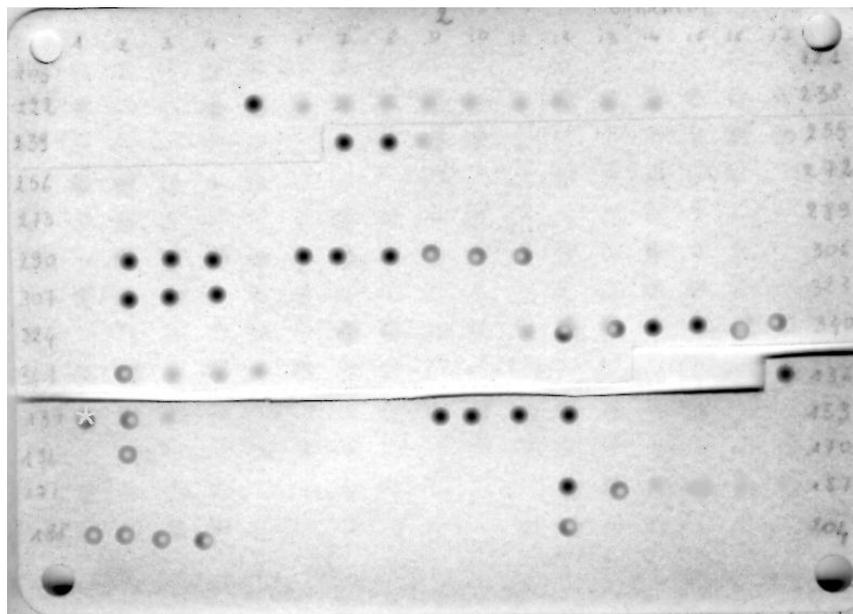


Adaptation de la méthode peptide-spot à la recherche de sites, de la protéine RNA2 du nodavirus, reconnus par différents sérums de loup

(*Dicentrarchus labrax*)



Résumé :

La technique dite de « peptide-spot » est essentiellement utilisée pour l'étude de la structure des protéines ou l'obtention d'anticorps particuliers pour le diagnostic et la recherche humaine ou sur les mammifères.

Dans le but de produire de vaccin synthétique, ce travail présente un essai d'adaptation à la mise en évidence, sur la protéine de capsid RNA2 du nodavirus, de sites immunogènes pour le loup (*Dicentrarchus Labrax*).

La totalité de la protéine RNA2 de Sb1 et Sb2 est représentée par 109 peptides de 15 acides aminés se recouvrant mais avec un décalage de trois acides aminés à chacun d'eux. Ces peptides sont synthétisés et déposés sur une membrane de cellulose.

Les peptides reconnus par les sérums de loup ou de lapin sont révélés par des anti-corps (anti-loup ou anti-lapin) conjugués à l'alkaline phosphatase. La membrane est réutilisée après génération. Il a été testé des sérums de lapin, de géniteurs et d'adultes de loups avant et après injection de nodavirus vivant ou de peptides de synthèse issus de RNA2 incluant soit le N soit le C terminal.

Contrairement au lapin, les sérums des loups témoins se fixent aspécifiquement sur à la membrane renforçant la notion de faible spécificité des IgM de poisson.

Ces premiers résultats montrent la difficulté d'adaptation au poisson, d'une technique issue des mammifères. Une partie de ces problèmes peuvent être résolus par des modifications techniques (présentation du peptide, utilisation IgM purifié au lieu du sérum...) mais le problème de fond reste que l'immunogénicité d'un épitope dépend de l'espèce.

Abstract :

Spot-Synthesis technique was applied to study protein frame or to develop antibodies with specific characteristics for use in diagnostic or research on human or mammals. In this work this technique was used to find sites on RNA2 protein of Nodavirus which are immunogenic for sea bass (*Dicentrarchus labrax*). It aimed to achieve synthetic peptide vaccine production against this virus.

One hundred and nine overlapping peptides, of 15 amino acids frameshifted by three residues, representing the complete RNA2 protein sequence of Sb1 and Sb2 nodavirus were synthesized on a cellulose membrane by the Spot-Technique.

The set of membrane-bound peptides was probed by incubation with sea-bass or rabbit serum. Anti-sea bass or anti-rabbit alkaline phosphatase-conjugated antibody revealed the binding. The membrane was further treated so as to remove precipitated dye and bound antibodies and reused when necessary.

Serums of rabbit, sea bass bloodstocks and adult (100g) before and after injection with a live Nodavirus were tested. Serum from adult before and after injection of two peptides 15 amino acids including the N terminal for the former and the C terminal for the latter were also tested.

In opposition with rabbit, the control fish serum bound aspécifiquement several peptide and strengthened the idea of low specificity of fish IgM.

The first results permit to spot foreseeable difficulty resulting from adaptation of mammal's technique to fish. Part of them should be resolved by technical adaptation as modification of peptide presentation or use of purified immunoglobulin rather whole serum but they confirm that the immunogenicity of an epitope depend of the species.

Mots-clés :

Peptides synthétiques, vaccin, Peptid-spot, séquence immunogène, *Dicentrarchus labrax*

Keywords :

Synthetic peptides, vaccine, immunogenicity, *Dicentrarchus labrax*..

Commentaire :

Les informations contenues dans ce rapport sont extraites du rapport final (1998-2002) communiqué à l'ANVAR le 12 juillet 2002

***Adaptation de la méthode peptide-spot à la
recherche de sites, de la protéine RNA2 du
nodavirus, reconnus par différents sérums de loup
(Dicentrarchus labrax).***

Jean-Luc COEURDACIER

IFREMER Route de Maguelone 34 250 PALAVAS les FLOTS France

1 Introduction

La conception d'un vaccin, exception faite de l'utilisation de pathogènes atténués ou de vaccins tués dont nous ne parlerons pas, passe par la recherche de zones immunogènes susceptibles d'entraîner la production d'anticorps protecteurs. Bien que certains travaux rapportent des contre-exemples (Emmenegger *et al.*, 1997, Toranzo *et al.*, 1995) l'immunogénicité est en général un préalable à la protection.

L'identification puis la production de ces séquences protectrices peut se faire par voie biotechnologique ou à l'aide de production de peptides synthétiques.

Jusqu'à présent les peptides synthétiques furent utilisés pour étudier la structure des protéines et peu de travaux ont visé leur utilisation en temps que vaccin. Un vaccin peptidique contre le paludisme a atteint la phase des essais clinique (Patarroyo *et al.*, 1987) mais sa commercialisation n'est toujours pas prévue. L'utilisation des peptides synthétiques en cancérologie ou dans les infections bactériennes commence à être étudié (Roggero *et al.*, 1999).

Des travaux ont été aussi réalisés sur l'immunisation et la protection de l'infection virale chez les bovins, cochon d'inde, lapin (Bittle *et al.*, 1982, Langevelt *et al.*, 1994b), mouton (Flynn *et al.*, 1990) et le singe (Langevelt *et al.*, 1994a) d'autres études ont porté sur le *Plasmodium berghei* chez la souris (Roggero *et al.*, 1999) sur la nécrose virale chez la truite arc-en-ciel.(Emmenegger *et al.*, 1995 ; 1997).

La technique la plus performante de mise en évidence de secteur potentiellement immunogène nécessite la connaissance de la structure cristallographique de la protéine, cette donnée est très rare et dans la majorité des cas le choix est basé sur trois indices, accessibilité au solvant, l'hydrophilie et l'hydrophobie (Thornton *et al.*, 1986).

Cette méthode issue de travaux sur les mammifères et appliquée à la protéine de capsidie DIEV-RNA2 du nodavirus décrite par Delsert *et al.*, (1997), a permis de sélectionner 4 peptides de 15 acides aminés potentiellement immunogènes et protecteurs (Coeurdacier *et al.*, in press). Un travail impliquant la vaccination, le suivi immunologique et le challenge de différents lots de loups ont permis de montrer que les extrémités C et N terminales, étaient immunogènes et potentiellement protecteurs.

La lourdeur de mise en oeuvre de la méthode nous a orientés vers une technique appelée spot-synthesis (Frank 1992) ou peptid-spot. La totalité de la protéine découpée en peptides d'une quinzaine d'acide aminés se recouvrant partiellement, est déposée sur une membrane en «spot»s distincts et permet de mettre en évidence les épitopes linéaires reconnus par les anticorps du sérum à étudier. Cette méthode fut utilisée pour étudier les relations entre les épitopes des antigènes et les paratopes des anticorps (*Daniel et al.*, 1998) ou pour étudier les antigènes des phosphoprotéines du morbillivirus reconnu par des anticorps monoclonaux (Martens *et al.*, 1995). Ce type d'approche n'avait jamais été appliqué aux anticorps de poisson.

Ce travail est basé sur deux hypothèses :

-un animal survivant à une injection de virus virulent à une dose létale pour au moins 60% du lot, devrait posséder des anticorps protecteurs.

-certain de ces anticorps reconnaissent des portions linéaires suffisamment étendues pour se fixer sur les peptides de la membrane.

Ce travail avait pour but premier d'adapter la technique à l'étude de sérums de poisson afin de l'utiliser ultérieurement pour identifier les zones reconnues par les anticorps présents dans le sérum de poissons ayant survécus à l'injection de virus. La connaissance de ces zones permettrait, dans un 2^{ème} temps de dégager des portions de virus potentiellement protectrices. La synthèse de peptides correspondant à ces séquences pourrait permettre enfin d'étudier et développer un vaccin anti-nodavirus pour le loup.

