine-fusion gp3-fragment du rFSHb (A1, B2 ou C3) se distinguent des autres bactériophages par leur présumée capacité à lier la FSH. C'est en considérant cette propriété que la méthode de sélection (panning) a été définie. Elle a consisté à adsorber durant toute la nuit à 37°C dans un flacon de culture en polystyrène 5ml de 40ng/ml de FSH purifiée jusqu'à homogénéité (à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-bêta FSH; Lussier et coll., 1992) à partir d'extraits commerciaux de FSH porcine (Schering Canada). Les sites non spécifiques ont été bloqués pendant 1 heure par 5ml de tampon phosphate de blocage contenant 2% de lait écrémé. Les bactériophages recombinants dilués à volume égal avec du tampon de blocage ont été d'abord incubés pendant 15min à la température de la pièce puis pendant 2 heures à 37°C dans les flacons précédents préalablement lavés avec tampon phosphate (130mM NaCl, 20mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,7mM KH₂PO₄, pH 7,4). Après ce délai d'incubation, les flacons ont été lavés avec du tampon phosphate additionné de 0,1% de Tween 20 (Sigma). Par la suite, à chaque flacon, 1ml de 100mM triéthylamine (Sigma) a été ajouté afin d'éluer les bactériophages adsorbés à la plaque. Les flacons ont été incubés à la température ambiante pendant 10min; après ce délai strict, le volume d'élution a été récupéré dans un tube puis neutralisé immédiatement avec 1ml de 1M Tris-HCl pH

7,4. Ces tubes contenant les bactériophages recombinants sélectionnés ont été conservés à 4°C.

2. 1. 4. 3 Infection des bactéries TG1 non compétentes

Des bactéries *E. coli* TG1 non compétentes ont été mises en culture dans un milieu minimum (Annexe 6) afin qu'elles puissent exprimer le pili. L'expression du pili s'avère nécessaire pour l'infectivité du phage M13K07. Les bactériophages recombinants sélectionnés ont été utilisés pour infecter ces bactéries selon un protocole suggéré par Pharmacia (Annexe 3). Suite à cette infection, les bactéries ont acquis la résistance à l'ampicilline et kanamycine et ont produit des bactériophages recombinants. Ces derniers ont été à nouveau sélectionnés (section 2. 1. 4. 2) puis ils ont été utilisés pour infecter d'autres *E.coli* souche TG1 préalablement mis en culture sur milieu minimum. Ce cycle sélection-réinfection a été répété quatre fois avant que les bactériophages ne soient utilisés pour les études de liaison.

2. 1. 5 Etude de liaison des fragments du rFSHb

L'étude de la capacité de liaison des fragments du rFSH coexprimés avec la gp3 du bactériophage a été réalisée par ELISA (Annexe 4) grâce à la trousse Detection module/ Recombinant Phage Antibody System de Pharmacia. La FSH purifiée (section 2. 1. 4. 2) utilisée comme antigène à une concentration de 40ng/ml a été adsorbée sur des plaques de 96 puits en polystyrène (Libro) selon le protocole décrit dans la section 2. 1. 4. 2. Le système de détection utilisé était constitué par un anticorps anti-gp8 couplé à la peroxydase dont le substrat chromogène est le 2', 2' Azino-Bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium (ABTS). La coloration verte apparaît dans le puit du contrôle positif (fourni dans la trousse) et les puits dans lesquels les bactériophages recombinants se sont liés à l'antigène. Après 45min d'incubation, la densité optique a été lue à 410nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

2. 2 L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-BETA FSH

L'hybridome sécréteur d'un anticorps anti-bêta FSH a été caractérisé par Lussier et coll. (1992). L'immunoglobuline sécrétée est une IgG1 et le myélome qui a servi pour la fusion est la souche non sécrétrice X63-Ag8.653.

2. 2. 1 Culture des hybridomes

Les hybridomes ont été décongelés de l'azote liquide selon le protocole décrit par Harlow et Lane (1989). Par la suite, elles ont été mises en culture dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 50mg/ml pénicilline-streptomycine (Gibco-BRL), 10% de sérum de veau nouveau-né (Gibco-BRL), 25mM glucose, 2mM glutamine, 10% NCTC. Hormis la pénicilline-streptomycine, tous les réactifs provenaient de la compagnie Sigma. Le milieu de culture des cellules a été renouvelé tous les deux jours.

2. 2. 2 Synthèse d'ADNc

2. 2. 2. 1 Isolation de l'ARNm

Les hybridomes ont été maintenues en culture pendant une semaine et en phase de croissance. Les cellules ont été récupérées par centrifugation (200g, 10min, 4°C) puis le culot de cellules fût immédiatement lysé à l'aide d'une solution de 4M d'isothiocyanate de guanidium (Chomczynski et Sachhi, 1987). Le lysat cellulaire a été déposé sur un coussin de 4ml trifluoroacétate de césium à une densité de 1,6g/ml puis centrifuger à 32000 rpm à 22°C pendant 20 heures dans un rotor SW 41Ti de Beckman (Farrel, 1993). Le culot d'ARN total a été extrait par chloroforme et précipité selon le protocole de Farrel (1993). L'ARN total a été quantifié au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260nm; la qualité quant à elle a été appréciée après une électrophorèse sur un gel d'agarose pour ARN (Houde et

coll., 1994). Par la suite, à partir de 75µg d'ARN total, 2µg l'ARNm poly A ont été isolés grâce à l'utilisation de la trousse Dyna-beads mRNA Purification (Dyna) qui utilise des oligo-dT couplés à des billes magnétiques en polystyrène.

2. 2. 2. 2 Synthèse de l'ADN complémentaire

La synthèse de l'ADNc a été réalisée par la transcriptase réverse murine (M-MuLV) à partir de l'ARNm Poly A (section 2. 2. 2. 1). Cette réaction réalisée en duplicata a été effectuée avec 1µg d'ARNm poly A, 11µl du mélange Primed First-Stand Mix comprenant la transcriptase réverse murine et des hexadéoxyribonucléotides, 16µl d'eau traitée au DEPC (diéthyl pyrocarbonate) et 1µl de 200mM DTT (1, 4 dithiothreitol). La réaction a été incubée à 37°C pendant 1 heure. Tous ces réactifs cités ci-avant proviennent de la trousse Mouse ScFv module/Recombinant Phage Antibody Système (Pharmacia).

2. 2. 3 Amplification des régions variables des chaînes lourde et légère

La synthèse a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne à partir des ADNc (section 2. 2. 2. 2). La trousse Mouse ScFv module a été utilisée à nouveau. Chaînes lourdes et légères ont été amplifiées séparément car les amorces incluses sont spécifiques pour chaque chaîne. C'est ainsi que pour la chaîne lourde, la réaction d'amplification a été réalisée à partir de 33µl d'ADNc, 2µl d'amorce Heavy Primer 1, 2µl d'amorce Heavy primer 2 et 62µl d'eau stérile. En ce qui concerne la chaîne légère, les proportions ont été de 33µl d'ADNc, 2µl d'amorce light primer mix et 64µl d'eau stérile. Ces deux réactions ont été recouvertes par 100µl d'huile minérale. Après la dénaturation des fragments d'ADN (3 min à 95°C), 1µl d'Ampli Taq DNA polymérase (Perkins-Elmer Cetus) a été rajouté, suivie de, l'amplification des deux réactions effectuée durant 30 cycles de 40 sec à 94°C, 40 sec à 55°C, 2 min à 72°C. Les fragments amplifiés ont été séparés par

électrophorèse sur un gel d'agarose de 1,5% et purifiés (section 2. 1. 1. 2). La taille escomptée des fragments d'ADN est de 340 pb et 325 pb respectivement pour la chaîne lourde et légère.

2. 2. 4 Production de l'ADNc du fragment variable

La chaîne lourde et légère ont été assemblées en une simple chaîne variable (ScFV) de l'anticorps afin de former un paratope. A cet effet, un segment (linker) de 45pb codant pour un peptide de 15 acides aminés (Gly₄ Ser)₃ a été utilisé. Afin d'obtenir le ScFV, l'assemblage des fragments par la Taq polymérase a été réalisée avec un mélange équimolaire (1µl) de l'ADNc de la chaîne lourde, légère et du linker-Primer Mix (mixture équimolaire des amorces de la chaîne lourde et légère). A ce mélange, s'ajoute 2,5µl de tampon PCR 10x (Pharmacia), 10µl de dNTP Mix (Pharmacia), 2,5µl de 25mM MgCl₂ et 18,5µl d'eau stérile. Ce volume a été recouvert par 25µl d'huile minérale. Après la dénaturation des fragments d'ADN à 95°C pendant 2 min, 1µl d'Ampli Taq DNA polymérase a été rajouté puis l'amplification s'est déroulée en 7 cycles (40 sec. à 94°C, 4 min à 63°C). Suite à ce premier assemblage, une réaction de polymérisation en chaîne a été réalisée dans le but d'amplifier le ScFV et d'y insérer les sites de Sfi I et Not I en vue du clonage dans pCantab. A cet effet, au produit de l'amplification précédente ont été rajoutés: 2,5µl de tampon PCR 10x avec 15µM MgCl₂, 2µl de RS primer mix (mixture d'amorces pour les sites de restriction Not I et Sfi I) et 20,5µl d'eau stérile. La réaction de polymérisation s'est effectuée pendant 30 cycles (1 min à 94°C, 2 min à 55°C, 2 min à 72°C). Conformément à la section 2. 1. 1. 2, le produit d'amplification a été séparé puis purifié. La taille du ScFV prévue était de 750 pb.

2. 2. 5 Ligation dans les vecteurs pGem-T et pCantab

Le ScFV purifié a été inséré par ligation dans le plasmide pGem-T (voir section 2. 1. 1. 3). A partir de cette étape, toutes les manipulations conduisant à l'expression du fragment variable

par les bactériophages sont similaires à celles décrites pour les fragments A1, B2 et C3 du rFSHb. Cependant, afin d'identifier les clones positifs c'est à dire ayant incorporé pCantab possédant l'insert ScFV, la digestion des ADN plasmidiques a été réalisée avec 0,05U de Pvu II (Pharmacia).

2. 3 ETUDE DES REACTIONS CROISEES

Ces expériences ont servi à confirmer ou à infirmer des hypothèses qui nous ont permis de mener une discussion appropriée.

L'étude des réactions croisées est nécessaire pour déterminer la spécificité à la FSH des bactériophages recombinants considérés comme positifs après l'étude de liaison. A cet effet, d'autres protéines telles la LH bovine (bLH-1072-2; Dr. Reichert L.E, Albany Medical College, NY, USA), l'ovalbumine de poule (Grade V; Sigma) et des protéines virales (réovirus aviaire souche vaccinale S1133 fourni par Dr. Amer Silim, Université de Montréal) ont été utilisées. Dans des plaques d'ELISA en polystyrène (Libro) la LH à raison de 20ng/puits, ovalbumine (20ng/puits), la FSH (40ng/puits) et les protéines virales (1µg/puits) ont été adsorbées toute la nuit à 37°C dans du tampon bicarbonate pH 9,6. L'ELISA a été réalisé selon le protocole décrit à l'annexe 4 avec différentes dilutions des bactériophages recombinants. Le contrôle positif est fourni par la trousse Detection module /Recombinant Phage Antibody System; M13K07 type sauvage a servi de contrôle négatif.

En utilisant les même concentrations de LH, d'ovalbumine, FSH et protéines définies ci-avant, un autre ELISA a été réalisé avec de l'ascite contenant l'anticorps monoclonal anti-bêta FSH selon le protocole décrit en Annexe 5. Les résultats obtenus pourront être comparés avec ceux des bactériophages co-exprimant le ScFV du même anticorps contenu dans l'ascite.

CHAPITRE 3

RESULTATS

3. 1 LES FRAGMENTS DU rFSH BOVIN

3. 1. 1 Production

La réaction de polymérisation en chaîne a généré trois fragments A1, B2 et C3 dont les tailles respectives sont 348 pb, 579 pb et 468 pb (Fig. 5). Après avoir été purifiés, ces fragments ont été insérés dans pGem-T. Les ADN plasmidiques de différents clones de bactéries recombinantes ont été digérés par EcoR I et BamH I pour le fragment A1; EcoR I et Pst I pour les fragments B2 et C3. Les clones sont considérés comme positifs si après la digestion des bandes de 348 pb, 579 pb et 468 pb ont été obtenus respectivement pour les fragments A1, B2 et C3.

3. 1. 2 Caractérisation

Parmi les clones positifs, sept ont été séquencés puis comparés au récepteur natif. Des mutations se traduisant par des changements d'acides aminés ont été observées sur l'ensemble des clones séquencés. Hormis deux clones qui ont présentés des mutations au niveau des sites de Sfi I et Not I tous les autres à l'occurence A1-1, A2-2, B14-2, B18-2 et C8-2 ont été utilisés en vue de leur expression ultérieure par les bactériophages (Fig. 6 à 10).

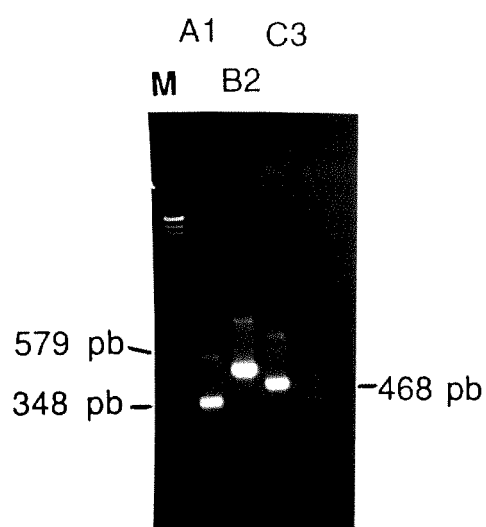


Figure 5. Produits d'amplification par polymérisation en chaîne des fragments A1 (348 pb), B2 (468 pb), C3 (579 pb) du rFSH mis sur gel d'agarose de 1% et teints au bromure d'éthidium. (M: marqueur de poids moléculaire lambda DNA Hind III digest et Φ x174 RF DNA Hae III digest; Pharmacia).

<u>EcoRI</u>		<u>SfiI</u>	
GAA TTC	CTG GCC CAG	CTG GCC TGC	CAT CAT CGA CTC TGT CAC TGC
	Leu Ala Cys	His His Arg	Leu Cys His Cys
TCT AAC GGA GTT TTC CTC TGC CAG GAG AGC AAG GTG ACA GAG ATT			
Ser Asn Gly Val Phe Leu Cys Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile			
CCC TCC GAC CTC CCC AGG GAT GCA GTC GAA CTG AGG TTT GTT CTC			
Pro Ser Asp Leu Pro Arg Asp Ala Val Glu Leu Arg Phe Val Leu			
ACC AAG CTT CGA GTC ATC CCA AAA GGA GCC TTT TCA GGA TTT GGA			
Thr Lys Leu Arg Val Ile Pro Lys Gly Ala Phe Ser Gly Phe Gly			
GAC CTG GAG AAA ATA GAG ATC TCA CAG AAT GAT GTC TTG GAA GTG			
Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ile Ser Gln Asn Asp Val Leu Glu Val			
ATA GAG GCA AAC GTG TTC TCC AAC CTG CCC AAA CTA CAT GAA ATT			
Ile Glu Ala Asn Val Phe Ser Asn Leu Pro Lys Leu His Glu Ile			
AGA ATT GAA AAG GCC AAC AAC CTG CTA TAC ATC GAC CCT GAT GCC			
Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asn Leu Leu Tyr Ile Asp Pro Asp Ala			
TTC CAG AAC CTT CCC AAC CTC CGA TAT CTG	<u>Not-1</u>	GCG GCC GCA TAA GGA	
Phe Gln Asn Leu Pro Asn Leu Arg His Leu Ala			
<u>BamHI</u>			
TCC			

Figure 6. Traduction en acides aminés (ligne inférieure) des acides nucléiques composant le fragment A1-1. Emplacement des sites d'enzymes de restriction en bout 5' et 3'.

<u>EcoR1</u>			<u>SfiI</u>											
GAA	TTC	CTG	GCC	CAG	CTG	GCC	AGA	ATT	GAA	AAG	GCC	AAC	AAC	CTG
					Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Lys	Ala	Asn	Asn	Leu
CTA	TAC	ATC	GAC	CCT	GAT	GCC	TTC	CAG	AAC	CTT	CCC	AAC	CTC	CGA
Leu	Tyr	Ile	Asp	Pro	Asp	Ala	Phe	Gln	Asn	Leu	Pro	Asn	Leu	Arg
TAT	CTG	TTA	ATA	TCC	AAC	ACA	GGT	ATT	AAG	CAC	TTG	CCA	GCT	GTT
Tyr	Leu	Leu	Ile	Ser	Asn	Thr	Gly	Ile	Lys	His	Leu	Pro	Ala	Val
CAC	AAG	ATT	CAG	TCT	CTC	CAA	AAG	GTT	TTA	CTA	GAT	ATT	CAA	GAT
His	Lys	Ile	Gln	Ser	Leu	Gln	Lys	Val	Leu	Leu	Asp	Ile	Gln	Asp
AAT	ATA	AAC	ATC	CAC	ACA	GTT	GAA	AGA	AAT	TCT	TTC	ATG	GGG	CTA
Asn	Ile	Asn	Ile	His	Thr	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Phe	Met	Gly	Leu
AGT	TTT	GAA	AGT	ATG	ACT	GTA	TGG	CTG	AGT	AAG	AAT	GGG	ATT	CAA
Ser	Phe	Glu	Ser	Met	Thr	Val	Trp	Leu	Ser	Lys	Asn	Gly	Ile	Gln
GAA	ATA	CAC	AAC	TGT	GCA	TTC	AAT	GGA	ACC	CAA	CTC	GAT	GAG	CTG
Glu	Ile	His	Asn	Cys	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Gln	Leu	Asp	Glu	Leu
AAT	CTA	AGT	GAT	AAC	AGT	AAT	TTG	GAA	GAA	CTG	CCT	AAT	GAT	GTT
Asn	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Asn	Leu	Glu	Glu	Leu	Pro	Asn	Asp	Val
TTC	CAG	GGA	GCC	TCT	GGA	CCG	GTC	ATT	CTA	GAT	ATT	TCA	AGA	ACC
Phe	Gln	Gly	Ala	Ser	Gly	Pro	Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ser	Arg	Thr
AGG	ATC	CGT	TCC	CTG	CCT	AGC	TAT	GGC	TTA	GAA	AAT	CTT	AAG	AAG
Arg	Ile	Arg	Ser	Leu	Pro	Ser	Tyr	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys
CTG	CGG	GCC	AAG	TCA	ACT	TAC	CGC	TTA	AAA	AAG	CTT	CCC	AGT	CTG
Leu	Arg	Ala	Lys	Ser	Thr	Tyr	Arg	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Ser	Leu
GAA	AAA	TTT	GTC	ACA	CTC	GTG	GAG	GCC	AGC	CTC	ACC	TAC	CCC	AGC
Glu	Lys	Phe	Val	Thr	Leu	Val	Glu	Ala	Ser	Leu	Thr	Tyr	Pro	Ser
								(G C)					<u>Not-1</u>	
CAC	TGC	TGT	GCC	TTT	GCA	AAC	TGG	AGC	GGG	CAA	ACC	GCG	GCC	GCA
His	Cys	Cys	Ala	Phe	Ala	Asn	Trp	Ser	Gly	Gln	Thr	Ala		
								(Arg Arg)						
	<u>Pst1</u>													
TAA	CTG	CAG												

Figure 9. Traduction en acides aminés (ligne inférieure) des acides nucléiques composant le fragment B 18.2. Emplacement des sites d'enzymes de restriction en bout 5' et 3'. En cas de mutations, l'acide aminé et l'acide nucléique du récepteur natif est indiqué entre parenthèses.

<u>EcoR1</u>		<u>SfiI</u>													
GAA	TTC	CTG	GCC	CAG	CTG	GCC	GAT	ATT	TCA	AGA	ACC	AGG	ATC	CGT	
		Leu	Ala	Gln	Leu	Ala	Asp	Ile	Ser	Arg	Thr	Arg	Ile	Arg	
TCC	CTG	CCT	AGC	TAT	GGC	TTA	GAA	AAT	CTT	AAG	AAG	CTG	CGG	GCC	
Ser	Leu	Pro	Ser	Tyr	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Ala	
AAG	TCA	ACT	TAC	CGC	TTA	AAA	AAG	CTT	CCC	AGT	CTG	GAA	AAA	TTT	
Lys	Ser	Thr	Tyr	Arg	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Ser	Leu	Glu	Lys	Phe	
GTC	ACA	CTC	GTG	GAG	GCC	AGC	CTC	ACC	TAC	CCC	AGC	CAC	TGC	TGT	
Val	Thr	Leu	Val	Glu	Ala	Ser	Leu	Thr	Tyr	Pro	Ser	His	Cys	Cys	
GCC	TTT	GCA	AAC	TGG	AGG	CGG	CAA	ACC	TCT	GAC	CTT	CAT	CCA	ATT	
Ala	Phe	Ala	Asn	Trp	Arg	Arg	Gln	Thr	Ser	Asp	Leu	His	Pro	Ile	
TGC	AAC	AAA	TCT	ATT	TTA	AGG	CAA	GAA	GTT	GAT	GAC	ATG	ACT	CAG	
Cys	Asn	Lys	Ser	Ile	Leu	Arg	Gln	Glu	Val	Asp	Asp	Met	Thr	Gln	
GCT	AGG	GGT	CAG	AGA	GTC	TCT	TTG	GCA	GAA	GAT	GAT	GAG	CCC	AGC	
Ala	Arg	Gly	Gln	Arg	Val	Ser	Leu	Ala	Glu	Asp	Asp	Glu	Pro	Ser	
TAT	GCC	AAA	GGA	TTT	GAC	GTG	ATG	TAC	AGT	GAA	TTT	GAC	TAT	GAC	
Tyr	Ala	Lys	Gly	Phe	Asp	Val	Met	Tyr	Ser	Glu	Phe	Asp	Tyr	Asp	
TTA	TGC	AAT	GAA	GTG	GTT	GAT	GTG	ACT	TGC	TCC	CCT	GAG	CCA	GAC	
Leu	Cys	Asn	Glu	Val	Val	Asp	Val	Thr	Cys	Ser	Pro	Glu	Pro	Asp	
GCA	TTT	AAT	CCA	TGT	GAA	GAT	ATC	ATG	GGG	GAT	CAT	ATT	CTC	AGA	
Ala	Phe	Asn	Pro	Cys	Glu	Asp	Ile	Met	Gly	Asp	His	Ile	Leu	Arg	
<u>Not-1</u>		<u>Pst1</u>													
GCG	GCC	GCA	TAA	CTG	CAG										
Ala															

Figure 10. Traduction en acides aminés (ligne inférieure) des acides nucléiques composant le fragment C8-2. Emplacement des sites d'enzymes de restriction en bout 5' et 3'. En cas de mutations, l'acide aminé et l'acide nucléique du récepteur natif est indiqué entre parenthèses.

3. 1. 3 Expression par les bactériophages M13K07

Les ADN plasmidiques des clones pGem-T recombinants A1-1, A2-2, B14-2, B18-2 et C8-2 ont été digérés par Not I et Sfi I (Fig. 11). Les résultats de cette digestion montrent la taille initiale des fragments soient 348 pb pour A1-1 et A2-2, 579 pb pour B14-2 et B18-2 et enfin 468 pb pour C8-2. Ces fragments purifiés ont été insérés par ligation dans pCantab. Les ADN plasmidiques des bactéries *E. coli* souche TG1 recombinantes ont été digérés par EcoR I afin de confirmer ou d'infirmer la présence des fragments. Une fois infectées par M13K07 selon le protocole décrit à la section 2. 1. 4. 1, les bactéries recombinantes ont produit beaucoup de bactériophages recombinants. Ces derniers ont été recueillis puis sélectionnés sur leur capacité à lier l'antigène selon le protocole décrit à la section 2. 1. 4. 2.

3. 1. 4 Etude de liaison

L'ELISA a révélé des bactériophages recombinants reconnaissant la FSH adsorbée dans les puits à raison de 40ng/ml. Ainsi, pour le fragment A.1 nous comptons 3 clones positifs sur un total de 96 clones (Tableau 1) il en est de même pour le fragment C.3 (Tableau 3). Le fragment B.2 quant à lui compte 4 clones positifs/96clones (Tableau 2).

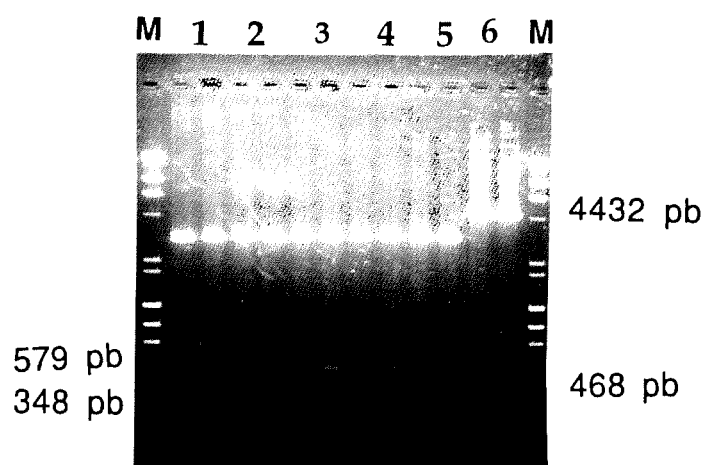


Figure 11. Produits de la digestion par Not I et Sfi I des clones recombinants de pGem-T portant les fragments du rFSH bovin par Not I et Sfi I mis sur un gel d'agarose de 1.5% et teints au bromure d'éthidium ((M: marqueur de poids moléculaire lambda DNA Hind III digest et Φ x174 RF DNA Hae III digest; Pharmacia). 1: fragment A1-1 (348 bp), 2: fragment A2-2 (348 pb), 3: fragment B 14.2 (579 pb), 4: fragment B 18.2 (579 pb), 5: fragment C8-2 (468 pb) et 6: pCantab (4432 pb).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.4	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.3	0.3
B	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.2
C	0.4	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1
D	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.1	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	0.2
E	0.0	0.0	0.1	0.0	0.5	0.1	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.1
F	0.0	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.0	0.4	0.4	0.1	0.3	0.1
G	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.4	0.3	0.5	0.4
H	0.7	0.4	0.3	0.1	0.1	0.2	1.0	0.6	0.3	0.1	0.6	0.0

Tableau 1. Lecture à une densité optique (D.O) de 410nm de la plaque d'ELISA . La FSH porcine à raison de 8ng par puits a été adsorbée. **A1:** contrôle positif (antigène et bactériophage fourni trousse RPAS; Pharmacia). **A2:** contrôle négatif (3×10^{10} pfu M13K07 dépourvu d'insert), **A3 à H12:** les bactériophages recombinants exprimant ou non le fragment A.1 du rFSH bovin. Les bactériophages recombinants sont considérés positifs à une D.O. supérieure ou égale à 0.7.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.2	0.0	0.3	0.2	0.2	0.3	0.4	0.4	0.2	0.1	0.3	0.7
B	0.3	0.3	0.2	0.1	0.4	0.3	0.2	0.4	0.6	0.6	0.8	0.9
C	0.4	0.1	0.2	0.1	0.0	0.2	0.2	0.9	0.2	0.1	0.2	0.4
D	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.9	0.4	0.2	0.4	0.6
E	0.0	0.3	0.0	0.3	0.1	0.1	0.3	1.1	0.3	0.2	0.2	0.3
F	0.3	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0.3	0.6
G	0.1	0.4	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1
H	0.5	0.5	0.0	0.1	0.1	0.5	0.3	0.2	0.5	0.5	0.6	0.0

Tableau 2 . Lecture à une densité optique (D.O) de 410nm de la plaque d'ELISA . La FSH porcine a raison de 8ng par puits a été adsorbée. **A1**: contrôle positif (antigène et bactériophage fourni trousse RPAS; Pharmacia). **A2**: contrôle négatif (3×10^{10} pfu M13K07 dépourvu d'insert), **A3 à H12**: les bactériophages recombinants exprimant ou non le fragment B.2 du rFSH bovin. Les bactériophages recombinants sont considérés positifs à une D.O. supérieure ou égale à 0.9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	>2	0.0	1.0	0.2	0.4	0.6	0.6	0.4	0.7	0.5	0.3	0.6
B	0.4	0.6	0.3	0.3	0.4	0.2	0.4	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0
C	0.2	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	0.7	1.0	0.0
D	0.8	0.1	0.5	0.4	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.4	0.7	0.0
E	0.8	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.5	0.6	0.3	0.5	0.0
F	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0
G	0.8	0.1	0.2	0.5	0.5	0.3	0.6	0.2	0.3	0.6	0.5	0.0
H	0.2	0.4	0.2	0.3	0.1	0.6	0.4	0.5	0.3	0.5	1.6	0.0

Tableau 3. Lecture à une densité optique (D.O) de 410nm de la plaque d'ELISA . La FSH porcine a raison de 8ng par puits a été adsorbée. **A1**: contrôle positif (antigène et bactériophage fourni trousse RPAS; Pharmacia). **A2**: contrôle négatif (3×10^{10} pfu M13K07 dépourvu d'insert), **A3 à H12**: les bactériophages recombinants exprimant ou non le fragment C.3 du rFSH bovin. Les bactériophages recombinants sont considérés positifs à une D.O. supérieure ou égale à 1.