2 Matériel et Méthode

2.1 L'antigène

Le virus sur lequel nous avons mené cette étude, est un petit virus (27nm) à ARN simple brin, dont la protéine de capsid a un poids moléculaire de 42Kda (Comps et al.,1994 ; Delsert *et al.*, 1997). Il provoque chez le poisson une encéphalite spongiforme.

2.2 Sérums

Nous avons sélectionné un ensemble de sérums issus des précédents travaux (Coourdacier *et al.*, in press).

Tous les sérums choisis ont été testés par ELISA pour la recherche d' Anticorps anti-nodavirus, anti-KLH ou anti-peptide (Anti- Sb1Cter, Anti-Sb1-Nter, Anti-Lp2 (266-279)

Rappel des sequences des Peptides Peptide de Sb1-RNA₂

Name	Amino acid	P.M.	Sequence
Sb1-Nter	1-14	1664	NH ₂ -MVRKGEKKLAKTATC-CONH ₂
Sb1-Lp1	127-140	1707	NH ₂ -FLPDPTDNDHTFDAC-CONH ₂
Sb1-Lp2	266-279	1673	NH ₂ -CDYKLGTGDVDRAVY-CONH ₂
Sb1-Cter	325-338	1549	NH ₂ -CLPVGTT <i>F</i> TRVDAGN-CONH ₂

a.a. différant de Sb1 à Sb2 en italique-gras

Liste des sérums étudiés

	Nb. sérum	Type de sérums	Dilution	paragraphe
1	2	Cter ⁺	200	4.3.1.
2	1	Lp2 ⁺	100	4.6.
3	2	Témoin KLH ⁻ Nd ⁻	400	4.2.3.
4	1	Non spécifique		/
5	2	Vacciné Sb2, et Survivant du challenge Sb2	250	/
6	1	KLH ⁺	200	4.3.4
7	2	Non Vacciné, Challenge Sb2	142	4.4.2.
8	2	Nter ⁺ KLH ⁺ Nd ⁺	260	4.3.2.
9	1	Lapin injecté Sb1	500	4.4.3.
10	1	Témoin lapin	500	/
11	1	Géniteur challenger Sb2	155	/
12	2	Injecté Sb1	178	4.4.1.
	18	Total		

2.3 Fabrication de la membrane Peptide Spot

La fabrication de la membrane a été réalisée par la société Symt'hem suivant un procédé confidentiel mais dont le principe est le suivant :

Un certain nombre de petits peptides sont synthétisés simultanément en petites quantités. Ils sont synthétisés sur une phase solide plane de cellulose à la surface de laquelle sont répartis des «spot»s chimiquement réactifs. Chacun des «spot» est un lieu de synthèse d'un peptide. Chaque «spot» correspond à une surface limitée de cellulose dont les fonctions hydroxyles sont engagées dans une liaison ester avec un bras constitué de deux α -alanines. La fonction amine du bras supportera l'acide aminé C-terminal du peptide à synthétiser. Des volumes très faibles d'acide aminé (Fmoc-acide aminé < 1 μ) sont déposés sur chaque «spot» et les étapes communes de synthèse sont réalisées en trempant la feuille de papier dans un bain de réactif adéquat. Le couplage des acides

aminés est suivi grâce au bleu de bromophénol qui vire du bleu au jaune au fur et à mesure de l'évolution du couplage. Un «spot» représente environ 50 nmol de peptide.

Les séquences des protéines de capsid des nodavirus furent fractionnées en peptides de 15 acides aminés se décalant à chaque fois de 3 acides aminés. Cent huit peptides (numérotés de 136 à 244) pour Sb2 (Thiéry *et al.*, 1999) et 108 (numérotés de 245 à 353) pour Sb1 (Delsert *et al.*, 1997, Thiéry *et al.*, 1999)

2.4 Technique de révélation et de conservation

C'est une mise en évidence de peptides reconnus par « blot »
Ci-dessous un aperçu du protocole, le détail ainsi que les réactifs sont en annexe 1 et 2.

2.4.1 Révélation

Sauf mention contraire, les rinçages sont réalisés au TBS entre chaque étape, la température de manipulation est 37 °, et le pH 7.

Blocking une nuit,
Incubation du sérum de loup ou lapin au 1/150 à 1/400 dans BB
Fixation des monoclonaux, 6 E11 Biotinilé au 1/ 555 +Streptavidide conjuguée phosphatase alcaline 1/ 555 dans BB
Mélange 6^E11 Strepta 90 min à 37°
Rinçages tampon citrate (CBS pH 7)

2.4.2 Coloration

Substrat AP Thiazole bleu, réactif phosphate(BCIP) tamponnée par MgCl₂ dans CBS (Si la coloration développée est faible, le CBS utilisé dans ces 2 étapes peut être remplacé par le tampon Tris 50 mM ph 8.)

2.4.3 Conservation des résultats

Membrane scannée avec AGFA Snapscan 1236 et conservé en fichier (voir §2.4.)

2.4.4 Régénération de la membrane

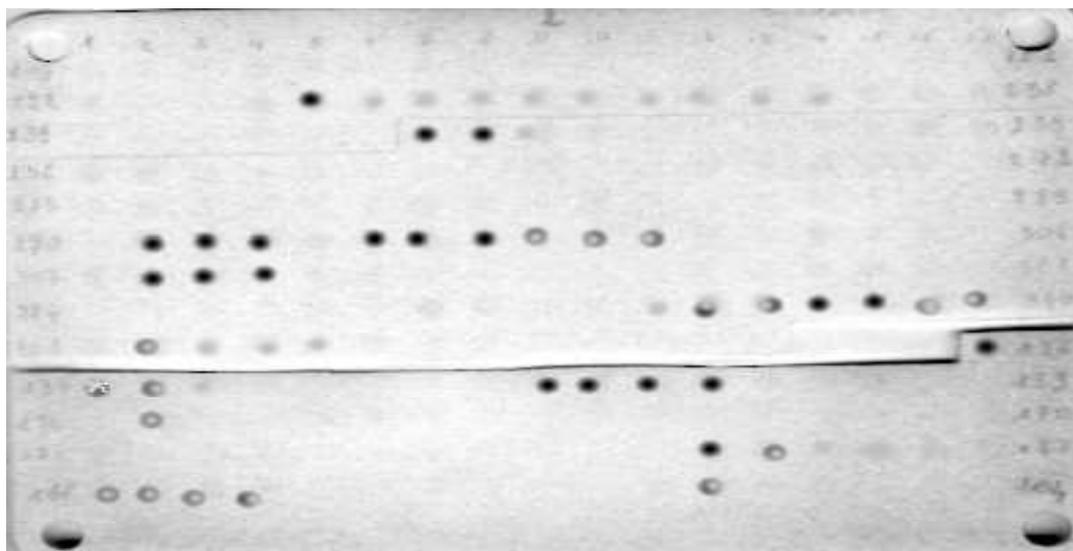
Rinçage, pour supprimer la coloration à l'eau miliQ, puis MF
Dissociation de la liaison Antigène- Anticorps avec un mélange Urée et détergeant (lauryl sulfate).
Stabilisation des peptides sur la membrane par du Méthanol et acide acétique puis séchage à l'air froid.

Stockage dans sachet plastique étanche à -20°C ou réincubation pour révélation le lendemain.

2.5 Représentation schématique de la membrane

Image obtenue après scannage en noir et blanc. Sur les cotés les numérotations du fabricant correspondent au peptide qu'ils jouxtent. Ils vont de 136 à 353.

2.5.1 Image après scannage



2.5.2 Représentation de la membrane Numérotation fabricant

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221
222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238
239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272
273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289
290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306
307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323
324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353				136
137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153
154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187
188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	238	241	244	247	250	253	256
259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	289	292	295	298	301	304	307
310	313	316	319	322	325	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325				1
4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52
55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	85	88	91	94	97	100	103
106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	136	139	142	145	148	151	154
157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	187	190	193	196	199	202	205

2.5.3 Représentation pour la comparaison du Sb1 et Sb2

3	6	9	12	15	18	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325				

						1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325				

3 Résultats

3.1 Similitude et différences des représentations linéaires de Sb1 et Sb2

3.1.1 Différence en acides aminés

39 / 339 a.a. sont différents soit 11, 5%

N°a.a.	Sb2	Sb1	*	N°a.a.	Sb2	Sb1	
1	6	D	E	21	219	T	A
2	12	P	T	22	223	M	L
3	27	N	T	23	224	T	S
4	35	T	P	24	227	S	P
5	39	V	L	25	234	S	A
6	40	S	A	26	236	N	S
7	69	P	A	27	247	P	Q
8	72	T	A	28	251	A	S
9	78	V	I	29	256	V	I
10	82	A	S	30	259	L	M
11	88	L	I	31	268	S	K
12	103	A	T	32	282	I	L
13	111	I	V	33	288	N	T
14	150	A	G	34	290	G	T
15	166	L	M	35	312	V	I
16	171	S	T	36	330	V	T
17	183	L	F	37	331	C	F
18	190	N	S	38	336	S	A
19	206	R	A	39	337	E	G
20	217	E	D				

3.1.2 Différences entre les peptides

La répartition des a.a. différents est bien homogène car 80/109 soit 73,4% des peptides sont différents.

Séquence	lignée	1° a.a.	15° a.a.	N° fab	Pept. Dif.
			6	D	E dif
			12	P	T dif
M V R K G E K K L A K T A T T V17	1	15	245		dif
M V R K G D K K L A K P A T T V26	1	15	136		dif
K G E K K L A K T A T T K A A V17	4	18	246		dif
K G D K K L A K P A T T K A A V26	4	18	137		dif
K K L A K T A T T K A A N P Q V17	7	21	247		dif
K K L A K P A T T K A A N P Q V26	7	21	138		dif
A K T A T T K A A N P Q P R R V17	10	24	248		dif
A K P A T T K A A N P Q P R R V26	10	24	139		dif
A T T K A A N P Q P R R R A T V17	13	27	249		dif
A T T K A A N P Q P R R R A N V26	13	27	140		dif
			27	N	T dif
K A A N P Q P R R R A T N R R V17	16	30	250		dif
K A A N P Q P R R R A N N R R V26	16	30	141		dif
N P Q P R R R A T N R R R S N V17	19	33	251		dif
N P Q P R R R A N N R R R S N V26	19	33	142		dif
			35	T	P dif
P R R R A T N R R R S N R P D V17	22	36	252		dif
P R R R A N N R R R S N R T D V26	22	36	143		dif
R A T N R R R S N R P D A P L V17	25	39	253		dif
R A N N R R R S N R T D A P V V26	25	39	144		dif
			39	V	L dif
			40	S	A dif
N R R R S N R P D A P L A K A V17	28	42	254		dif
N R R R S N R T D A P V S K A V26	28	42	145		dif
R S N R P D A P L A K A S T V V17	31	45	255		dif
R S N R T D A P V S K A S T V V26	31	45	146		dif
R P D A P L A K A S T V T G F V17	34	48	256		dif
R T D A P V S K A S T V T G F V26	34	48	147		dif
A P L A K A S T V T G F G R G V17	37	51	257		dif
A P V S K A S T V T G F G R G V26	37	51	148		dif
A K A S T V T G F G R G T N D V17	40	54	258		dif
S K A S T V T G F G R G T N D V26	40	54	149		dif
S T V T G F G R G T N D V H L V17	43	57	259		idem
S T V T G F G R G T N D V H L V26	43	57	150		idem
T G F G R G T N D V H L S G M V17	46	60	260		idem
T G F G R G T N D V H L S G M V26	46	60	151		idem
G R G T N D V H L S G M S R I V17	49	63	261		idem
G R G T N D V H L S G M S R I V26	49	63	152		idem
T N D V H L S G M S R I S Q A V17	52	66	262		idem
T N D V H L S G M S R I S Q A V26	52	66	153		idem
V H L S G M S R I S Q A V L A V17	55	69	263		dif
V H L S G M S R I S Q A V L P V26	55	69	154		dif
			69	P	A dif

S G M S R I S Q A V L A A G A	V17	58	72	264	dif
S G M S R I S Q A V L P A G T	V26	58	72	155	dif
			72	T A	dif
S R I S Q A V L A A G A G T D	V17	61	75	265	dif
S R I S Q A V L P A G T G T D	V26	61	75	156	dif
S Q A V L A A G A G T D G Y I	V17	64	78	266	dif
S Q A V L P A G T G T D G Y V	V26	64	78	157	dif
			78	V I	dif
V L A A G A G T D G Y I V V D	V17	67	81	267	dif
V L P A G T G T D G Y V V V D	V26	67	81	158	dif
			82	A S	dif
A G A G T D G Y I V V D S T I	V17	70	84	268	dif
A G T G T D G Y V V V D A T I	V26	70	84	159	dif
G T D G Y I V V D S T I V P D	V17	73	87	269	dif
G T D G Y V V V D A T I V P D	V26	73	87	160	dif
			88	L I	dif
G Y I V V D S T I V P D I L P	V17	76	90	270	dif
G Y V V V D A T I V P D L L P	V26	76	90	161	dif
V V D S T I V P D I L P R L G	V17	79	93	271	dif
V V D A T I V P D L L P R L G	V26	79	93	162	dif
S T I V P D I L P R L G H A A	V17	82	96	272	dif
A T I V P D L L P R L G H A A	V26	82	96	163	dif
V P D I L P R L G H A A R I F	V17	85	99	273	dif
V P D L L P R L G H A A R I F	V26	85	99	164	dif
I L P R L G H A A R I F Q R Y	V17	88	102	274	dif
L L P R L G H A A R I F Q R Y	V26	88	102	165	dif
			103	A T	dif
R L G H A A R I F Q R Y T V E	V17	91	105	275	dif
R L G H A A R I F Q R Y A V E	V26	91	105	166	dif
H A A R I F Q R Y T V E T L E	V17	94	108	276	dif
H A A R I F Q R Y A V E T L E	V26	94	108	167	dif
R I F Q R Y T V E T L E F E V	V17	97	111	277	dif
R I F Q R Y A V E T L E F E I	V26	97	111	168	dif
			111	I V	dif
Q R Y T V E T L E F E V Q P M	V17	100	114	278	dif
Q R Y A V E T L E F E I Q P M	V26	100	114	169	dif
T V E T L E F E V Q P M C P A	V17	103	117	279	dif
A V E T L E F E I Q P M C P A	V26	103	117	170	dif
T L E F E V Q P M C P A N T G	V17	106	120	280	dif
T L E F E I Q P M C P A N T G	V26	106	120	171	dif
F E V Q P M C P A N T G G G Y	V17	109	123	281	dif
F E I Q P M C P A N T G G G Y	V26	109	123	172	dif
Q P M C P A N T G G G Y V A G	V17	112	126	282	Idem
Q P M C P A N T G G G Y V A G	V26	112	126	173	Idem
C P A N T G G G Y V A G F L P	V17	115	129	283	Idem
C P A N T G G G Y V A G F L P	V26	115	129	174	Idem
N T G G G Y V A G F L P D P T	V17	118	132	284	Idem
N T G G G Y V A G F L P D P T	V26	118	132	175	Idem
G G Y V A G F L P D P T D N D	V17	121	135	285	Idem
G G Y V A G F L P D P T D N D	V26	121	135	176	Idem
V A G F L P D P T D N D H T F	V17	124	138	286	Idem
V A G F L P D P T D N D H T F	V26	124	138	177	Idem
F L P D P T D N D H T F D A L	V17	127	141	287	Idem
F L P D P T D N D H T F D A L	V26	127	141	178	Idem

D P T D N D H T F D A L Q A T	V17	130	144	288	Idem
D P T D N D H T F D A L Q A T	V26	130	144	179	Idem
D N D H T F D A L Q A T R G A	V17	133	147	289	Idem
D N D H T F D A L Q A T R G A	V26	133	147	180	Idem
H T F D A L Q A T R G A V V G	V17	136	150	290	dif
H T F D A L Q A T R G A V V A	V26	136	150	181	dif
		150	A	G	dif
D A L Q A T R G A V V G K W W	V17	139	153	291	dif
D A L Q A T R G A V V A K W W	V26	139	153	182	dif
Q A T R G A V V G K W W E S R	V17	142	156	292	dif
Q A T R G A V V A K W W E S R	V26	142	156	183	dif
R G A V V G K W W E S R T V R	V17	145	159	293	dif
R G A V V A K W W E S R T V R	V26	145	159	184	dif
V V G K W W E S R T V R P Q Y	V17	148	162	294	dif
V V A K W W E S R T V R P Q Y	V26	148	162	185	dif
K W W E S R T V R P Q Y T R T	V17	151	165	295	dif
K W W E S R T V R P Q Y T R T	V26	151	165	186	dif
		166	L	M	dif
E S R T V R P Q Y T R T M L W	V17	154	168	296	dif
E S R T V R P Q Y T R T L L W	V26	154	168	187	dif
T V R P Q Y T R T M L W T S T	V17	157	171	297	dif
T V R P Q Y T R T L L W T S S	V26	157	171	188	dif
		171	S	T	dif
P Q Y T R T M L W T S T G K E	V17	160	174	298	dif
P Q Y T R T L L W T S S G K E	V26	160	174	189	dif
T R T M L W T S T G K E Q R L	V17	163	177	299	dif
T R T L L W T S S G K E Q R L	V26	163	177	190	dif
M L W T S T G K E Q R L T S P	V17	166	180	300	dif
L L W T S S G K E Q R L T S P	V26	166	180	191	dif
T S T G K E Q R L T S P G R F	V17	169	183	301	dif
T S S G K E Q R L T S P G R L	V26	169	183	192	dif
		183	L	F	dif
G K E Q R L T S P G R F I L L	V17	172	186	302	dif
G K E Q R L T S P G R L I L L	V26	172	186	193	dif
Q R L T S P G R F I L L C V G	V17	175	189	303	dif
Q R L T S P G R L I L L C V G	V26	175	189	194	dif
		190	N	S	dif
T S P G R F I L L C V G S N T	V17	178	192	304	dif
T S P G R L I L L C V G N N T	V26	178	192	195	dif
G R F I L L C V G S N T D V V	V17	181	195	305	dif
G R L I L L C V G N N T D V V	V26	181	195	196	dif
I L L C V G S N T D V V N V S	V17	184	198	306	dif
I L L C V G N N T D V V N V S	V26	184	198	197	dif
C V G S N T D V V N V S V L C	V17	187	201	307	dif
C V G N N T D V V N V S V L C	V26	187	201	198	dif
S N T D V V N V S V L C R W S	V17	190	204	308	dif
N N T D V V N V S V L C R W S	V26	190	204	199	dif
		206	R	A	dif
D V V N V S V L C R W S V A L	V17	193	207	309	dif
D V V N V S V L C R W S V R L	V26	193	207	200	dif
N V S V L C R W S V A L S V P	V17	196	210	310	dif
N V S V L C R W S V R L S V P	V26	196	210	201	dif
V L C R W S V A L S V P S L E	V17	199	213	311	dif
V L C R W S V R L S V P S L E	V26	199	213	202	dif