3. 2 L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-BETA FSH

3. 2. 1 Extraction de l'ARN total

L'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ARN total du myélome a révélé les bandes de 18S et 28S (Fig. 12). A partir de cet ARN total, l'ARNm poly A a été isolé. Ce dernier a servi à la production de l'ADNc.

3. 2. 2 Synthèse de l'ADNc du fragment variable

3. 2. 2. 1 Production des chaînes lourde et légère

Les amplifications à partir de l'ADNc du myélome ont permis d'obtenir un fragment d'ADN de 340 pb codant pour la chaîne lourde et un autre de 325 pb codant pour la chaîne légère (Fig. 13).

3. 2. 2. 2 Production du fragment simple variable

La deuxième amplification a permis d'assembler la chaîne lourde et la chaîne légère grâce au pont peptidique. Le fragment simple variable a été visualisé sur le gel par une bande de 750 bp (Fig. 14).

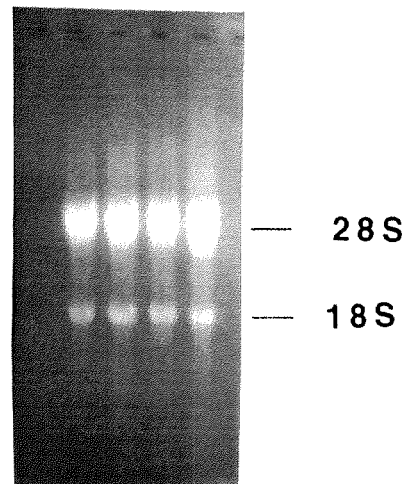


Figure 12. Visualisation de l'ARN total extrait de l'hybridome anti-bêta FSH puis séparé sur un gel dénaturant de 1% d'agarose selon le protocole décrit par Sambrook et al. (1989). L'ARN a été teint au bromure d'éthidium et les bandes majeures représentent l'ARN ribosomique de 28S et 18S.

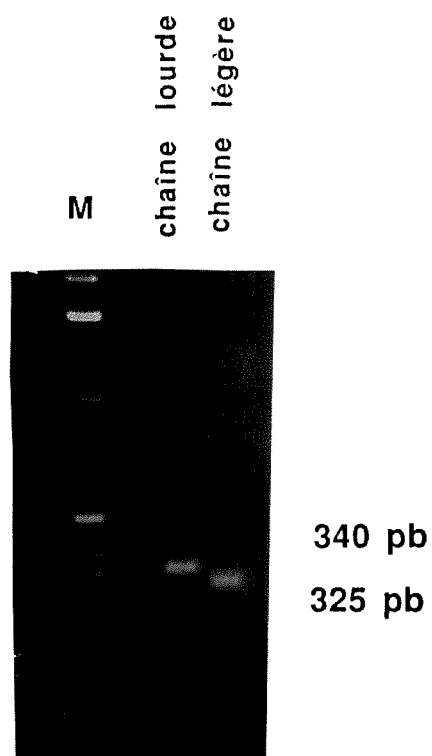


Figure 13. Produits de l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne de la partie variable des chaînes lourde (340 pb) et légère (325 pb). Ils ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1.5% et teints au bromure d'éthidium (**M**: marqueur de poids moléculaire 1Kb DNA ladder; Gibco, BRL).

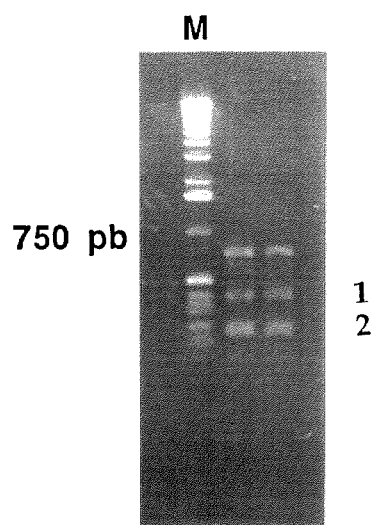


Figure 14. Produits de l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne du fragment variable simple chaîne (ScFV) mis sur gel d'agarose de 1% et teints au bromure d'éthidium; **M**: marqueur de poids moléculaire 1Kb DNA ladder; Gibco-BRL, **1**: produit primaire d'amplification, **2**: dimère d'amorce.

3. 2. 3 Expression par les bactériophages M13 K07

3. 2. 3. 1 Clonage et digestion dans pGem-T et pCantab

Le ScFV a été cloné dans un premier temps dans pGem-T. Les bactéries *E. coli* XL1-Blue compétentes ont été transformées par le pGem-T recombinant; les ADN plasmidiques isolés ont été digérés par Sfi I et Not I. Cette double digestion a permis d'obtenir la bande originale du ScFV soit 750bp

Par la suite, le ScFV coupé puis purifié a été cloné dans pCantab lequel a transformé des bactéries TG1 compétentes. La digestion par Pvu II des ADN plasmidiques provenant des bactéries TG1 transformées a révélé les bandes 2838 pb et 2384 pb pour les clones positifs et 2838 pb et 1634 pb pour les clones négatifs (Fig. 15).

3. 2. 3. 2 Expression par les bactériophages

Les bactéries TG1 recombinantes, ont été infectées par M13K07 afin de générer les bactériophages recombinants. Ces derniers ont été sélectionnés après quatre panning puis leur liaison à la FSH vérifiée par ELISA.

3. 2. 4 Etude de liaison

En considérant la densité optique des puits, l'ELISA a révélé plusieurs bactériophages recombinants M13K07 positifs. Ainsi, pour la plaque I, il y a eu 47 positifs (Tableau 4), 70 pour la plaque II (Tableau 5) et 64 pour la plaque III (Tableau 6). Le puits du contrôle négatif constitué par M13K07 de type sauvage était demeuré incolore.

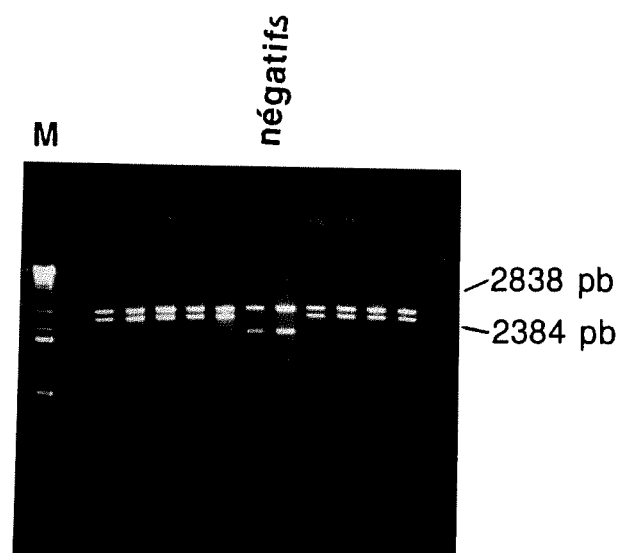


Figure 15. Produits de la digestion par PVU II des clones pCantab recombinants mis sur un gel d'agarose de 1.5% et teints au bromure d'éthidium. Suite à cette digestion, les clones positifs ont présenté deux fragments: 2384 pb et 2838 pb (**M**: marqueur de poids moléculaire 1Kb DNA ladder; Gibco-BRL).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.4	0.1	1.4	1.3	1.4	1.5	0.6	0.5	1.5	1.4	1.1	0.8
B	1.6	1.2	1.2	1.5	1.7	1.5	1.2	2.7	1.7	1.4	1.8	0.8
C	0.6	0.9	0.9	1.2	1.8	0.9	1.3	1.6	1.4	1.4	0.6	0.9
D	1.2	1.3	1.3	1.5	1.1	1.1	1.0	1.2	0.9	0.9	1.0	0.7
E	1.8	1.2	1.2	1.7	1.4	0.8	1.1	1.5	0.7	0.6	0.7	0.8
F	1.8	1.6	1.6	0.6	0.5	0.6	1.0	0.4	0.5	0.7	0.9	0.8
G	1.7	1.7	1.1	1.3	0.9	1.2	1.3	1.6	0.5	0.8	0.8	0.8
H	0.9	1.4	0.9	0.9	0.7	0.5	0.5	0.7	0.4	0.7	0.5	0.7

Tableau 4. Lecture à une densité optique (D.O) de 410nm de la plaque d'ELISA I. La FSH porcine a raison de 4ng par puits a été adsorbée. **A1**: contrôle positif (antigène et bactériophage fourni trousse RPAS; Pharmacia). **A2**: contrôle négatif (3×10^{10} pfu M13K07 dépourvu d'insert), **A3 à H12**: les bactériophages recombinants exprimant ou non le ScFv anti-bêta FSH. Les bactériophages recombinants sont considérés positifs à une D.O. supérieure ou égale à 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.3	0.0	1.4	1.3	1.4	1.5	0.5	0.7	0.5	0.7	1.4	1.6
B	0.6	0.6	1.0	1.4	1.5	1.7	1.7	1.8	1.7	1.7	1.4	1.0
C	1.5	0.7	1.3	0.5	0.7	1.1	1.7	1.7	1.5	1.8	1.9	1.8
D	1.4	1.4	1.0	1.1	1.3	1.5	1.3	1.6	1.9	1.8	1.6	1.6
E	1.5	0.8	1.4	1.2	0.6	1.6	1.3	1.6	1.6	1.7	1.6	1.5
F	1.6	1.6	1.4	1.4	0.7	1.6	1.5	1.2	1.6	1.3	1.7	1.6
G	1.3	1.3	1.4	1.3	1.3	1.6	1.3	1.1	1.2	1.0	1.2	1.3
H	1.4	0.9	1.3	0.4	1.2	1.0	1.2	0.9	0.6	0.7	0.6	0.7

Tableau 5. Lecture à une densité optique (D.O) de 410 nm de la plaque d'ELISA II. La FSH porcine à raison de 4ng par puits a été adsorbée. **A1**: contrôle positif (antigène et bactériophage fourni trousse RPAS; Pharmacia). **A2**: contrôle négatif (3×10^{10} pfu M13K07 dépourvu d'insert), **A3 à H12**: les bactériophages recombinants exprimant ou non le ScFv anti-bêta FSH. Les bactériophages recombinants sont considérés positifs à une D.O. supérieure ou égale à 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.3	0.0	1.4	1.4	1.1	1.4	1.6	1.4	1.4	1.0	1.3	1.0
B	1.0	0.6	0.9	1.0	1.5	1.5	1.6	1.0	1.6	1.5	1.4	1.3
C	1.0	1.3	0.9	1.5	1.5	1.5	1.5	1.1	1.9	1.8	1.7	0.1
D	0.4	1.3	1.2	1.3	1.5	0.9	1.3	1.5	1.5	1.8	1.6	0.4
E	1.4	1.4	1.3	1.4	1.4	0.7	1.0	1.6	1.7	1.5	1.1	0.6
F	0.6	1.3	1.3	1.5	1.0	0.7	1.5	1.1	1.6	0.9	1.2	0.9
G	1.3	0.6	1.0	1.1	0.8	1.0	1.8	1.5	1.2	0.7	1.0	0.7
H	0.4	0.5	0.8	1.2	0.6	1.1	1.6	0.8	1.5	0.6	0.6	1.2

Tableau 6. Lecture à une densité optique (D.O) de 410nm de la plaque d'ELISA III. La FSH porcine à raison de 4ng par puits a été adsorbée. **A1:** contrôle positif (antigène et bactériophage fourni trousse RPAS; Pharmacia). **A2:** contrôle négatif (3×10^{10} pfu M13K07 dépourvu d'insert), **A3 à H12:** les bactériophages recombinants exprimant ou non le ScFv anti-bêta FSH. Les bactériophages recombinants sont considérés positifs à une D.O. supérieure ou égale à 1.

3. 3 LES REACTIONS CROISEES

Suite à l'ELISA, pour chaque type de bactériophages, une courbe représentant la densité optique versus les dilutions de bactériophages a été tracée. Ces courbes ont permis de visualiser le comportement de chaque bactériophage vis à vis de la protéine qui lui a été présentée.

Il apparaît que les bactériophages recombinants co-exprimant avec la gp3 les fragments A.1, B.2 et C.3 du rFSH bovin se lient à la LH, l'ovalbumine et aux protéines virales autant qu'avec la FSH (Figure 16, 17 et 18). Il en est de même avec les bactériophages recombinants portant le ScFV de l'anticorps anti-bêta FSH (Figure 19 et 20). L'anticorps monoclonal anti-bêta FSH contenu dans l'ascite quant à lui présente une affinité plus prononcée pour la FSH; il lie également la LH, l'ovalbumine et les protéines virales (Figure 21).

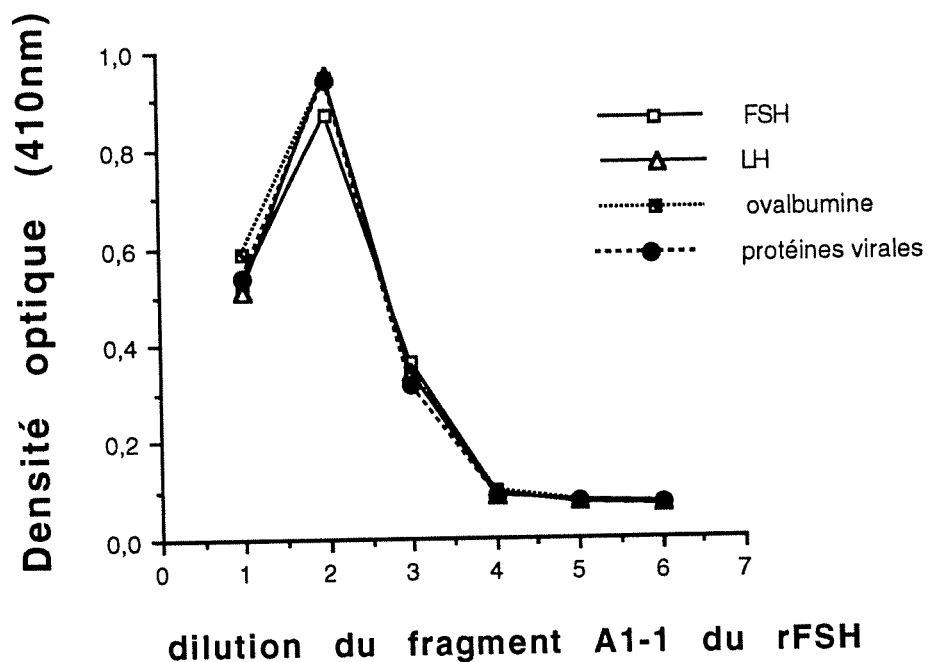


Figure 16: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le **fragment A1** (clone A1-1) du rFSH bovin vis à vis des protéines adsorbées (LH, FSH, ovalbumine et protéines de réovirus) dans les puits à ELISA (1: bactériophages non dilués; 2: dilution 1: 5; 3: dilution 1:25 4: dilution 1: 625; 5: dilution 1: 15625; 6: dilution 1: 390625).