R W S V A L S V P S L E T P E	V17	202	216	312	dif
R W S V R L S V P S L E T P E	V26	202	216	203	dif
			217	E D	dif
V A L S V P S L E T P E D T A	V17	205	219	313	dif
V R L S V P S L E T P E E T T	V26	205	219	204	dif
			219	T A	dif
S V P S L E T P E D T A A P I	V17	208	222	314	dif
S V P S L E T P E E T T A P I	V26	208	222	205	dif
			223	M L	dif
			224	T S	dif
S L E T P E D T A A P I L S Q	V17	211	225	315	dif
S L E T P E E T T A P I M T Q	V26	211	225	206	dif
			227	S P	dif
T P E D T A A P I L S Q G P L	V17	214	228	316	dif
T P E E T T A P I M T Q G S L	V26	214	228	207	dif
D T A A P I L S Q G P L Y N D	V17	217	231	317	dif
E T T A P I M T Q G S L Y N D	V26	217	231	208	dif
A P I L S Q G P L Y N D S L A	V17	220	234	318	dif
A P I M T Q G S L Y N D S L S	V26	220	234	209	dif
			234	S A	dif
			236	N S	dif
L S Q G P L Y N D S L A T S D	V17	223	237	319	dif
M T Q G S L Y N D S L S T N D	V26	223	237	210	dif
G P L Y N D S L A T S D F K S	V17	226	240	320	dif
G S L Y N D S L S T N D F K S	V26	226	240	211	dif
Y N D S L A T S D F K S I L L	V17	229	243	321	dif
Y N D S L S T N D F K S I L L	V26	229	243	212	dif
S L A T S D F K S I L L G S T	V17	232	246	322	dif
S L S T N D F K S I L L G S T	V26	232	246	213	dif
			247	P Q	dif
T S D F K S I L L G S T Q L D	V17	235	249	323	dif
T N D F K S I L L G S T P L D	V26	235	249	214	dif
			251	A S	dif
F K S I L L G S T Q L D I S P	V17	238	252	324	dif
F K S I L L G S T P L D I A P	V26	238	252	215	dif
I L L G S T Q L D I S P D G A	V17	241	255	325	dif
I L L G S T P L D I A P D G A	V26	241	255	216	dif
			256	V I	dif
G S T Q L D I S P D G A I F Q	V17	244	258	326	dif
G S T P L D I A P D G A V F Q	V26	244	258	217	dif
			259	L M	dif
Q L D I S P D G A I F Q M D R	V17	247	261	327	dif
P L D I A P D G A V F Q L D R	V26	247	261	218	dif
I S P D G A I F Q M D R P L S	V17	250	264	328	dif
I A P D G A V F Q L D R P L S	V26	250	264	219	dif
D G A I F Q M D R P L S I D Y	V17	253	267	329	dif
D G A V F Q L D R P L S I D Y	V26	253	267	220	dif
			268	S K	dif
I F Q M D R P L S I D Y K L G	V17	256	270	330	dif
V F Q L D R P L S I D Y S L G	V26	256	270	221	dif
M D R P L S I D Y K L G T G D	V17	259	273	331	dif
L D R P L S I D Y S L G T G D	V26	259	273	222	dif
P L S I D Y K L G T G D V D R	V17	262	276	332	dif
P L S I D Y S L G T G D V D R	V26	262	276	223	dif

I D Y K L G T G D V D R A V Y	V17	265	279	333	dif
I D Y S L G T G D V D R A V Y	V26	265	279	224	dif
K L G T G D V D R A V Y W H L	V17	268	282	334	dif
S L G T G D V D R A V Y W H I	V26	268	282	225	dif
			282	I L	dif
T G D V D R A V Y W H L K K F	V17	271	285	335	dif
T G D V D R A V Y W H I K K F	V26	271	285	226	dif
V D R A V Y W H L K K F A G T	V17	274	288	336	dif
V D R A V Y W H I K K F A G N	V26	274	288	227	dif
			288	N T	dif
			290	G T	dif
A V Y W H L K K F A G T A T T	V17	277	291	337	dif
A V Y W H I K K F A G N A G T	V26	277	291	228	dif
W H L K K F A G T A T T P A G	V17	280	294	338	dif
W H I K K F A G N A G T P A G	V26	280	294	229	dif
K K F A G T A T T P A G W F R	V17	283	297	339	dif
K K F A G N A G T P A G W F R	V26	283	297	230	dif
A G T A T T P A G W F R W G I	V17	286	300	340	dif
A G N A G T P A G W F R W G I	V26	286	300	231	dif
A T T P A G W F R W G I W D N	V17	289	303	341	Idem
A G T P A G W F R W G I W D N	V26	289	303	232	Idem
P A G W F R W G I W D N F N K	V17	292	306	342	Idem
P A G W F R W G I W D N F N K	V26	292	306	233	Idem
W F R W G I W D N F N K T F T	V17	295	309	343	Idem
W F R W G I W D N F N K T F T	V26	295	309	234	Idem
W G I W D N F N K T F T D G I	V17	298	312	344	dif
W G I W D N F N K T F T D G V	V26	298	312	235	dif
			312	V I	dif
W D N F N K T F T D G I A Y Y	V17	301	315	345	dif
W D N F N K T F T D G V A Y Y	V26	301	315	236	dif
F N K T F T D G I A Y Y S D E	V17	304	318	346	dif
F N K T F T D G V A Y Y S D E	V26	304	318	237	dif
T F T D G I A Y Y S D E Q P R	V17	307	321	347	dif
T F T D G V A Y Y S D E Q P R	V26	307	321	238	dif
D G I A Y Y S D E Q P R Q I L	V17	310	324	348	dif
D G V A Y Y S D E Q P R Q I L	V26	310	324	239	dif
A Y Y S D E Q P R Q I L L P V	V17	313	327	349	Idem
A Y Y S D E Q P R Q I L L P V	V26	313	327	240	Idem
S D E Q P R Q I L L P V G T T	V17	316	330	350	Idem
S D E Q P R Q I L L P V G T V	V26	316	330	241	Idem
			330	V T	dif
			331	C F	dif
Q P R Q I L L P V G T T F T R	V17	319	333	351	dif
Q P R Q I L L P V G T V C T R	V26	319	333	242	dif
Q I L L P V G T T F T R V D A	V17	322	336	352	dif
Q I L L P V G T V C T R V D S	V26	322	336	243	dif
			336	S A	dif
			337	E G	dif
L P V G T T F T R V D A G N..	V17	325	339	353	dif
L P V G T V C T R V D S E N..	V26	325	339	244	dif

							1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325					

Peptide idem Sb1-Sb2

Peptide Injectés

							1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325					

3.2 Témoin et non spécifique

3.2.1 Non spécifique

Le remplacement du sérum par du tampon de dilution ou n’entraîne aucune fixation non spécifique

3.2.2 Témoin lapin

Le sérum de lapin avant injection de nodavirus n’entraîne aucune fixation

3.2.3 Témoin poisson (sero négatif : Noda, KLH, Peptides)

3.2.3.1 Représentation schématique

Reconnu																	Sb1	
Bien reconnu																	Sb2	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	238	241	244	247	250	253	256		
259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	289	292	295	298	301	304	307		
310	313	316	319	322	325	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31		
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82		
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133		
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184		
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235		
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286		
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325						1
4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52		
55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	85	88	91	94	97	100	103		
106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	136	139	142	145	148	151	154		
157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	187	190	193	196	199	202	205		

En réalité les sites reconnus par les témoins varient d’un poisson à l’autre.

3.2.3.2 *Détail de l'analyse*

R	I	F	Q	R	Y	T	V	E	T	L	E	F	E	V	V17	97	111	277
Q	R	Y	T	V	E	T	L	E	F	E	V	Q	P	M	V17	100	114	278
T	V	E	T	L	E	F	E	V	Q	P	M	C	P	A	V17	103	117	279
T	L	E	F	E	V	Q	P	M	C	P	A	N	T	G	V17	106	120	280
F	E	V	Q	P	M	C	P	A	N	T	G	G	G	Y	V17	109	123	281
Q	P	M	C	P	A	N	T	G	G	G	Y	V	A	G	V17	112	126	282
C	P	A	N	T	G	G	G	Y	V	A	G	F	L	P	V17	115	129	283

Q	R	Y	A	V	E	T	L	E	F	E	I	Q	P	M	V26	100	114	169
A	V	E	T	L	E	F	E	I	Q	P	M	C	P	A	V26	103	117	170
T	L	E	F	E	I	Q	P	M	C	P	A	N	T	G	V26	106	120	171
F	E	I	Q	P	M	C	P	A	N	T	G	G	G	Y	V26	109	123	172
Q	P	M	C	P	A	N	T	G	G	G	Y	V	A	G	V26	112	126	173

QPNCPA semble être le motif commun mais il n'est pas reconnu sur le 103 et 112 Sb2 et sur le 109 et 112 Sb1

D	A	L	Q	A	T	R	G	A	V	V	G	K	W	W	V17	139	153	291
Q	A	T	R	G	A	V	V	G	K	W	W	E	S	R	V17	142	156	292
R	G	A	V	V	G	K	W	W	E	S	R	T	V	R	V17	145	159	293
V	V	G	K	W	W	E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	V17	148	162	294
K	W	W	E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	T	R	T	V17	151	165	295

D	A	L	Q	A	T	R	G	A	V	V	A	K	W	W	V26	139	153	182
Q	A	T	R	G	A	V	V	A	K	W	W	E	S	R	V26	142	156	183
R	G	A	V	V	A	K	W	W	E	S	R	T	V	R	V26	145	159	184
V	V	A	K	W	W	E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	V26	148	162	185
K	W	W	E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	T	R	T	V26	151	165	186

La partie commune est KWWESR, pourquoi 145 Sb2 et 148 Sb2 et Sb1 ne sont pas Reconnus ?

Le 151 doit être reconnu par 2 zones KWWEST et TRT

R	G	A	V	V	G	K	W	W	E	S	R	T	V	R	V17	145	159	293
V	V	G	K	W	W	E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	V17	148	162	294
K	W	W	E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	T	R	T	V17	151	165	295
E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	T	R	T	M	L	W	V17	154	168	296
T	V	R	P	Q	Y	T	R	T	M	L	W	T	S	T	V17	157	171	297
P	Q	Y	T	R	T	M	L	W	T	S	T	G	K	E	V17	160	174	298
T	R	T	M	L	W	T	S	T	G	K	E	Q	R	L	V17	163	177	299

R	G	A	V	V	A	K	W	W	E	S	R	T	V	R	V26	145	159	184
V	V	A	K	W	W	E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	V26	148	162	185
K	W	W	E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	T	R	T	V26	151	165	186
E	S	R	T	V	R	P	Q	Y	T	R	T	L	L	W	V26	154	168	187

T	V	R	P	Q	Y	T	R	T	L	L	W	T	S	S	V26	157	171	188
P	Q	Y	T	R	T	L	L	W	T	S	S	G	K	E	V26	160	174	189
T	R	T	L	L	W	T	S	S	G	K	E	Q	R	L	V26	163	177	190
L	L	W	T	S	S	G	K	E	Q	R	L	T	S	P	V26	166	180	191
T	S	S	G	K	E	Q	R	L	T	S	P	G	R	L	V26	169	183	192

le motif commun semble être TRT, mais ne se fixe pas sur le 154 et 157 Sb2 qui

possède TRT seule différence avec 154 et 157 Sb1 L à la place de M

TRT n'existe pas ailleurs sur les 2 virus

Pour 163,166,169 on retrouve LWTS et G KE LWTS est plus probable car le 169 (GKE) n'est pas reconnu

T	S	T	G	K	E	Q	R	L	T	S	P	G	R	F	V17	169	183	301
G	K	E	Q	R	L	T	S	P	G	R	F	I	L	L	V17	172	186	302
Q	R	L	T	S	P	G	R	F	I	L	L	C	V	G	V17	175	189	303
T	S	P	G	R	F	I	L	L	C	V	G	S	N	T	V17	178	192	304
G	R	F	I	L	L	C	V	G	S	N	T	D	V	V	V17	181	195	305
I	L	L	C	V	G	S	N	T	D	V	V	N	V	S	V17	184	198	306

T	S	S	G	K	E	Q	R	L	T	S	P	G	R	L	V26	169	183	192
G	K	E	Q	R	L	T	S	P	G	R	L	I	L	L	V26	172	186	193
Q	R	L	T	S	P	G	R	L	I	L	L	C	V	G	V26	175	189	194
T	S	P	G	R	L	I	L	L	C	V	G	N	N	T	V26	178	192	195
G	R	L	I	L	L	C	V	G	N	N	T	D	V	V	V26	181	195	196
I	L	L	C	V	G	N	N	T	D	V	V	N	V	S	V26	184	198	197

Y	N	D	S	L	A	T	S	D	F	K	S	I	L	L	V17	229	243	321
S	L	A	T	S	D	F	K	S	I	L	L	G	S	T	V17	232	246	322
T	S	D	F	K	S	I	L	L	G	S	T	Q	L	D	V17	235	249	323
F	K	S	I	L	L	G	S	T	Q	L	D	I	S	P	V17	238	252	324
I	L	L	G	S	T	Q	L	D	I	S	P	D	G	A	V17	241	255	325

Y	N	D	S	L	S	T	N	D	F	K	S	I	L	L	V26	229	243	212
S	L	S	T	N	D	F	K	S	I	L	L	G	S	T	V26	232	246	213
T	N	D	F	K	S	I	L	L	G	S	T	P	L	D	V26	235	249	214
F	K	S	I	L	L	G	S	T	P	L	D	I	A	P	V26	238	252	215
I	L	L	G	S	T	P	L	D	I	A	P	D	G	A	V26	241	255	216

A	Y	Y	S	D	E	Q	P	R	Q	I	L	L	P	V	V17	313	327	349
S	D	E	Q	P	R	Q	I	L	L	P	V	G	T	T	V17	316	330	350
Q	P	R	Q	I	L	L	P	V	G	T	T	F	T	R	V17	319	333	351
Q	I	L	L	P	V	G	T	T	F	T	R	V	D	A	V17	322	336	352

A	Y	Y	S	D	E	Q	P	R	Q	I	L	L	P	V	V26	313	327	240
S	D	E	Q	P	R	Q	I	L	L	P	V	G	T	V	V26	316	330	241
Q	P	R	Q	I	L	L	P	V	G	T	V	C	T	R	V26	319	333	242
Q	I	L	L	P	V	G	T	V	C	T	R	V	D	S	V26	322	336	243
L	P	V	G	T	V	C	T	R	V	D	S	E	N		V26	325	339	244

La partie commune entre 175, 178, 181 Sb1 et 175 Sb2 est ILL CVG. Cette partie ne se retrouve pas sur le virus entier ou par triplet sauf ILL qui se retrouve du 229 au 241 Sb1 et Sb2; 313 à 322 Sb1 et Sb2 qui ne sont pas reconnus sauf 319 et 322 mais le 325 ne contenant pas ILL est reconnu donc c'est probablement CVG qui est reconnu bien que 178,181 Sb2 et 184 SB1 et Sb2 ne soient reconnus pour 319,322,325 Sb2 c'est PVGTVC qui doit être reconnu et surtout TVC

G	R	F	I	L	L	C	V	G	S	N	T	D	V	V	V17	181	195	305
I	L	L	C	V	G	S	N	T	D	V	V	N	V	S	V17	184	198	306
C	V	G	S	N	T	D	V	V	N	V	S	V	L	C	V17	187	201	307
S	N	T	D	V	V	N	V	S	V	L	C	R	W	S	V17	190	204	308
D	V	V	N	V	S	V	L	C	R	W	S	V	A	L	V17	193	207	309
N	V	S	V	L	C	R	W	S	V	A	L	S	V	P	V17	196	210	310
V	L	C	R	W	S	V	A	L	S	V	P	S	L	E	V17	199	213	311

G	R	L	I	L	L	C	V	G	N	N	T	D	V	V	V26	181	195	196
I	L	L	C	V	G	N	N	T	D	V	V	N	V	S	V26	184	198	197
C	V	G	N	N	T	D	V	V	N	V	S	V	L	C	V26	187	201	198
N	N	T	D	V	V	N	V	S	V	L	C	R	W	S	V26	190	204	199
D	V	V	N	V	S	V	L	C	R	W	S	V	R	L	V26	193	207	200
N	V	S	V	L	C	R	W	S	V	R	L	S	V	P	V26	196	210	201
V	L	C	R	W	S	V	R	L	S	V	P	S	L	E	V26	199	213	202

Le 193et 196 Sb2 sont légèrement+

K	L	G	T	G	D	V	D	R	A	V	Y	W	H	L	Sb1	268	282	334
T	G	D	V	D	R	A	V	Y	W	H	L	K	K	F	Sb1	271	285	335
V	D	R	A	V	Y	W	H	L	K	K	F	A	G	T	Sb1	274	288	336
A	V	Y	W	H	L	K	K	F	A	G	T	A	T	T	Sb1	277	291	337
W	H	L	K	K	F	A	G	T	A	T	T	P	A	G	Sb1	280	294	338
K	K	F	A	G	T	A	T	T	P	A	G	W	F	R	Sb1	283	297	339
S	L	G	T	G	D	V	D	R	A	V	Y	W	H	I	Sb2	268	282	225
T	G	D	V	D	R	A	V	Y	W	H	I	K	K	F	Sb2	271	285	226
V	D	R	A	V	Y	W	H	I	K	K	F	A	G	N	Sb2	274	288	227
A	V	Y	W	H	I	K	K	F	A	G	N	A	G	T	Sb2	277	291	228
W	H	I	K	K	F	A	G	N	A	G	T	P	A	G	Sb2	280	294	229
K	K	F	A	G	N	A	G	T	P	A	G	W	F	R	Sb2	283	297	230

Seul le 280 est marqué KKFAG ou TPAG

PAG se retrouve en 70 Sb2 mais n'est pas reconnu

Il y a reconnaissance de certains peptides par les sérums témoins, faiblement sauf pour 151 chez Sb1 et 160 chez Sb2. Les IgM, peu spécifiques se fixent un peu partout. Ceci est confirmé par une reconnaissance des peptides proches mais non identiques (séquence 142-175)

3.2.4 Sèrum de poisson injecté KLH

Reconnu				Sb1												
Bien reconnu				Sb2												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	238	241	244	247	250	253	256
259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	289	292	295	298	301	304	307
310	313	316	319	322	325	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325				1
4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52
55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	85	88	91	94	97	100	103
106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	136	139	142	145	148	151	154
157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	187	190	193	196	199	202	205

De nombreux sites nouveaux en plus de ceux du témoin poisson apparaissent. La KLH est une très grosse molécule est peut potentiellement posséder des sites communs avec le noda, mais le plus probable est que les IgM sont peu spécifiques. 4.3. Sèrum de poisson injecté avec une des extrémités (Cter ou Nter)

3.2.5 Sèrum de poisson injecté C-ter

Sb1													Reconnu										
Sb2													Bien reconnu										
C-Ter													1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82							
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133							
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184							
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235							
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286							
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325											
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82							
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133							
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184							
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235							
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286							
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325											

Le C-ter n'est pas reconnu alors qu'il l'est en ELISA.