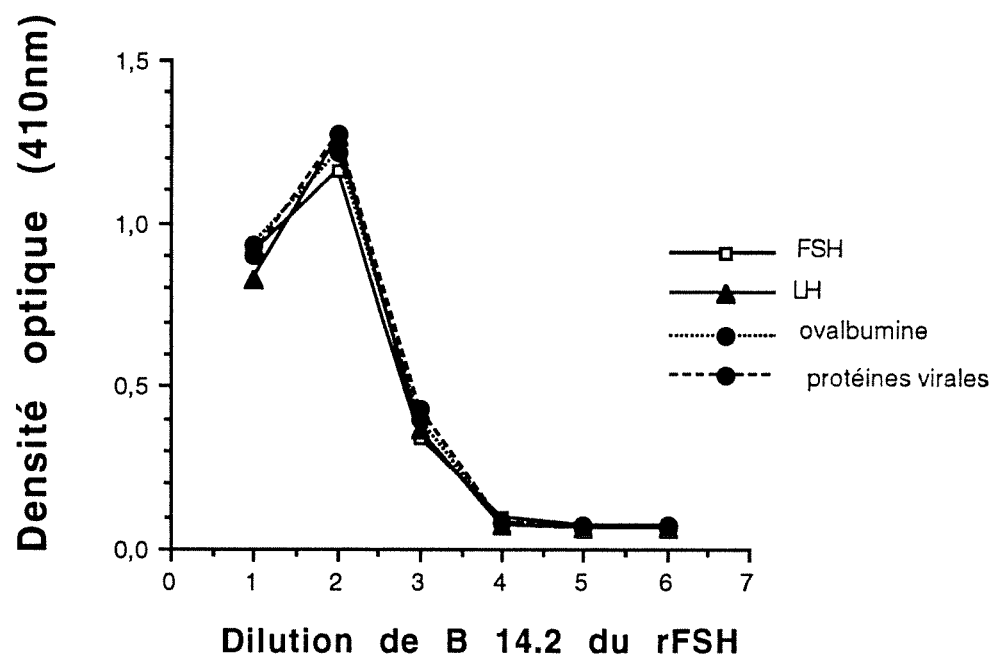


Figure 17: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le **fragment B.2** (clone 14.2) du rFSH bovin vis à vis des protéines adsorbées (LH, FSH, ovalbumine et protéines de réovirus) dans les puits à ELISA (1: bactériophages non dilués; 2: dilution 1: 5; 3: dilution 1:25 4: dilution 1: 625; 5: dilution 1: 15625; 6: dilution 1: 390625).

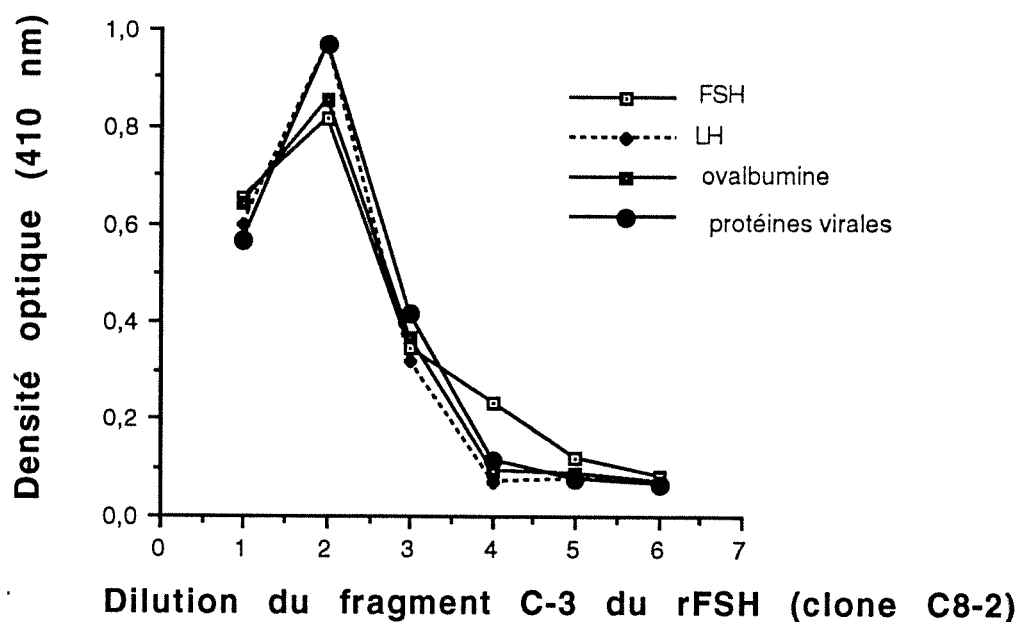


Figure 18: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le **fragment C.3** (clone C8-2) du rFSH bovin vis à vis des protéines adsorbées (LH, FSH, ovalbumine et protéines de réovirus) dans les puits à ELISA (1: bactériophages non dilués; 2: dilution 1: 5; 3: dilution 1:25 4: dilution 1: 625; 5: dilution 1: 15625; 6: dilution 1: 390625).

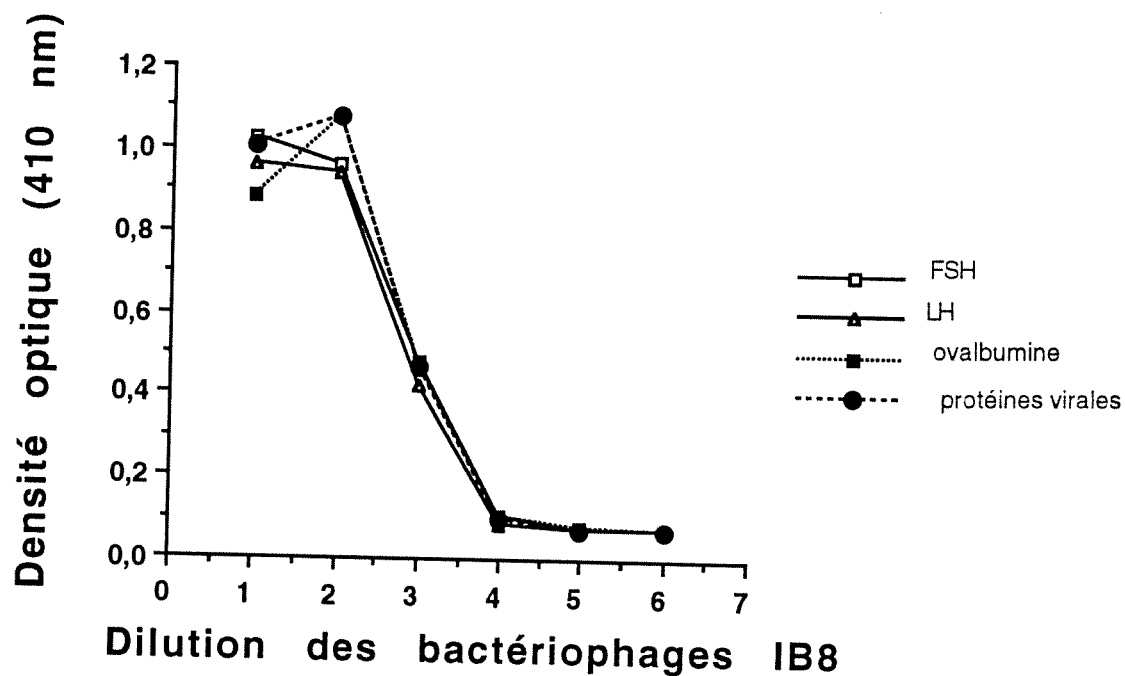


Figure 19: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le **ScFV anti-bêta FSH bovine (clone IB 8)** vis à vis des protéines adsorbées (LH, FSH, ovalbumine et protéines de réovirus) dans les puits à ELISA (1: bactériophages non dilués; 2: dilution 1: 5; 3: dilution 1:25 4: dilution 1: 625; 5: dilution 1: 15625; 6: dilution 1: 390625).

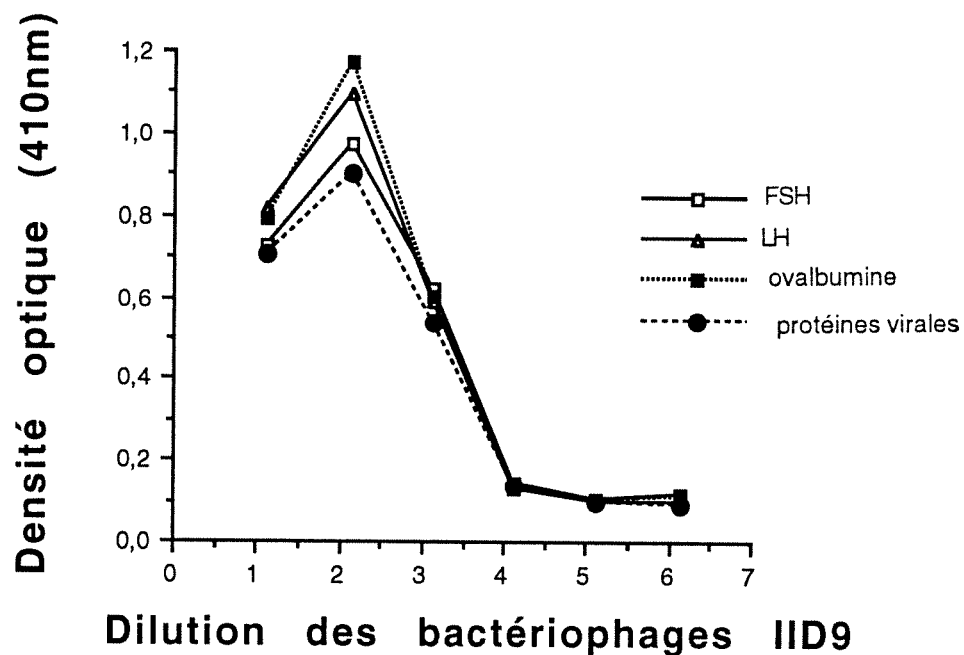


Figure 20: Comportement de différentes dilutions de bactériophages recombinants exprimant le **ScFV anti-bêta FSH bovine (clone IID 9)** vis à vis des protéines adsorbées (LH, FSH, ovalbumine et protéines de réovirus) dans les puits à ELISA (1: bactériophages non dilués; 2: dilution 1: 5; 3: dilution 1:25 4: dilution 1: 625; 5: dilution 1: 15625; 6: dilution 1: 390625).

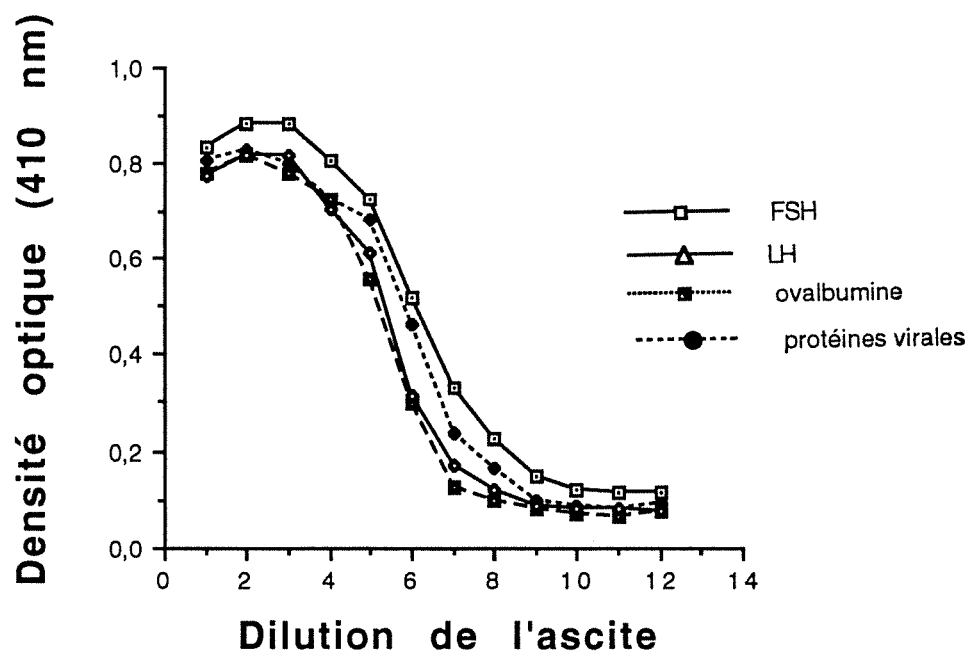


Figure 21: Comportement de différentes dilutions d'ascite contenant un anticorps monoclonal anti-bêta FSH vis à vis des protéines adsorbées (LH, FSH, ovalbumine et protéines de réovirus) dans les puits à ELISA (1: bactériophages non dilués; 2: dilution 1: 5; 3: dilution 1:25 4: dilution 1: 625; 5: dilution 1: 15625; 6: dilution 1: 390625).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Un des objectifs de nos travaux était de produire dans un premier temps trois fragments du rFSH bovin puis les faire coexprimer avec la gp3 du bactériophage M13K07. Ceci avait pour but d'étudier les sites d'interaction du récepteur à l'hormone et d'autre part de générer des bactériophages pouvant reconnaître la FSH. Ces bactériophages qualifiés de recombinants seraient ainsi utilisés dans l'établissement d'un ELISA. Dans un deuxième temps, parallèlement à ce projet, d'autres études visaient à produire un ScFV d'un anticorps monoclonal anti-bêta FSH bovine afin de valider l'approche d'expression de protéines par bactériophages. A l'image des trois fragments du rFSHb, ScFV a été coexprimé avec la gp3. La biologie moléculaire s'est avérée être un outil de choix pour atteindre ces objectifs.

4. 1 LES FRAGMENTS DU rFSH BOVIN

Une étude précédente a révélé l'incapacité d'exprimer l'ensemble du domaine extramembranaire du rFSH bovin car celle-ci s'est avérée être toxique pour le métabolisme bactérien. Considérant ce fait, dans le cadre de notre étude nous avons construit par amplification à partir du rFSH bovin trois fragments correspondant au domaine extramembranaire.

Le domaine extramembranaire du rFSH est impliqué dans la liaison avec la FSH (Sprengel et coll., 1990; Dattatreyamurty et Reichert, 1992; Moyle et coll., 1994). Des travaux ont rapporté les séquences définies de ce domaine du rFSH qui lient spécifiquement la FSH. Il s'agit de la séquence des acides aminés 9-30 codés par l'exon 1 du rFSH bovin (Dattatreyamurty et Reichert, 1992). Récemment, Moyle et coll. (1994) ont suggéré que les séquences des acides aminés codées par les exons 5 et 6

contrôlent la spécificité du rFSH car elles empêcheraient la liaison à l'hCG. En se basant sur ces données, les fragments A1 (348 pb codés par les exons 1, 2, 3 et 4) et B2 (579 pb codés par les exons 4, 5, 6, 7, 8 et 9) en reconnaissant la FSH sont en accord respectivement avec les résultats de Dattatreyaumurty et Reichert (1992) et ceux de Moyle et coll. (1994). En ce qui concerne le fragment C3 (468 pb codés par les exons 9 et 10) qui reconnaît la FSH autant que les fragments A1 et B2 précédents, nous disposons peu d'information sur la fonction de cette région du domaine extramembranaire. En effet, si bon nombre d'auteurs ont décrit l'implication du domaine extramembranaire du rFSH dans la liaison avec son hormone (Sprengel et coll. 1990, Dattatreyaumurty et Reichert, 1992), peu d'études cependant ont été réalisées sur la capacité de liaison des boucles extracellulaires formées par le domaine transmembranaire. Morris et coll. (1993), en utilisant des peptides synthétiques élaborés à l'image des régions du domaine extramembranaire du récepteur de la TSH ont démontré qu'une portion de l'exon 9 se lie à la sous-unité alpha de la TSH et de la LH. De plus, ces auteurs rapportent que le peptide correspondant aux 20 premiers acides aminés codés par l'exon 10 lierait spécifiquement la sous-unité bêta de la FSH. Les domaines transmembranaire et intracytoplasmique, codés par les exons 9 et 10 demeurent essentiels pour qu'il y ait action biologique du fait de leur implication dans l'activation de la protéine G (voir Section 1.2.4).

4. 2 L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-BETA FSH

Les techniques de PCR constituent de nos jours un nouvel outil dans la production des anticorps monoclonaux. A partir des amorces de CDR et de l'ARNm poly A provenant d'un hybridome sécréteur anti-bêta FSH, les chaînes lourde (340 pb) et légère (325 pb) ont été amplifiées puis elles ont été réunies en un ScFV (750 pb). Une construction similaire a été déjà réalisée pour d'autres types d'anticorps (McCafferty et coll., 1990; Whitlow et

Filpula, 1991; Clackson et coll., 1991; Robertson 1992; Chiang, 1992; Clackson et Wells, 1994).

Suite à nos travaux, les bactériophages recombinants obtenus possèdent une ou des protéines-fusion gp3-ScFV anti-bêta FSH. Des auteurs tels McCafferty et coll. (1990), Clackson et coll. (1991), Whitlow et Filpula (1991), Bradbury et coll. (1993), Amberg et coll. (1993), en utilisant le même type d'expression ont obtenus des bactériophages recombinants co-exprimant la gp3 avec d'autres protéines. La protéine-fusion gp3-ScFV de l'anticorps monoclonal anti-bêta FSH en reconnaissant la FSH porcine confirme les résultats de Lussier et coll. (1992) et démontre qu'il est possible d'exprimer le domaine variable des chaînes légères et lourdes d'un anticorps sur une protéine de capsid d'un bactériophage.

4. 3 LE SYSTEME D'EXPRESSION PAR BACTÉRIOPHAGES

Le nombre de panning est important à considérer car il influe sur la quantité et l'affinité des bactériophages recombinants sélectionnés, la corrélation est positive (Amberg et coll., 1993; Fischer et coll., 1994). Pour procéder à cette sélection par panning, de la FSH porcine purifiée a été utilisée. Si la provenance de la FSH est peu importante puisque l'homologie est élevée entre les espèces, son degré de pureté l'est par contre pour le panning et les études de liaison. En effet, nous n'avons pu sélectionner aucun bactériophage recombinant lorsque nous avons effectué le panning avec la préparation commerciale Ovaset (Schering; Canada) tel quel c'est-à-dire non purifiée au préalable.

Les bactériophages recombinants produits dans notre étude ne sont pas spécifiques à la FSH car ils reconnaissent par la méthode ELISA d'autres protéines tels la LH bovine, l'ovalbumine de poule et des protéines du réovirus aviaire souche vaccinale S1133.

De même, l'anticorps monoclonal anti-bêta FSH contenu dans le liquide d'ascite reconnaît ces mêmes protéines bien que son affinité pour la FSH soit plus élevée. En considérant que l'ascite contient diverses substances (lipides, autres protéines) qui peuvent engendrer des réactions non spécifiques, il n'est pas aisé de comparer les résultats des bactériophages portant le ScFV avec ceux de l'anticorps monoclonal anti-bêta FSH. De plus, ce dernier n'a pas été testé par ELISA.

La cause du manque de spécificité des bactériophages recombinants produits suite à nos travaux n'a pu être élucidée au cours de ce projet de recherche. Cependant, nous émettons l'hypothèse que la méthode d'ELISA utilisée pour les réactions croisées n'est pas adéquate. Il est nécessaire de mettre au point un ELISA sensible et spécifique afin de confirmer ou infirmer notre hypothèse. Nous pensons que les protéines-fusion gp3-A1, gp3-B2, gp3-C3 et gp3-ScFV pourraient se lier de façon non spécifique aux protéines adsorbées telles la LH, l'ovalbumine ou les protéines du réovirus. Les contrôles négatifs effectués à l'aide de M13K07 dépourvu de protéines-fusion se sont révélés négatifs (pas de coloration). Ces observations excluent la possibilité que les protéines formant la capsid du bactériophage (plus particulièrement la gp3 type sauvage) ne se lient aux protéines adsorbées. Nous en concluons que seul le peptide exprimé avec la gp3 pourrait se lier non spécifiquement. Afin de réduire ces liaisons non spécifiques, nous suggérons pour l'ELISA l'utilisation de tampon de lavage plus stringent. Les conditions du tampon à utiliser lors du lavage pourraient s'orienter vers une diminution du pH (soit de 6), une augmentation de la concentration en NaCl ou de détergent (Tween-20). Toutefois, ces conditions de lavage devraient tenir en compte du maintien de l'intégrité des protéines formant les bactériophages. Cette démarche s'avère nécessaire avant de remettre en question le système d'expression utilisé pour produire les bactériophages recombinants car avec ce même système, des bactériophages recombinants spécifiques ont été produits (Clackson et Wells, 1994).

CONCLUSION

La biologie moléculaire plus précisément la technique du PCR et le système d'expression par bactériophages recombinants ont permis de produire séparément deux types de bactériophages M13K07 recombinants. Ces derniers ont eu la particularité d'exprimer des protéines-fusion composées d'une part de gp3 et un des fragments A1, B2 et C3 correspondant au domaine extra membranaire du rFSH bovin et d'autre part, par gp3 et la partie variable (ScFV) d'un anticorps anti-bêta FSH bovin.

Les bactériophages recombinants possédant la protéine-fusion gp3-ScFV anti-bêta FSH ont été capables de lier la FSH. Il en a été de même pour les trois types de bactériophages arborant les protéines-fusion gp3-A1, gp3-B2 et gp3-C3. Cependant, ces types de bactériophages présentent des réactions croisées avec la LH, l'ovalbumine de poule et des protéines du réovirus aviaire (souche vaccinale S1133). Il nous est impossible de définir au terme de ce projet de recherche si ce manque de spécificité est imputable au système d'expression utilisé ou à la méthode ELISA élaborée pour les réactions croisées. D'autres études doivent être menées dans cette perspective.

Le système d'expression par les bactériophages constitue un nouvel outil pour la production des anticorps monoclonaux. Il pourrait être utilisé pour exprimer d'autres protéines à l'image des fragments du rFSH bovin néanmoins il faudrait étudier la spécificité des bactériophages recombinants produits.

Annexe 1

Infection des bactéries transformées par M13K07

- Dans un tube de culture stérile 17 x 100 mm, ajouter 200µl de 2XYT, 2µl d'ampicilline ayant une concentration de 50mg/ml et 37µl de glucose 2M.
- Ajouter dans ce tube 800µl de bactéries *E. coli* TG1 transformées par le pCantab recombinant. Incuber à 37 °C pendant 3 heures avec une agitation de 250rpm.
- Ajouter $2,5 \times 10^9$ pfu de **M13K07** et incuber à 37°C dans un premier temps avec une agitation de 150rpm pendant 30min puis dans un deuxième temps à 250rpm pendant 30min.
- Transférer l'échantillon dans un tube eppendorf stérile de 1.5ml et centrifuger pendant 10min à 800g. Enlever délicatement le surnageant.
- Le culot bactérien est remis en suspension avec 1ml de 2X YT contenant 1µl d'ampicilline à une concentration de 50mg/ml et 0,5µl de kanamycine à une concentration 50mg/ml (pas de glucose). Ajouter 4ml de cette même solution dans un tube de culture 17 x 100mm stérile puis y rajouter l'échantillon remis en suspension précédemment.
- Incuber le tube de culture toute la nuit à 37°C avec une agitation de 250rpm. Par la suite, le tube est centrifugé à 1000g (GPR centrifuge; Beckman) pendant 10min. Transférer le surnageant contenant les bactériophages recombinants dans un tube de culture 17 x 100mm stérile. Ces bactériophages recombinants peuvent être immédiatement sélectionnés par panning, si tel n'est pas le cas, le surnageant est conservé à 4°C en vue d'un panning ultérieur.

Annexe 2

Précipitation au polyéthylène glycol (PEG)

Solution de PEG/NaCl: dissoudre en chauffant 200g de polyéthylène glycol 6000 et 146,1g de NaCl dans 1 litre d'eau distillée puis autoclaver.

- Ajouter au surnageant contenant les bactériophages recombinants 1/5 de leur volume en solution de PEG/NaCl, mélanger et placer sur de la glace pendant 30 à 60min.
- Centrifuger pendant 20min à 10,000g (Beckman; rotor JA-20). Enlever le surnageant, égoutter les tubes en les inversant sur du papier absorbant.
- A raison de 1/100 du volume initial utilisé de surnageant de bactériophages de tampon stérile TE (10mM Tris-Hcl, pH 8 et 1mM EDTA), remettre en solution le culot de bactériophages. Par la suite, la solution obtenue est stérilisée par un filtre de 0,45 μ m. Elle peut être conservée à 4°C pendant plusieurs mois.

Annexe 3

Infection de *E. coli* TG1 par les bactériophages recombinants sélectionnés.

- Afin d'obtenir des bactéries en phase logarithmique de croissance, mettre en culture dans 5ml de 2X YT une colonie de *E. coli* TG1 (non compétente) ayant poussé sur milieu minimum. Incuber à 37°C à une agitation de 250rpm pendant 3 heures, la culture doit être trouble avec une densité optique à 600nm comprise entre 0.5 et 0.7.
- En utilisant du 2X YT, préparer séparément dans des tubes de microcentrifugation quatre dilutions (non dilué, 1:10, 1:100, 1:1000) à partir des bactériophages recombinants sélectionnés par panning.
- Ajouter à chaque dilution de bactériophages recombinants 200µl de bactéries en phase logarithmique de croissance puis incuber à 37°C pendant 30min avec une agitation de 150rpm.
- Ensemencer chaque tube de microcentrifugation dans un pétri contenant du milieu SOBAG agar, incuber toute la nuit à 30°C. Si après ce délai les colonies sont petites, laisser incuber encore 4 à 8 heures.
- Dans une plaque de 96 puits, ajouter dans chaque puits 100µl de 2XYT contenant 1µl d'ampicilline (50mg/ml) et 2% de glucose. Transférer à l'aide de cure dent stérile une colonie bactérienne par puits. Cette plaque dénommée plaque maîtresse est incubée à 30°C pendant toute la nuit avec une agitation de 100 à 150rpm.
- Pour chaque plaque maîtresse, préparer une solution de 21ml de 2X YT contenant 4µl d'ampicilline (50mg/ml), 2% de glucose et $1,05 \times 10^{10}$ pfu de M13K07. Dans une seconde plaque de 96 puits (ayant de préférence un fond en "V") mettre 200µl/puits de cette solution
- Dans cette nouvelle plaque, transférer à chaque puits 20µl du milieu de culture de la plaque maîtresse. Cette dernière peut être à présent recouverte de parafilm et gardée à 4°C pour plus de deux semaines.

- Incuber la seconde plaque pendant 2 heures à 37°C avec une agitation d'environ 150rpm (les cultures doivent être troubles).
- Centrifuger la plaque à 400g pendant 10min à 4°C (GPR Centrifuge; Beckman) puis enlever avec précaution le surnageant. Il est possible aussi de transférer le contenu de chaque puits dans un tube de microcentrifugation, par la suite, les tubes peuvent être centrifuger à 800g pendant 10min dans une microcentrifugeuse.
- Préparer une solution de 21ml de 2X YT contenant 4μl d'ampicilline (50mg/ml), 2μl de kanamycine (50mg/ml). Transférer à la plaque précédente 200μl/puits de cette solution et incuber toute la nuit à 37°C avec une agitation de 150rpm.
- Centrifuger la plaque dans les mêmes conditions que précédemment. Les surnageants contenant les bactériophages recombinants sont recueillis et serviront à l'ELISA.

Annexe 4

ELISA

Matériel:

Tampon bicarbonate pH 9,6 (1 litre): 15mM Na_2CO_3 , 34mM NaHCO_3 , 0,3mM NaN_3 . Conserver à 4°C, la solution ne doit pas être utilisée au delà de 2 semaines.

Tampon phosphate pH 7,4 (1 litre): 0,13mM NaCl , 2,6mM KCl , 10mM Na_2HPO_4 , 1,7mM KH_2PO_4 .

Tampon de blocage: 2% de lait écrémé dans du tampon phosphate pH 7,4.

Tampon de lavage : 0,05% Tween 20 dans du tampon phosphate pH 7,4 (préparation extemporanée).

Solution 1x de ABTS (500ml): 450ml d'acide citrique 0,05M pH 4 et 100mg de ABTS 2', 2' azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diamonium
fourni par la trousse Detection module / Recombinant Phage Antibody system (RPAS; Pharmacia).

FSH porcine purifiée par chromatographie d'immunoaffinité (Lussier et coll., 1992) et diluée dans du tampon bicarbonate pH 9,6 à une concentration de 20ng/ml.

Fournis par la trousse Detection module/RPAS:

- Antigène et bactériophages du contrôle positif.
- Conjugué HRP/Anti-M13.