3.2.6 Sérum de poisson injecté N-ter

Sb1																
Sb2																
Reconnu				Blanc: <i>reconnu KLH ou Témoin</i>												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	238	241	244	247	250	253	256
259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	289	292	295	298	301	304	307
310	313	316	319	322	325	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325				1
4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52
55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	85	88	91	94	97	100	103
106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	136	139	142	145	148	151	154
157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	187	190	193	196	199	202	205

Sb2 1,4,7,10,28,31,34,**103**,112,115,**169**,**268**,

Sb1 1,4,7,10,**13**,28,31,34,37,**58**,112,115

Dans Sb1 les AA 288;289;290;291 TATT idem que 12;13;14;15. Cette séquence est reconnue par KLH, ce qui explique la légère positivité du N-ter Sb1 4 à 13 sur la Mb KLH et la positivité du Sb1 13 alors qu'il n'a que 2 AA du N-ter, de fait il est reconnu par le TATT de la KLH. Le Sb2 13 n'est pas reconnu car il n'a pas ce motif

Contrairement au C-ter le N-Ter est bien reconnu et mieux pour le N-ter Sb1 que pour le N-ter-Sb2 ce qui est normal puisque c'est celui injecté.

Nous sommes en présence d'un problème purement de technique de fabrication de membrane. La fixation à la membrane se fait par le C-terminal et par le N-terminal à la KLH, donc celui-ci n'est pas accessible sur la membrane

3.3 Sérums d'animaux injectés Sb1 ou Sb2

3.3.1 Sérum de poisson Challenge Sb1

Reconnu				Sb1				Sb2								
Bien reconnu																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	238	241	244	247	250	253	256
259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	289	292	295	298	301	304	307
310	313	316	319	322	325	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325				1
4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52
55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	85	88	91	94	97	100	103
106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	136	139	142	145	148	151	154
157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	187	190	193	196	199	202	205

3.3.2 Sérum de poisson survivant challengé Sb2

Reconnu				Sb1				Sb2								
Bien reconnu																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	238	241	244	247	250	253	256
259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	289	292	295	298	301	304	307
310	313	316	319	322	325	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325				1
4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52
55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	85	88	91	94	97	100	103
106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	136	139	142	145	148	151	154
157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	187	190	193	196	199	202	205

3.3.3 Sérum de lapin injecté Sb1

3.3.3.1 Représentation schématique

Reconnu						Sb1											
Bien reconnu						Sb2											
						1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325					

						1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82	
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	115	118	121	124	127	130	133	
136	139	142	145	148	151	154	157	160	163	166	169	172	175	178	181	184	
187	190	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235	
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	268	271	274	277	280	283	286	
289	292	295	298	301	304	307	310	313	316	319	322	325					

3.3.3.2 Détail de l'analyse

																Vir	1°	Der
C	P	A	N	T	G	G	G	Y	V	A	G	F	L	P		Sb1	115	129
C	P	A	N	T	G	G	G	Y	V	A	G	F	L	P		Sb2	115	129
N	T	G	G	G	Y	V	A	G	F	L	P	D	P	T		Sb1	118	132
N	T	G	G	G	Y	V	A	G	F	L	P	D	P	T		Sb2	118	132
G	G	Y	V	A	G	F	L	P	D	P	T	D	N	D		Sb1	121	135
G	G	Y	V	A	G	F	L	P	D	P	T	D	N	D		Sb2	121	135
V	A	G	F	L	P	D	P	T	D	N	D	H	T	F		Sb1	124	138
V	A	G	F	L	P	D	P	T	D	N	D	H	T	F		Sb2	124	138
F	L	P	D	P	T	D	N	D	H	T	F	D	A	L		Sb1	127	141
F	L	P	D	P	T	D	N	D	H	T	F	D	A	L		Sb2	127	141
D	P	T	D	N	D	H	T	F	D	A	L	Q	A	T		Sb1	130	144
D	P	T	D	N	D	H	T	F	D	A	L	Q	A	T		Sb2	130	144
V	A	L	S	V	P	S	L	E	T	P	E	D	T	A		Sb1	205	219
V	R	L	S	V	P	S	L	E	T	P	E	E	T	T		Sb2	205	219
S	V	P	S	L	E	T	P	E	D	T	A	A	P	I		Sb1	208	222
S	V	P	S	L	E	T	P	E	E	T	T	A	P	I		sb2	208	222
S	L	E	T	P	E	D	T	A	A	P	I	L	S	Q		Sb1	211	225
S	L	E	T	P	E	E	T	T	A	P	I	M	T	Q		sb2	211	225
T	P	E	D	T	A	A	P	I	L	S	Q	G	P	L		Sb1	214	228
T	P	E	E	T	T	A	P	I	M	T	Q	G	S	L		Sb2	214	228
D	T	A	A	P	I	L	S	Q	G	P	L	Y	N	D		Sb1	217	231
E	T	T	A	P	I	M	T	Q	G	S	L	Y	N	D		Sb2	217	231
A	P	I	L	S	Q	G	P	L	Y	N	D	S	L	A		Sb1	220	234
A	P	I	M	T	Q	G	S	L	Y	N	D	S	L	S		sb2	220	234

L	S	Q	G	P	L	Y	N	D	S	L	A	T	S	D	Sb1	223	237
M	T	Q	G	S	L	Y	N	D	S	L	S	T	N	D	sb2	223	237
G	P	L	Y	N	D	S	L	A	T	S	D	F	K	S	Sb1	226	240
G	S	L	Y	N	D	S	L	S	T	N	D	F	K	S	sb2	226	240
Y	N	D	S	L	A	T	S	D	F	K	S	I	L	L	Sb1	229	243
Y	N	D	S	L	S	T	N	D	F	K	S	I	L	L	sb2	229	243
S	L	A	T	S	D	F	K	S	I	L	L	G	S	T	Sb1	232	246
S	L	S	T	N	D	F	K	S	I	L	L	G	S	T	sb2	232	246
T	S	D	F	K	S	I	L	L	G	S	T	Q	L	D	Sb1	235	249
T	N	D	F	K	S	I	L	L	G	S	T	P	L	D	sb2	235	249
F	K	S	I	L	L	G	S	T	Q	L	D	I	S	P	Sb1	238	252
F	K	S	I	L	L	G	S	T	P	L	D	I	A	P	sb2	238	252
I	L	L	G	S	T	Q	L	D	I	S	P	D	G	A	Sb1	241	255
I	L	L	G	S	T	P	L	D	I	A	P	D	G	A	Sb2	241	255
G	S	T	Q	L	D	I	S	P	D	G	A	I	F	Q	Sb1	244	258
G	S	T	P	L	D	I	A	P	D	G	A	V	F	Q	Sb2	244	258
Q	L	D	I	S	P	D	G	A	I	F	Q	M	D	R	Sb1	247	261
P	L	D	I	A	P	D	G	A	V	F	Q	L	D	R	sb2	247	261
I	S	P	D	G	A	I	F	Q	M	D	R	P	L	S	Sb1	250	264
I	A	P	D	G	A	V	F	Q	L	D	R	P	L	S	sb2	250	264
D	G	A	I	F	Q	M	D	R	P	L	S	I	D	Y	Sb1	253	267
D	G	A	V	F	Q	L	D	R	P	L	S	I	D	Y	sb2	253	267
I	F	Q	M	D	R	P	L	S	I	D	Y	K	L	G	Sb1	256	270
V	F	Q	L	D	R	P	L	S	I	D	Y	S	L	G	sb2	256	270
P	A	G	W	F	R	W	G	I	W	D	N	F	N	K	Sb1	292	306
P	A	G	W	F	R	W	G	I	W	D	N	F	N	K	Sb2	292	306
W	F	R	W	G	I	W	D	N	F	N	K	T	F	T	Sb1	295	309
W	F	R	W	G	I	W	D	N	F	N	K	T	F	T	sb2	295	309
W	G	I	W	D	N	F	N	K	T	F	T	D	G	I	Sb1	298	312
W	G	I	W	D	N	F	N	K	T	F	T	D	G	V	sb2	298	312
W	D	N	F	N	K	T	F	T	D	G	I	A	Y	Y	Sb1	301	315
W	D	N	F	N	K	T	F	T	D	G	V	A	Y	Y	sb2	301	315

Les reconnaissances sont très nettes. Le Sb1 est mieux reconnu (6 peptides de plus reconnus et 5 mieux reconnus) que le Sb2 ce qui est normal Sb1 est l'antigène injecté.