Protocole:

- Dans une plaque de 96 puits, ajouter 200µl/puits de FSH porcine 20ng/ml (soit 4ng de FSH porcine/puits) et pour le contrôle positif, 100µl d'antigène contrôle. Laisser adsorber à 37°C durant toute la nuit.
- Après le temps d'incubation, inverser la plaque afin de vider son contenu, bien égoutter sur un papier absorbant. Par la suite, ajouter dans chaque puits 200µl de tampon de blocage et incuber à 37°C de 30min à 1 heure.
- Diluer à volume égal, 100µl de surnageant contenant les bactériophages recombinants avec du tampon de blocage. Le contrôle négatif est constitué par M13K07 dépourvu d'insert. Laisser incuber à la température de la pièce pendant 15 à 30min.
- Vider la plaque de 96 puits et égoutter sur du papier absorbant le restant du tampon de blocage. Transférer les échantillons constitués par les bactériophages dilués précédemment et 100µl de bactériophage contrôle non dilué. Incuber à 37°C pendant 2 heures.
- Laver trois fois les puits de la plaque d'ELISA avec du tampon de lavage. Bien égoutter la plaque après le dernier lavage sur du papier absorbant afin d'éliminer le tampon de lavage résiduel.
- Diluer à 1:5000 le conjugué HRP/Anti-M13 dans le tampon de blocage (soit 1µl de conjugué HRP/Anti-M13 pour 5ml de tampon de blocage), environ 20ml sont requis pour une plaque de 96 puits.
- Ajouter 200µl de conjugué HRP/Anti-M13 par puits, incuber à 37°C pendant 1 heure. Par la suite, laver quatre fois la plaque dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment
- Préparer le substrat en ajoutant 36µl de peroxyde d'hydrogène 30% (H₂O₂) à 21ml de solution ABTS 1X. Transférer 200µl de cette solution par puits et incuber de 20 à 60min à la température de la pièce.
- L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 410nm.

Annexe 5

ELISA (Source: Silversides, 1986)

Matériel:

Tampon bicarbonate pH 9,6 (1 litre): 15mM Na_2CO_3 , 34mM NaHCO_3 , 0,3mM NaN_3 . Conserver à 4°C, la solution ne doit pas être utilisée au delà de 2 semaines.

Tampon phosphate pH 7,4 (1 litre): 0,13mM NaCl , 2,6mM KCl , 10mM Na_2HPO_4 , 1,7mM KH_2PO_4

Tampon phosphate + Tween: 0,05% Tween 20 dans du tampon phosphate pH 7,4 (préparation extemporanée).

FSH porcine purifiée par chromathographie d'immunoaffinité (Lussier et coll., 1992) et diluée dans du tampon bicarbonate pH 9,6 à une concentration de 20ng/ml.

Tampon de diethanolamine 10%, pH 9.8 (1 litre): 97ml diéthanolamine, 0,4mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3mM NaN_3 . Conserver la solution à 4°C.

Solution du substrat p-Nitrophényl phosphate (préparation extemporanée): dissoudre 5mg de p-nitrophényl phosphate (Sigma 104 phosphate substrate) dans 5ml de diethanolamine 10%, soit une concentration finale de 1mg/ml. Conserver à l'abri de la lumière.

Protocole:

- Dans une plaque de 96 puits, mettre 200µl/puits de FSH porcine 20ng/ml (soit 4ng de FSH porcine/puits). Laisser adsorber à 37°C durant toute la nuit.
- Vider la plaque et laver cinq fois avec le tampon phosphate + Tween. Ajouter 100µl des solutions à tester dans les puits et

incuber pendant une heure à 37°C ou 2 heures à la température de la pièce.

- Préparer la dilution appropriée du second anticorps couplé à la phosphatase (anticorps de chèvre anti-souris 1:6000, Gibco-BRL) avec le tampon phosphate + Tween.
- Décanter et laver cinq fois la plaque avec du tampon phosphate + Tween puis ajouter 100µl de second anticorps par puits. Incuber 1 heure à 37°C ou 2 heures à la température de la pièce.
- Préparer la solution de substrat. Rajouter 100µl/puits après laver et décanter cinq fois la plaque. Incuber la plaque à l'abri de la lumière pendant 30 à 60min.
- La densité optique est lue au spectrophotomètre à 410nm.

Annexe 6

Milieu Minimun

Faire 500 ml d'une solution 84mM Na_2HPO_4 , 44mM KH_2PO_4 et 37.4mM NH_4Cl . Ajuster le pH à 7,4 avec du NaOH puis autoclaver la solution.

Dans une bouteille d'un litre, dissoudre 15g de Bacto-agar dans de l'eau distillée, ajuster le volume final à 500ml puis autoclaver.

Suite à l'autoclavage, laisser refroidir les deux solutions jusqu'à ce que la température atteigne 55°C puis combiner les deux solutions. Ajouter:

1ml 1M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1ml 1M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1ml 1M thiamine hydrochloride

5ml 20% glucose

Couler immédiatement dans des Pétri.

BIBLIOGRAPHIE

Abbas, A.K., A.H. Lichtman, J.S. Pober. 1991. Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Compagny.

Adashi, E.Y., C.E. Resnick, E.R. Hernandez, J.V. May, M. Knecht, M.E. Svoboda, J.J. Van WYK. 1988. IGF-I as an amplifier of FSH action: studies on mechanisms and sites of action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **122**: 1583-1591.

Akbar, A.M., L.E. Reichert, T.G. Dunn, C.C. Kaltenbach et G.D. Niswender. 1974. Serum levels of follicle-stimulating hormone during the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.* **39**: 360.

Amberg, J., H. Hogrefe, A. Lovejoy, B. Hay, B. Shopes, S.R. Mullinax, J.A. Sorge. 1993 SurfZAP vector: linking phenotype to genotype for phagemid display libraries. *Strategies in molecular biology. Analects* **6**: 2-4.

Andersen T.T., L.E. Reichert Jr. 1982. Follicotropin binding to receptors in testis, modulation by monovalent salts and divalent cations. *J. Biol. Chem.* **257**: 11551-11557.

Andersen, T.T., Sluss, P.M., Quirk, S.M., Krystek, S.R., Reichert Jr., L.E. 1987. Inhibition of 125 hFSH binding to receptor by synthetic peptide fragments of human FSH- β subunit. *SSR Biol. Reprod.* **36** (suppl. 1): 125.

Ascoli, M., D.L. Segaloff. 1989. On the structure of the LH/CG receptor. *Endocr. Rev.* **10**: 27-44.

Attardi, B., Keeping, H.S., Winters, S.J., Kotsuji, F., Maurer, R.A., Troen, P. 1989. Rapid and profound suppression of messenger ribonucleic acid encoding Follicle-Stimulating

Hormone beta by inhibin from primate Sertoli cells. *Molecular Endocrinology* **3**: 280-287.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E., Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. 1994. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing associates Inc and John Wiley and sons Inc.

Austin, C.R., R.V. Short. 1984. Reproduction in mammals second edition Book 3 Hormonal control of reproduction. Cambridge University Press.

Bardin, C.W., C.Y. Cheng, N.A. Mustow, G.L. Gunsalus. 1988. The Sertoli cell. Dans : *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E., Neill, J. eds. Raven-Press.

Baranao, J.L.S., J.M. Hammond. 1984 Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of Porcine granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **124**: 484-490.

Bastings, E., A. Beckers, M. Reznik, J.F. Beckers. 1991. Immunocytochemical evidence for production of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in separate cells in the bovine. *Biol. of Reprod.* **45**: 788-796.

Beauvillain, J.C., G. Tramu, M.P. Dubois. 1975. Characterization by different techniques of adrenocorticotropin and gonadotropin producing cells in Lerot pituitary (*Elomys quercinus*): a superimposition technique and a immunocytochemical technique. *Cell. Tissue Res.* **158**: 301-317.

Berman, M.I., M.B. Anand-Srivastava, M.R. Sairam. 1985. Characterization of gonadotropin-sensitive adenylate cyclase activity in human testis: uncoupling of receptor-cyclase complex by specific hormonal antagonist. *Mol. Cell. Endocrinol.* **42**: 49-57.

Bhatnagar, A.S., Batzl, C., Hausler, A., Nogués, N. 1993. The role of estrogen in the feedback regulation of follicle-Stimulating Hormone secretion in the female rat. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **47**: 161-166.

Bolt, D.J., R. Rollins. 1983. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. *J. Anim. Sci.* **56**: 146-154.

Boulain, J.P, F. Ducancel, D. Gillet, A. Menez. 1993. De nouveaux anticorps pour les analyses médicales. *La Recherche* **251**: 205-207.

Bousfield, G.R, W.K. Liu, H. Sugino, D.N. Hard. 1987. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine lutropin beta-subunit. *J. Biol. Chem.* **262**: 8610-8620.

Bousfield, G.R., W.M. Perry, D.N. Ward. 1994. Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. Dans: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E., Neill, DJ. eds. Raven Press. Vol 1, pp: 1749-1792.

Braat, D.D.M. 1993. Multiple follicular growth under pulsatile Gonatropin Releasing Hormone stimulation. *Human Reproduction* **8** (suppl. 2): 189-192.

Bradbury, A., L. Persic, T. Werge, A. Cattaneo. 1993. Use of living columns to select specific phage antibodies. *Bio/technology* **11**: 1565-1569.

Braun, T., P.R. Shofield, R. Sprengel. 1991. Aminoterminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J* **10**: 1885-1890.

Calvo, F.O., R.J. Ryan. 1985. Inhibition of adenylyl cyclase activity in rat corpora luteal tissue by glycopeptides of human

chorionic gonadotropin and the alpha subunit of human chorionic gonadotropin. *Biochemistry* **24**: 1953-1959.

Calvo, F.O., H.T. Keutmann, E.R. Bergert, R.J. Ryan. 1986. Deglycosylated human follitropin: characterization and effects on adenosine cyclic 3'5'-phosphate production in porcine granulosa cells. *Biochemistry* **25**: 3938-3943.

Carroll, R.S., Corringan, A.Z., Gharib, S.D., Vale, W.W. Chin. 1989. Inhibin, Activin and follistatin: regulation of Follicle-Stimulating Hormone messenger ribonucleic acid levels. *Molecular Endocrinology* **3**: 1969-1976.

Carroll, R.S., A.Z. Corringan, V. Wyle, W.W. Chin. 1991. Activin stabilizes Follicle-Stimulating Hormone beta messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* **129**: 1721-1726.

Channing, C.P., J.F. Seymour. 1970. Effects of dibutyl cyclic-3',5'-AMP and other agents upon luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology*. **102**: 930-937.

Channing, C.P., C.N. Sakai, O.P. Bahl. 1978. Role of the carbohydrate residues of hCG in binding and stimulation of adenosine 3'-5'-monophosphate accumulation by porcine granulosa cells. *Endocrinology* **103**: 341.

Chappel, S.C., A. Ulloa-Aguirre, C. Coutifaris. 1983. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocri. Rev.* **4**: 179-211.

Chiang, Y.L. 1992. Direct complementary DNA cloning and screening of mutants using polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology* **216**: 73-81.

Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

Chopineau, M. 1993. Caractérisation immunologique, fonctionnelle et biochimique de sites d'interaction de la gonadotropine chorioïque équine (eCG/PMSG) avec les récepteurs LH et FSH. Thèse doctorat Sciences biologiques Université de Rennes.

Clackson, T., H.R. Hoogenboom, A.D. Griffiths, G. Winter. 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature.* **352**: 624-628.

Clackson, T., J.A. Wells. 1994. In vitro selection from protein and peptide libraries. *Trends in Biotechnology* **12**: 173-184.

Clayton, R.N. 1993. Regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Human Reproduction* **8** (suppl.2): 29-36.

Closset, J., A. Gothot, B. Sente. 1989. Pituitary hormone dependent expression of insulin-like growth factors I and II in the immature hypophysectomized rat testis. *Mol. Cell Endocrinol.* **3**: 1125-1131.

Combarnous, Y. 1992. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrine Reviews* **13**: 670-691.

Counis, R., N. Bouamoud, Y. Lerrant, A. Starzec, M. Moumni, M.L. Kottler, G. Garrel, A. Berault, F. Bergametti. 1993. Données récentes sur le récepteur de la gonadolibérine et les mécanismes de contrôle par le neuropeptide de l'expression des gènes des hormones gonadotropes. *Contracept. Fertil. Sex.* **21**: 773-779.

Crissman, J.W., G.P. Smith. 1984. Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology* **132**: 445-455.

Culler, M., A. Negro-Vilar. 1986. Evidence that pulsatile Follicle-stimulating Hormone secretion is independent of endogenous Luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* **118**: 609-612.

Cupps, P.T. 1991. Reproduction in domestic animals Fourth edition. Academic Press Inc.

Cwirla, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett, W.J. Dower. 1990. Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 6378-6382.

Dahl, K.D., T.A. Bicsak, A.J.H. Hsueh. 1988. Naturally occurring antihormones: secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog. *Science* **239**: 72-74.

Dalkin, A.C. S.J. Paul, D.J. Haisenleder, G.A. Ortolano, M. Yasin, J.C. Marshall. 1992. Gonadal steroids effects similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J. Endocrinol.* **132**: 39-45.

Dattatreya Murty, B., L.E Reichert Jr. 1992. A synthetic peptide corresponding to amino acids 9-30 of the extracellular domain of the follitropin (FSH) receptor specifically binds FSH. *Molecular and Cellular Endocrinology* **87**: 9-17.

Dattatreya Murty, B., L.E Reichert Jr. 1993. Identification of regions of follitropin (FSH) beta subunit that interact with the N-terminus region (residues 9-30) of the FSH receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* **93**: 39-46.

Denef, C. 1986. Paracrine interactions in the anterior pituitary. *Clin. Endocrinol. Metab.* **15**: 1-32.

Devlin, J., L.C. Panganiban, P.E. Devlin. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* **249**: 404-406.

Dias, J.A., L.E Jr. Reichert. 1984. Evidence for a high molecular weight follicle stimulating hormone binding inhibitor in bovine testis. *Biol. Reprod.* **31**: 975-983.

Dobson, H. 1978. Radioimmunoassay of FSH in plasma of post-partum dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* **52**: 45.

Dobson, R.E., P Lin, O.K. Park, J.C. Dykema, K.E. Mayo 1992. Regulation of ovarian inhibin and activin gene expression by gonadotropins. Dans: *Follicle Stimulating Hormone*. Hunzicker-Dunn, M., Schwartz, NB. eds. Springer-Verlag. pp: 167-177.

Dohlman, H.G., J. Thoner, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz. 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Ann. Rev. Biochem.* **60**: 653-688.

Dorrington, J., D. Armstrong. 1979. Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Prog. Horm. Res.* **35**: 1-42.

Dumont, A.M. 1990. Les dAbs: la fin des hybridomes? *Biofutur* janvier 40-41.

Erickson G.F., K.J. Ryan. 1975. The effect of LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP, and prostaglandins on the production of oestrogens by rabbit granulosa cells in vitro. *Endocrinology* **97**: 108-117.

Ey, P.L., S.J. Prowse, C.R. Jenkin. 1978 Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* **15**: 429-436.

- Farrel R.E., 1993.** RNA methodologies. A laboratory guide for isolation guide and characterization Academic Press, New-York.
- Findlay, J.K. 1993.** An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* **48**: 15-23.
- Fischer,P., S.J.C. Leu, Y. Y. Yang, P.P. Chen 1994.** Rapid simultaneous screening for DNA integrity and antigen specificity of clones selected by phage display. *Benchmarks* **16**: 829-830.
- Flores, J.A., J.D. Veldhuis, D.A. Leong. 1990.** Follicle-stimulating hormone evokes an increase in intracellular free calcium ion concentration in single ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology.* **127**: 3172-3179.
- Flores, J.A., D.A. Leong, J.D. Veldhuis. 1992.** Is the calcium signal induced by follicle-stimulating hormone in swine granulosa cells mediated by adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Endocrinology.* **130**: 1862-1866.
- Flores, A.J., J.D. Veldhuis. 1993.** Single cell studies of the calcium second messenger signaling pathway in ovarian granulosa cells. Dans: *The ovary* Adashi E. Y., PCK. Leung. eds. Raven Press. pp. 129-146.
- Frazier, A.L., L.S. Robbins, P.J. Stak, R. Sprengel, D.L. Segaloff, R.D. Cone. 1990.** Isolation of TSH and LH/CG receptor cDNAs from human thyroid: regulation by tissue specific splicing. *Mol. Endocrinol.* **4**: 1264-1276.
- Fujinaga, H., M. Yamoto, R. Nakano, K. Shima. 1992 a.** Epidermal Growth Factor bindings sites in porcine granulosa cells and their regulation by Follicle-Stimulating Hormone. *Biol. Reprod.* **46**: 705-709.

Fujinaga, H., M. Yamoto, T. Shikone, K. Nishimari, R. Nakano. 1992 b. Regulation of Epidermal Growth Factor (EGF) binding sites in rat granulosa cells by Follicle-Stimulating Hormone. Dans: *Follicle Stimulating Hormone*. Hunzicker-Dunn, M., Schwartz, NB., eds. Springer-Verlag. pp: 351-355.

Galway, A.B., P.S. LaPolt, A. Tafriri, C.M. Dargan, I. Boime, A.J.W. Hsueh. 1990. Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rat. *Endocrinology* **127**: 3023-3028.

Galway, A.B., P.S. LaPolt, I. Boime, A.J.W. Hsueh. 1992. Recombinant FSH and regulation of ovulation. Dans: *Follicle Stimulating Hormone*. Hunziker-Dunn, M., Schwartz, NB. eds. Springer-Verlag. pp: 206-214.

Garde, S.V., A. Sheth. 1992. Prostate, an extrapituitary source of Follicle-Stimulating Hormone. Dans: *Follicle-Stimulating Hormone*. Hunzicker-Dunn, M., Schwartz, NB., eds. Springer-Verlag. pp: 323-329.

Garde, S.V., A.R. Sheth, R. Joseph, C.J. Panchel, R.F. Chinoy, N.A. Sheth. 1993. Occurrence and de novo biosynthesis of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in benign and malignant conditions of human breast. *Cancer Letters* **75**: 1-9.

Gharib, S.D., M.E. Wierman, M.A. Shupnick, W.W. Chin. 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr. Rev.* **11**: 177-199.

Godine, J.E., W.W. Chin, J.F. Habener. 1980. Luteinizing and Follicle-Stimulating Hormone cell-free translations of messenger RNAs coding for subunit precursors. *J. Biol. Chem.* **255**: 8780-8783.

Goldsmith, M., W. Konigsberg. 1977. Adsorption protein of the bacteriophage Fd: isolation, molecular properties, and location in the virus. *Biochemistry* **16**: 2686-2694.

Goodman, R.L., F.J. Karsch. 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology* **107**: 1286-1291.

Gorczyńska, E., D. Handelsman. 1991. The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 23739-23744.

Gram, H., L.A. Marconi, C.F. Barbas III, T.A. Collet, R.A. Lerner, A.S. Kang. 1992. In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 3576-3580.

Grant, R.A., T.C. Ling, W. Koningberg, R.E. Webster. 1981. Structure of the filamentous bacteriophage fl location of the A, C, and D minor coat proteins. *J. Biol. Chem* **256**: 539-546.

Grasso, P., L.E. Jr. Reichert. 1990. Follicle stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{++}$ by cultured rat Sertoli cells does not require activation of cholera toxin-or pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins or adenylate cyclase. *Endocrinology*. **127**: 949-956.

Grasso, P., T.A. Santa-Coloma, L.E. Jr. Reichert. 1991. Synthetic peptides corresponding to human follicle-stimulating hormone (hFSH)- β -(1-15) and hFSH- β -(51-65) induce uptake of $^{45}\text{Ca}^{++}$ by liposomes: evidence for calcium-conducting transmembrane channel formation. *Endocrinology*. **128**: 2745-2751.

Gromoll, J., B. Dankbar, R.S. Sharma, E. Nieschlag. 1993. Molecular cloning of testicular follicle stimulating Hormone

receptor of the non human primate *Macaca fascicularis* and identification of multiple transcripts in the testis. Biochem. Biophys. Research communications **196**: 1066-1072.

Guzman, K., C.D. Miller, C.L. Phillips, W.L. Miller. 1991. The gene encoding ovine follicle-stimulating hormone beta: isolation, Characterization and comparaisn to a related ovine genomic sequence. DNA Cell. Biol. **10**: 593-601.

Haisenleder, D.J., G.A. Ortolano, A.C. Dalkin, T.R. Ellis, S.J. Paul, J.C. Marshall. 1990. Differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by Gonadotropin Releasing Hormone pulse amplitude in female, rats. Endocrinology **127**: 2869-2875.

Haisenleder, D.J., A.C. Dalkin, J.C. Marshall. 1994. Regulation of gonadotropin gene expression. Dans: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E., Neill, DJ. eds. Raven Press. Vol 1, pp: 1793-1813.

Hammond M.J., J.S. Mondschein, S.E. Samaras, R.W. Grimes, K.J. Leighton, S.F. Canning, D.R. Hagen. 1992. Insulin-like Growth Factors and their binding proteins: ovarian modulators of FSH action. Dans: *Follicle Stimulating Hormone*. Hunzicker-Dunn, M., Schwartz, NB. eds. Springer-Verlag. pp: 191-198.

Hara K., P. Rathnam, B.B. Saxena. 1978. Structure of the carbohydrate moities of the alpha subunits of human follitropin, lutropin and thyrotropin. J. Biol. Chem. **253**: 1582.

Harlow, E., D. Lane. 1988. Antibodies, a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory.

Heckert, L., M.D. Griswold. 1992. The changing functions of Follicle-Stimulating Hormone in the testis of prenatal, newborn,

immature, and adult rats. Dans: *Follicle-Stimulating Hormone*. Hunzicker-Dunn, M., Schwartz, NB., eds. Springer-Verlag. pp: 237-245.

Heckert, L., I.J. Daley, M.D. Griswold. 1992. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Molecular Endocrinology* **6**: 70-80.

Hiatt, A., R. Cafferkey, K. Bowdish. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**: 76-78.

Hiatt, A. 1990. Antibodies produced in plants. *Nature* **344**: 469-470.

Hoogenboom, H.R., A.D. Griffiths, K.S. Johnson, D.J. Chiswell, P. Hudson, G. Winter. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* **19**: 4133-4137.

Huse, W.D., L. Sastry, S.A Iverson, A.S. Kang, M. Alting-Mees, D.R. Burton, S.J. Benkovic, R.A. Lerner. 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* **246**: 1275-1281.

Houde, A., A. Lambert, J. Saumande, D.W. Silversides, J.G. Lussier. 1994. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary cDNA and expression in bovine tissues. *Mol. Reprod. Develop.* **39** (sous presse).

Hunzicker-Dunn, M., A.R. LaBarbera. 1986. Unique properties of the Follicle-Stimulating Hormone and Cholera toxin-sensitive adenylyl cyclase of immature granulosa cells. *Endocrinology* **118**: 302-311.

Jameson, J.L., C.B. Becker, C.M. Lindell, J.F. Habener. 1988. Human follicle-stimulating hormone subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol* **2**: 806-815.

Jazwinski, M., R. Marco, A. Kornberg. 1973. A coat protein of the bacteriophage M13 virion participates in membrane oriented synthesis of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 205-209.

Jonassen, J.A., J.S. Richards. 1980. Granulosa cell desensitization: effects of gonadotropins on antral and preantral follicles. *Endocrinology* **106**: 1786-1794.

Karsch, F.J., J.T. Cummins, G.B. Thomas, I.J. Clarke. 1987. Steroids feed-back inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol. Reprod.* **36**: 1207-1212.

Keutmann, H.T., P.J. McIlroy, R.E. Bergert, R.J. Ryan. 1983. Chemically deglycosylated human chorionic gonadotrophin subunits: characterization and biological properties. *Biochemistry.* **22**: 3067-3072.

Kiesel, L. 1993. Molecular mechanisms of Gonadotropin Releasing Hormone stimulated gonadotropin secretion. *Human Reproduction* **8** (suppl. 2): 23-28.

Kilgour, R.J., M. Courot, C. Pisselet, M.P. Dubois, M.R. Sairam. 1994. Inhibition of FSH but not LH affects spermatogenesis in the mature ram. *Animal Reproduction Science* **34**: 253-264.

Kim, I.C., J.V. May, D.W. Schomberg. 1987. The potential mechanism by which human transforming growth factor β (hTGF- β) modulates FSH induced differentiation of cultured rat granulosa cells (GC). *SSR Biol. Reprod.* **36** (suppl.1): 125.

Kliesh, S., T.L. Penttillä, J. Gromoll, P.T.K. Saunders, E. Nieschalag, M. Parvinen. 1992. FSH receptor mRNA is expressed stage-dependently during rat spermatogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* **84**: R45-R49.

Knecht, M., T. Ranta, K.J. Catt. 1983a. Granulosa cell differentiation in vitro: induction and maintenance of Follicle-stimulating hormone receptors by adenosine 3', 5' monophosphate. *Endocrinology* **113**: 949-956.

Knecht, M., T. Ranta, S.Z. Katz, K.J. Catt. 1983b. Regulation of adenylate cyclase activity by Follicle-stimulating hormone and a gonadotropin-releasing hormone agonist in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **112**: 1247-1255.

Kölher, G., C. Milstein. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.

Koo B., Y.I. Ji, R.G. Slaughter. 1991. Structure of the luteinizing hormone receptor gene and multiple exons of the coding sequence. *Endocrinology.* **128**: 2297-2308.

LaBarbera, A.R, R.J. Ryan. 1981. Porcine granulosa cells in suspension culture. I. Follicle-Stimulating Hormone induction of human chorionic gonadotropin binding sites on cells from small follicles. *Endocrinology* **108**: 1561-1570.

LaBarbera, A.R. 1994. Follicle-Stimulating Hormone (FSH) increases FSH receptor messenger ribonucleic acid while decreasing FSH binding in cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* **134**: 411-417.

LaPolt, P.S., M. Oikawa, X.C. Jia, C. Dargan, A.J.W. Hsueh. 1990. Gonadotropin-induced up and down regulation of rat ovarian

LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. *Endocrinology* **126**: 3277-3279.

LaPolt, P.S., J.L. Tilly, T. Aihara, K. Nishimori, A.J.W. Hsueh. 1992. Gonadotropin-induced up- and down-regulation of ovarian follicle-stimulating hormone receptor gene expression in immature rats: effects of pregnant mare's serum gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and recombinant FSH. *Endocrinology*. **130**: 1289-1295.

Lambert, A. 1993. Caractérisation partielle du récepteur à l'hormone folliculo-stimulante bovine. Mémoire de maîtrise en anatomie et physiologie vétérinaire, Faculté vétérinaire de l'Université de Montréal.

Lee, C.Y., H. Takahashi. 1977. Follicle-Stimulating Hormone receptors in rat ovaries: decrease in numbers of binding sites associated with luteinization. *Endocrinology* **101**: 869-875.

Lee, V.W.K., J. McMaster, H. Quigg, J. Findlay, L. Leversha. 1981. Ovarian and peripheral blood inhibin concentration increase with gonadotropin treatment in immature rats. *Endocrinology* **108**: 2403-2405.

Legros, Y., T. Soussi. 1993. Du monoclonal au coliclonal: une approche prometteuse. *Biofutur* **122**: 12-18.

Lin, T.C., R.E. Webster, W. Konigsberg. 1980. Isolation and characterization of the C and D proteins coded by gene IX and gene VI in the filamentous bacteriophages fl and fd. *J. Biol. Chem.* **255**: 10331-10337.

Ling, N., S.Y. Ying, N. Ueno, S. Shimasaki, F. Esch, M. Hotta, R. Guillemín. 1986. A homodimer of subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle-stimulating hormone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **138**: 1129-1137.

Linder, M., A. Gilman. 1992. Les protéines G. Pour la Science. **179**: 60-67.

Lipinski, M., L. Herzenberg. 1981. Les hybridomes et leurs applications. La Recherche **125**: 952-961

Liu, W.K., J.D. Young, D.N. Ward. 1984. Deglycosylated ovine lutropin: preparation and characterization by in vitro binding and steroidogenesis. Mol. Cell. Endocrinol. **37**: 29-39.

Lopez, J., R. Webster. 1983. Morphogenesis of filamentous bacteriophage f1: orientation of extrusion and production of polyphage. Virology **127**: 177-193.

LLoyd, J.M., G.W. Childs. 1988. Differential storage and release of luteinizing hormone and follicle-releasing hormone from individual gonadotropes separated by centrifugal elutriation. Endocrinology **122**: 1282-1290.

Luderer, U., N.B. Schwartz. 1992. An overview of FSH regulation and action. Dans: *Follicle Stimulating Hormone*. Hunzicker-Dunn, M., Schwartz, NB. eds. Springer-Verlag. pp. 1-25.

Lussier, J.G., C.E. Lindsell, M.C. Maurel. 1992. Monoclonal antibody against a highly conserved epitope of beta-FSH: Application in immunoaffinity chromatography, immunohistochemistry and ELISA. Biol. Reprod. **46** (suppl. 1): 160.

Lussier, J.G., T.D. Carruthers, B.D. Murphy. 1993. Effects of bovine follicular fluid and partially purified bovine inhibin on FSH and LH release by bovine pituitary cells in culture. Reprod. Nutr. Dev. **33**: 109-119.

Manns, J.G., G.D. Niswender, T. Braden. 1984. FSH receptor in the bovine corpus luteum. Theriogenology **22**: 321-328.