La Boucle1 prévue par les logiciels mammifère est bien reconnue par le lapin et non le loup. Les logiciels « mammifère » sont efficaces mais leur extrapolation au poisson doit se faire avec prudence.

3.4 Différence de reconnaissance

3.4.1 En fonction de l'espèce recevant l'antigène

Loup : DL, lapin :Rb

						DL	DL	DL	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	Rb	Rb	Rb	Rb	Rb	Rb	133
136	DL	142	145	DL	151	154	157	160	163	DL	169	172	175	178	181	184
187	190	193	196	199	202	Rb										
Rb	Rb	Rb	Rb	Rb	Rb	DL	259	262	265	DL	DL	DL	277	280	DL	DL
289	DL	D-R	D-R	D-R	304	307	310	313	316	319	322	325				

						DL	DL	DL	DL	13	16	19	22	25	DL	DL
DL	DL	40	43	46	49	52	55	DL	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	106	109	112	Rb	Rb	Rb	Rb	Rb	Rb	133
136	DL	142	DL	DL	151	DL	DL	160	163	166	169	172	175	178	181	184
187	190	DL	DL	DL	202	Rb										
Rb	259	262	265	DL	271	274	DL	280	DL	DL						
289	292	D-R	Rb	Rb	304	307	310	313	316	319	322	325				

3.4.2 En fonction de l'antigène injecté

Abréviation des antigènes :

Nodavirus :Sb1; Sb2

Sb1 et Sb2 : S1-2

Ctl : control

						Sb1	Sb1	Sb1	10	13	16	19	22	25	28	31
34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	ctl	ctl	109	112	115	118	121	124	127	130	133
136	Sb2	ctl	ctl	Sb2	ctl	ctl	ctl	ctl	ctl	S1-2	169	172	ctl	ctl	ctl	184
ctl	ctl	ctl	ctl	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235
238	241	244	247	250	253	Sb1	259	262	265	Sb1	S1-2	S1-2	ctl	ctl	S1-2	S1-2
289	Sb1	Sb1	Sb1	Sb1	304	307	310	313	316	319	322	325				

						Sb1	Sb1	Sb1	Sb1	13	16	19	22	25	Sb1	Sb1
Sb1	Sb1	40	43	46	49	52	55	Sb1	61	64	67	70	73	76	79	82
85	88	91	94	97	100	103	ctl	ctl	112	115	118	121	124	127	130	133
136	Sb2	ctl	S1-2	S1-2	ctl	Sb2	S1-2	ctl	ctl	ctl	169	172	ctl	178	181	184
187	190	Sb2	Sb2	Sb2	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229	232	235
238	241	244	247	250	253	256	259	262	265	Sb2	ctl	ctl	S1-2	ctl	Sb1	Sb1
Sb1	Sb1	Sb1	298	301	304	307	310	313	316	ctl	ctl	ctl				

3.5 Récapitulatif

0	N° du 1°aa; i peptide idem Sb1 et Sb2
C-ter N-ter	C-ter: aa 1-15
Lp2 KLH	N-ter:aa 325-338
Rab Ctrl	Boucle 1(Lp1): aa 127-140 (idem Sb1 et Sb2)
Sb1 Sb2	Boucle 2 (Lp2) aa 266-279
	Rab: Lapin
0	KLH: témoin négatif
C-ter N-ter	Ctl: témoin non-injecté
Lp2 KLH	
Rab Ctrl	
Sb1 Sb2	

1 N-ter	4 N-ter	7 N-ter	10 N-ter	13	28 N-ter	31 N-ter	34 N-ter
Sb1	Sb1	Sb1	Sb1		Sb1	Sb1	Sb1

1 N-ter	4 N-ter	7 N-ter	10 N-ter	13	28 N-ter	31 N-ter	34 N-ter
Sb1	Sb1	Sb1			Sb1		Sb1

37 KLH	40 C-ter KLH	43 i C-ter	46 i KLH	49 i KLH	52 i	58
Sb1	Sb1					Sb1
37 N-ter	40 Sb1	43 i KLH	46 C-ter KLH	49 KLH	52 KLH	58 N-ter
			Sb1			Sb1

91 C-ter	94 C-ter	97 C-ter	100	103 Lp2 N-ter	106 Lp2 C-ter	109 Lp2 C-ter	112 i Lp2 N-ter
-------------	-------------	-------------	-----	---------------------	---------------------	---------------------	-----------------------

91	94	97	100	103 C-ter Lp2	106 N-ter Lp2	109 C-ter Lp2	112 i N-ter Lp2
----	----	----	-----	---------------------	---------------------	---------------------	-----------------------

115 i N-ter	118 i	121 i	124 i	127 i	130 i
Rab	Rab	Rab	Rab	Rab	Rab

115 i N-ter	118 i	121 i	124 i	127 i	130 i
Rab	Rab	Rab	Rab	Rab	Rab

139	142 C-ter	145 C-ter	148 C-ter	151 C-ter	154	157	160 C-ter
KLH	KLH	KLH	KLH	Lp2 KLH Ctrl	KLH	KLH	KLH
Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb2	Sb2	Sb1 Sb2

139	142 C-ter	145 C-ter	148 C-ter	151 C-ter	154 C-ter	157 C-ter	160 C-ter
KLH	Lp2 KLH Ctrl	Lp2 KLH Ctrl	KLH	Lp2 KLH Ctrl	KLH	Lp2 KLH	Lp2 KLH Ctrl
Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2

163 C-ter	166 C-ter	169 N-ter	172	175	178	181	184	187
KLH KLH	KLH			Lp2				
Sb1 Sb2	Sb1	Sb1		Sb2				

163 C-ter	166 C-ter	169 N-ter	172	175 C-ter	178	181	184	187
Lp2 KLH Ctrl	Lp2 KLH	KLH		Lp2 KLH	Lp2	Lp2		
Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1		Sb2				

190	193	196	199	202	205	208	211
Lp2 KLH Ctrl	Lp2 KLH	KLH				Rab	Rab
Sb2	Sb2	Sb2					

190	193	196	199	202	205	208	211
					Rab	Rab	Rab
Sb1	Sb1						

214	217	220	223	226	229	232	235	238
		Rab						

214	217	220	223	226	229	232	235	238
Rab								

241	244	247	250	253	256	259	262	265
		Rab	Rab	Rab	Rab			

241	244	247	250	253	256	259	262	265
Rab	Rab	Rab	Rab	Rab	Rab Sb1			

268	271	274	277	280	283	286	289 i
N-ter	KLH	C-ter KLH	C-ter KLH	C-ter KLH Ctrl	KLH	KLH	KLH
Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1	Sb1	

268	271	274	277	280	283	286	289 i
N-ter KLH	KLH	C-ter KLH	C-ter KLH	C-ter KLH Ctrl	KLH	KLH	KLH
Sb1	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	Sb1 Sb2	

292 i	295 i	298	301
KLH	Rab	KLH	Rab
Sb1	Sb1		

292 i	295 i	298	301
Rab	Rab	Rab	Rab
Sb1	Sb1	Sb1	Sb1

4 Discussion

4.1 Etude théorique

L'apparence homogénéité de séquences entre Sb1 et Sb2 (39/339 soit 11,5% a.a différent) est une représentation très optimiste de la différence de structures planes entre les 2 virus. Tout en restant sur une représentation plane qui est celle de la membrane on passe à 80/109 peptides différents (72%). Ces simples constatations théoriques laissent présager des différences encore plus importantes au niveaux des structures spatiales qui sont prépondérantes dans le caractère immunogénique de la protéine.

4.2 Adaptation de la méthode au poisson :

Les problèmes d'adaptation stricts de la technique « mammifère » au poisson furent complexes mais habituels et prévisibles. Ils furent amplifiés par l'absence de précédent et de témoin qu'il soit positif ou négatif.

Il est apparu d'autres problèmes tel que :

- Le nombre limité de régénérations possibles de la membrane (environ 20 prévus) fut encore réduit par l'utilisation de sérum complet contenant inévitablement des substances (enzyme ou autre) accélérant la dégradation des peptides de la membrane.

- Le volume nécessaire à l'incubation de la membrane (30-35 cm³) en regard de la dilution (1/400) et des volumes de sérum disponible (50 à 200 µL). Ceci rendait impossible toute confirmation sur un même sérum et joutait la variabilité individuelle comme source d'incertitude

4.3 Difficultés liées à la membrane

Des problèmes techniques liés à la conception de la membrane appurent :

- L'ancrage à la membrane par le COOH du peptide rendait impossible la reconnaissance du C-ter contrairement au N-ter. Il suffirait (comme pour les liaisons à la protéine porteuse) de choisir le sens de fixation. Opération supplémentaire mais maîtrisée.

Pour le C-ter nous ne pouvons rien conclure à ce sujet : non existence d'anticorps ou simple absence de mise en évidence ?

- Le coût de la membrane, qui est d'environ 3800 Euros soit 200 Euros par sérum.

4.4 Absence de vrai témoin négatif

Aucune liaison non spécifique sensus stricto ne fut constatée lors du remplacement du sérum par du diluant. Par contre les sérums de poisson strictement séronégatif (noda, KLH, Peptide) en ELISA se fixent sur certains peptides, contrairement au sérum de lapin avant injection.