- Marco, R., S.M. Jazwinski, A. Kornberg.** 1974. Binding, eclipse and penetration of the filamentous bacteriophage M13 in intact and disrupted cells. *Virology* **62**: 209-233.
- Marks, J.D., A.D. Griffiths, M. Malmqvist, T.P. Clackson, J.M. Bye, G. Winter.** 1992. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Bio/technology* **10**: 779-783.
- Matteri, R.L., H. Papkoff.** 1987. Isoforms of equine Follicle-Stimulating Hormone. *SSR Biol. Reprod.* **36** (suppl. 1): 118.
- Matzuk, M.M, J.L. Keene, I. Boime.** 1989. Site specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal traduction. *J. Biol. Chem.* **264**: 2409-2414.
- Maxson, W.S., A.F. Haney, D.W. Schomberg.** 1985. Steroidogenesis in porcine atretic follicles: loss of aromatase activity in isolated granulosa and theca. *Biol. Reprod.* **33**: 495-501.
- McCafferty, J., A.D. Griffiths, G. Winter, D.J. Chiswell.** 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-554.
- McFarland, K.C., R. Sprengel, H.S. Phillips, M. Kohler, N. Rosemblit, K. Kikolics, D.L. Segaloff, P.H. Seeburg.** 1989. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* **245**: 494-499.
- McKinney, M., A. Parkinson.** 1987. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Methods* **96**: 271-278.

Means, A.R., J.L. Fakunding, C. Huckins, D.J. Tindall, R. Vital. 1976. Follicle-Stimulating hormone, the Sertoli cell and spermatogenesis. *Recent Prog Hormone Res* **32**: 477-528.

Means, A.R., J.R. Dedman, J.S. Tash, D.J. Tindall, M. Van Sickle, M.J. Welsh. 1980. Regulation of the testis sertoli cell by FSH. *Annu. Rev. Physiol.* **42**: 59-70.

Mercer, J.E., J.A. Clements, J.W. Funder, I.J. Clarke. 1987. Rapid and specific lowering of pituitary FSH β mRNA levels by inhibin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **53**: 251-254.

Mercier, P. 1990. La deuxième jeunesse des anticorps monoclonaux. *Biofutur* Mai 25-29.

Messing, J. 1991. Cloning in M13 phage or how to use biology at its best. *Gene* **100**: 3-12.

Minegish, T., K. Nakamura, Y. Takakura, Y. Ibuki, M. Igarashi. 1991. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem.Biophys. Res. Comm.* **175**: 1125-1130.

Misrahi, M., M.T.V. Hai, N. Ghinea, H. Loosfelt, G. Meduri, M. Atger, A. Jolivet, B. Gross, J.F. Savouret, P. Dessen, E. Milgrom. 1993. Molecular and cellular biology of gonadotropin receptors Dans: *The ovary* Adashi E. Y., Leung, PCK. eds. Raven Press. pp. 57-92.

Morrel, A.G, G. Gregoriadis, I.H. Sheinberg, J. Hickman, G. Ashwell. 1971. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.* **246**: 1461.

Morris, J.C., E.R. Berger, D.J. McCormick. 1993. Structure-function studies of the human thyrotropin receptor: inhibition of

binding of labeled thyrotropin (TSH) by synthetic human TSH receptor peptides. *J. Biol. Chem.* **268**: 10900-10905.

Moyle, W.R., R.K. Campbell, R.V. Myers, M.P. Bernard, Y. Han, X. Wang. 1994. Co-evolution of ligand-receptor pairs. *Nature* **368**: 251-255.

Nakamura, K., T. Minegishi, Y. Takakura, K. Miyamoto, Y. Hasegawa, Y. Ibuki, M. Igarashi. 1991. Hormonal regulation of gonadotropin receptor mRNA in rat ovary during follicular growth and luteinization. *Molecular and Cellular Endocrinology* **82**: 259-263.

Nelson, F.K., S.M. Friedman, G.P. Smith. 1981. Filamentous phage DNA cloning vectors: a non infective mutant with a non polar deletion in gene III. *Virology* **108**: 338-350

Ortolano, G.A., D.J. Haisenleder, A.C. Dalkin, S.A. Iliff-Sizemore, T.D. Landefeld, R.A. Maurer. 1988. Follicle-stimulating hormone beta subunit messenger ribonucleic acid concentrations during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **128**: 2149-2151.

Oxender, D.W., H.D. Hafs, L.A. Edgerton. 1972. Serum growth hormone, LH and prolactin in the pregnant cow. *J. Anim. Sci.* **35**: 51.

Parmentier, M., F. Libert, C. Maenhaut, A. Lefort, C. Gerard, J. Perret, J. VanSande et coll., 1989. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science*. **246**: 1620-1622.

Papkoff, H. 1974. Chemical and biological properties of the subunits of Pregnant Mare Serum Gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **58**: 397-404.

Pelletier, G., R. Leclerc., F. Labrie. 1976. Identification of gonadotropic cells in the human pituitary by immunoperoxydase technique. *Mol. Cell. Endocrinol.* **6**: 123-128.

Peters, B.P., R.F. Krzesicki, R.J. Hartle, F. Perini, R.W. Ruddon. 1984. A kinetic comparison of the processing and secretion of the $\alpha\beta$ dimer and the uncombined α and β subunit of chorionic gonadotropin synthesized by human choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 15123-15130.

Phillips, C.L., L.W. Lin, J.C. Wu, K. Guzman, A. Milsted, W.L. Miller. 1988. 17β -Estradiol and progesterone inhibit transcription of the genes encoding the subunits of ovine follicle-stimulating hormone. *Mol. Endocrinol.* **2**:641-649.

Pierce, J.G., T.F. Parsons. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 465-495.

Price, C.A. 1991. The control of FSH secretion in the larger domestic species. *J. Endocrinology* **131**: 177-184.

Putlitz, J.Z, W.L. Kubasek, M. Duchêne, M. Marget, B.U. von Specht, H. Domdey. 1990. Antibody production in baculovirus-infected insect cells. *Bio/technology* **8**: 651-654.

Rashed, I., E. Oberer. 1986. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol. Rev.* **50**: 401-427

Reichert, L.E Jr. 1972. Biological studies on the relatedness of subunits of human follicle stimulating hormone and chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* **90**: 1119-1122.

Reichert L.E. Jr, V.K. Bhalla. 1974. Development of a radioligand tissue receptor assay for human follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **94**: 483.

Reichert, L.E. Jr., B. Dattatreya Murthy. 1989. The follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in testis: interaction with FSH, mechanism of signal transduction, and properties of the purified receptor. *Biol. Reprod.* **40**: 13-26.

Reichert, L.E., B. Dattatreya Murthy, P. Grasso, T.A. Santa-Coloma. 1991. Structure-function relationship of the glycoprotein hormones and their receptors. *TIPS* **12**: 199-203.

Reis U., B. Blum, B.U. von Specht, H. Domdey, J. Collins. 1992. Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with the dual recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechnology* **10**: 910-912.

Richards, J.S., J.J. Ireland, M.C. Rao, G.A. Bernath, A.R. Midgley Jr., L.E. Jr. Reichert. 1976. Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, FSH and LH. *Endocrinology* **99**: 1562-1570.

Richards, J.S., A.J. Jonassen, A.I. Rolfes, K. Kersey, L.E. Reichert Jr. 1979. Adenosine 3', 5'-monophosphate, Luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of estradiol and Follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **104**: 765-773.

Richards, J.S. 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell development. *Physiol. Rev.* **60**: 51-89.

Richards, J.S., C.K. Richard, L.S. Fitzpatrick, R.B. Oonk, W.L. Wong. 1992. Diverse mechanisms regulating gene expression in granulosa cells. Dans: *Follicle Stimulating Hormone* Hunzicker-Dunn, M., Schwartz, NB. eds. Springer-Verlag. pp.145-155.

Rivier, C., V. Roberts, W. Vale. 1982. Possible role of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in

modulating inhibin secretion and expression during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* **125**: 876-882.

Robertson, M.W. 1993. Phage and *Escherichia coli* expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor α -subunit ectodomain. *Journal of Biol. Chem.* **268**: 12736-12743.

Roche, P.C., R.J. Ryan, D.J. McCormick. 1992. Identification of hormone binding regions of Luteinizing Hormone /human Chorionic Gonadotropin receptor using synthetic peptides. *Endocrinology* **131**: 268-274.

Sairam, M.R. 1983. Hormonal antagonistic properties of chemically deglycosylated human choriogonadotropin. *J. Biol. Chem.* **258**: 445-449.

Sairam M.R, G.N. Bhargave. 1985. A role of glycosylation of the alpha-subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. *Science* **229**: 65.

Salamero, J. 1993. Anticorps monoclonaux et coliclonaux. *Biofutur* **122**: 3-11.

Sambrook. J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Dans: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor. Deuxième édition.

Sanders, M.M., A.R. Midgley Jr. 1983. Cyclic nucleotides can induce Luteinizing hormone receptor in cultured granulosa cells. *Endocrinology* **112**: 1382-1388.

Sanders, SE., JF. Burke. 1990. Rapid isolation of miniprep preparation DNA for double strand sequencing. *Nucleic Acids Research* **18**: 49-48.

Schams, D, E. Schamllenberg. 1976. Heterologous radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone and its application during the oestrus cycle in cattle. *Acta Endocrinol.* **81**: 461.

Schwartz, N.B. 1974. The role of FSH and LH and their antibodies on follicle growth and on ovulation. *Biol. Reprod.* **10**: 236-272.

Scott, J.K., G.P. Smith. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**: 386-390.

Segaloff D., R.D. Cone. 1990. Isolation of TSH and LH/CG receptor cDNAs from human thyroid: regulation by tissue specific splicing. *Mol. Endocrinol.* **4**: 1264-1276.

Segaloff, D., M. Ascoli. 1993. The lutropin/choriogonadotropin receptor...4 years after. *Endocrine Reviews* **14**: 324-347.

Sharpe, R.M., I.A. Swanston, I. Cooper, C.G. Tsonics, A.S. McNeilly. 1988. Factors affecting the secretion of immunoreactive inhibin into testicular interstitial fluid in rats. *J. Endocrinol.* **119**: 315-326.

Silversides, D.W. 1986. Studies of the immunobiology of luteinizing hormone. Thèse de doctorat. Université de Saskatchewan.

Sites, C.K., K. Patterson, C.S. Jamison, S.J. Friezner Degen, A.R. LaBarbera. 1994. Follicle-Stimulating Hormone (FSH) increases FSH receptor messenger ribonucleic acid while decreasing FSH binding in cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* **134**: 411-417.

Smith, G.P. 1988. Filamentous phage assembly: morphogenetically defective mutants that do not kill the host. *Virology* **167**: 156-165.

- Smith, G.P., J.K. Scott.** 1993. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods in Enzymology* **217**: 228-257.
- Sprengel, R., T. Braun, K. Nikolics, D.L. Segaloff, P.H. Seeburg.** 1990. The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol. Endocrinol.* **4**: 525-530.
- Strader, C.D., I.S. Sigal, R.A.F. Dixon.** 1989. Structural basis of adrenergic receptor function FASEB. *J.3*: 1825-1832.
- Steele, G.L., P.C.K. Leung.** 1993. Signal transduction mechanisms in ovarian cells. Dans: *The ovary* Adashi E. Y., PCK. Leung. eds. Raven Press. pp. 113-127.
- Takkinen, K., M.L. Laukkanen, D. Sizmann, A. Alfthan, T. Immonen, L. Vanne, M. Kaartinen, J.K.C. Knowles, T.T. Teeri.** 1991. An active single-chain antibody containing a cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*. *Protein Engineering* **4**: 837-841.
- Tapanainen, J.S., P.S. LaPolt, E. Perlas, A.J.W. Hsueh.** 1993. Induction of ovarian follicle luteinization by recombinant Follicle-Stimulating Hormone. *Endocrinology* **133**: 2875-2880.
- Themmen, A.P.N., L.J. Block, M. Post, W.M. Baarends, J.W. Hoogerbrugge, M. Parmentier, G. Vassart, J.A. Grootegoed.** 1991. Follicle-stimulating hormone receptor down regulation involves a cAMP-dependent post-transcriptional decrease of receptor mRNA expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* **78**: R7-R13.
- Tilly, J.L., P.S. Lapolt, A.J.W. Hsueh.** 1992. Hormonal regulation of Follicle-Stimulating Hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **130**: 1296-1302.

Tilly, J. L., K.I. Kowalski, D.W. Schomberg, A.J.W. Hsueh. 1992. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* **131**: 1670-1676.

Tizard I. 1992. *Veterinary immunology an introduction*. Fourth edition. W.B. Saunders company, Harcourt Brace Jovanovich inc.

Tougard, C., A. Tixier-Vidal. 1994. Lactotrophes and gonadotrophes. Dans: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E., Neill, D.J. eds. Raven Press. Vol 1, pp 1711-1747.

Ulloa-Aguirre, A., S.C. Chappel. 1982. Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J. Endocrinol.* **95**: 257-266.

Vale, W., J. Rivier, J. Vaughan, R. McClintock, A. Corringan, W. Woo, D. Karr, J. Spiess. 1986. Purification and characterization of an FSH release protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* **321**: 776-779.

Wandji, S.A., G. Pelletier, M.C. Sirard. 1991. Cells localization of FSH, basic fibroblast factor and Epidermal Growth Factor receptors in bovine fetus and calves ovaries. *Proceeding of Sero Symposium, Vancouver (British Columbia, Canada)* présentation 29 page 33.

Wandji, S.A., M.A. Sirard, M.A. Fortier. 1992. Differential response to gonadotropins and prostaglandin E₂ in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biol. Reprod.* **46**: 1034-1041

- Wang, C., A.J.W. Hsueh, G.F. Erickson.** 1982. Role of cyclic AMP in the induction of estrogen and progesterin synthesis in cultured granulosa cell. *Mol. Cell. Endocrinol.* **25**: 70-73.
- Wang, X.N., G.S. Greenwald.** 1993. Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH and hCG receptors in hypophysectomized mice. *J. Reprod. Fertil.* **99**: 403-413.
- Ward, E.S, D. Gussow, A.D. Griffiths, P.T. Jones, G. Winter.** 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli* *Nature* **341**: 544-546.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller.** 1993. Recombinant DNA. Second edition. Scientific American books
- Whitlow, M., D. Filpula.** 1991. Single-chain Fv proteins and their fusion proteins. *Methods in Enzymology* **2**: 97-105.
- Williams, W.V, D.B. Weiner, T. Kierber-Emmons, M.I. Greene.** 1990. Antibody geometry and form: three-dimensional relationships between anti-idiotypic antibodies and external antigens. *TibTech-sept* **8**:
- Winter, G., C. Milstein.** 1991. Man-made antibodies. *Nature* **349**: 293-299.
- Yarney, T.A., M.R. Sairam, H. Khan, N. Ravindranath, S Payne, N.G. Seidah.** 1993. Molecular cloning and expression of the ovine testicular follicle-stimulating hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **93**: 219-226.