4.5 Reconnaissance aléatoire

De nombreuses reconnaissances « anormales » pourraient s'expliquer ponctuellement par une possible immunité croisée, mais aucune ne résiste à l'analyse globale des différents cas. L'hypothèse la plus probable est une mauvaise spécificité, déjà connue, des Immunoglobulines de poisson qui se fixent d'une façon aléatoire et/ou labiles. Ceci est amplifié par une variabilité individuelle entre poisson. Les Peptides 103 à 112 répondent à Cter, Nter, Lp2* mais ne possèdent pas de motif commun avec ces antigènes, il est possible que ces peptides soient déjà reconnus par les individus avant l'injection de ces antigènes.

*Lp2 (traitée uniquement dans le récapitulatif)

4.6 Différence entre les espèces

Les peptides reconnus par le loup et le lapin sont en général différents (sauf 5) et Sb1 et Sb2, on voit une fois de plus l'importance du processus de présentation de l'antigène selon les espèces.

La boucle 1(Lp1) prévue comme immunogène par les logiciels « mammifère » est reconnue par le lapin et non par le loup donc la valeur de ces logiciels n'est nullement en cause mais leur extrapolation à d'autres espèces doit être très prudente.

Cette différence entre espèce déjà connue est montrée ici entre le loup et le lapin permet d'expliquer l'impossibilité de concevoir un ELISA-compétition multi-espèces qui nous aurait affranchi de la production d'anticorps anti-immunoglobuline de chaque espèce à tester.

4.7 Différence Sb1 Sb2

Les peptides reconnus varient entre des sérums de poisson injecté Sb1 et Sb2, même lorsqu'ils sont identiques dans ce cas seul la structure du virus dans l'espace est en cause.

Tous les peptides reconnus par les sérums des poissons injectés Sb2 sont reconnus aussi par les sérums Sb1+ la réciproque étant fautive notamment sur le N-ter et sur les peptides 28 à 34.

De plus, à de rare exception près, les sites (ou des sites mitoyens) reconnus par les sérums Sb2+ sont reconnus par les contrôls ou par les KLH+. Soit ces sites correspondent à des anticorps croisant avec le nodavirus, soit, ils présentent une attraction particulière pour les IgM.

De toutes manières leurs caractères non discriminant les rendent sans intérêt pour le but recherché.

Les différences de structure prévues par l'analyse théorique des peptides communs se confirment et montre une première limite d'intérêt du % d'homologie des a.a.

5 Premières conclusions

Malgré quelques difficultés l'usage de cette méthode a pu être adaptée au poisson. Différentes modifications de fabrication de la membrane permettraient d'améliorer les résultats.

Le caractère peu spécifique des anticorps de poisson entraînant une « positivité » des sérums y compris des contrôles reste la pierre d'achoppement. Une solution potentielle serait une multiplication des analyses de manière à dégager statistiquement les sites réellement concernés. Un travail complémentaire pourrait être réalisé par l'incubation successive de différents sérums en supputant que la différence d'affinité permettent aux anticorps anti-noda de déplacer les anticorps « opportunistes ». Rien ne prouve que ce soit possible.

Ce type d'approche serait très long et onéreux (11h et 200 Euros par sérum traité)

Si cette méthode fut et peut être la source de nombreuses informations sur le virus elle ne correspond pas au but que nous recherchions, « trouver une méthode simple pour dégager des sites potentiellement immunogènes et protecteurs afin de produire des vaccins synthétiques ».

6 Bibliographie

Bittle J.L., Houghten R.A., Alexander H., Shinnick T.M., Sutcliffe J.G., Lerner R.A. Rowlands D.J., Brown F. (1982). Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* **298**(5869):30-3.

Coeurdacier J.L., Laporte F., Pepin J.F. Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy (*fish and shellfish immunol, in press*)

Comps M., Pepin J.F., Bonami JR (1994). Purification and characterisation of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **123**, 1-10.

Daniel L., Pau B., Granier .C (1998). Peptide Models of Immunological Recognition: Paratope Dissection by Multiple Peptide Synthesis. *Clin Chem Lab Med* **36**(6):367-371

Delsert C., Morin N., Comps M. (1997). A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. *Archive of Virology* **142**, (12):2359-71.

Emmenegger E., Huang C., Landolt M., LaPatra S., Winton J. (1995). Immune response to synthetic peptides representing antigenic sites on glycoprotein of the infectious hematopoietic necrosis virus. *Veterinary Research* **26**, 374-378.

Emmenegger E., Landolt M., LaPatra S., Winton J. (1997). Immunogenicity of synthetic peptides representing antigenic determinants on the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein. *Disease of Aquatic Organisms* **28**, 3, 175-184.

Flynn J.N., Harkiss G.D., Doel T., DiMarchi R. (1990). Analysis of immune responses in the sheep to synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus using ovine polyclonal and monoclonal antibodies. *Immunology* **69**, (1):1-7.

Frank R (1992). Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**:9217-9232

Martens W., Greiser-Wilke I., Harder T.C., Dittmar K., Frank R., Orvell C., Moennig V., Liess B. (1995). Spot synthesis of overlapping peptides on paper membrane supports enables the identification of linear monoclonal antibody binding determinants on morbillivirus phosphoproteins. *Veterinary Microbiology* **44**, (2-4):289-98 .

Patarroyo M.E., Romero P., Torres M.L., Clavijo P., Moreno A., Martinez A., Rodriguez R., Guzman F., Cabezas E. (1987). Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* **13-19**;328(6131):629-32.

Roggero M.A., Weilenmann C., Bonelo A., Audran R., Renggli J., Spertini F., Corradin G., Lopez JA. (1999). *Plasmodium falciparum* CS C-terminal fragment: preclinical evaluation and phase I clinical studies. *Parasitologia* **41**, (1-3):421-4.

Thiéry R., Arnauld C., Delsert C. (1999). Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *Journal of Fish Diseases* **22**, 201-207.

Thornton J.M., Edwards M.S., Taylor W.R., Barlow D.J. (1986). Location of continuous antigenic determinant in protruding regions of proteins. *European Molecular Biology Journal* (2), 409-13.

Toranzo A.E.; Devesa S.; Romalde, J.L.; Lamas J.; Riaza A.; Leiro J., Barja J.L. (1995). Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. infection in turbot. *Aquaculture*, **134**, 1-2, 17-27 .

7 Annexes

7.1 Protocole de révélation et de régénération de la membrane (Annexe 1)

Cartographie

Etape Réactif	Vol rct	durée	X fois	T°	Vol Tot	Tps tot	S.M
1 TBS	30	10	3	TA	90	30	TBS10x R2
2 Bloking	30	1 nuit	1	TA	30	1 nuit	BB R5
3 T-TBS	30	10	1	TA	30	10	T-TBS R3
4 sérums	30	90	1	37°	30	90	échantillon
5 T-TBS	30	10	3	TA	90	30	T-TBS R3
6 E11Biot	30	90	1	37	30	90	E11B
7 T-TBS	30	10	3	TA	90	30	T-TBS R3

8 Strepta P A	30	30	1	37	30	30 Strep P A R4
9 T-TBS	30	10	2	TA	60	20 T-TBS R3
10 CBSpH7	30	10	2	TA	60	20 CBSpH7
11 Subtrat AP	30	30	1	TA	30	30 Sub AP R10
12 CBS pH7	30	10	2	TA	60	20 CBS pH7

Scaning de la membrane 30

Régénération de la membrane

H2O milli Q	30	10	3	TA	90	30
DMF	30	10	3	TA	90	30
H2O milli Q	30	10	3	TA	90	30
Regé A	30	10	3	TA	90	30
Rég2 B	30	10	3	TA	90	30
Méthanol	30	10	3	TA	90	30
Séchage air froid						30
Temps Total mini						640 mn
						11 heures

7.2 Réactifs peptid-spot (Annexe 2)

50 mMol Tris pH 8.5 Réactif 1

6,05 g Tris base pour 1 litre ajuster à pH 8.5 avec HCl

Stocker à 4°C

TBS pH 7,0 10X Réactif 2

NaCl 8 g

KCl 0,2g

Tris 6,1 g

Dissoudre dans approx 80 mL eau milli Q
Ajuster à pH= 7,0 avec HCl concentré

compléter à 100 mL

Stocker à 4°C

T-TBS pH 7,0 Réactif 3

1 L TBS pH 7,0

0,5 mL Tween 20

Stocker à 4°C

Streptavidine conjuguée Phosphatase Alcaline Réactif 4

Sigma 5795

Dissoudre dans 1ml de TBS pH 8 (soit 200-800 u/ml)

Aliquoter en 30 ou 50 µl

Stocker à -20°C

Blocking Buffer: BB Réactif 5

Blocking Buffer concentré 100mL

ref SU 07250 chez Eurornedex

Blocking buffer	30	50	100	150
Saccharose g	1.5	2.5	5	7.5
B.B. concentré	3	5	10	30
TBS	27	45	90	120

CBS pH 7,0 Réactif 6

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Citric acid monohydrate 2,1 g

Dissoudre dans approx 800 mL eau milli Q

Ajuster à pH= 7,0 avec de la soude

Compléter à IL

Conserver à 4°C

Solution stock MTT Réactif 7

100 mg Thiazolyl Blue

(Sigma M2128)

dissoudre dans 1,4 mL DMF + 0,6 mL eau

Aliquoter sous 120 µL

Stocker à - 20°C

Solution stock BCIP Réactif 8

120 mg BCIP disodium salt

5 bromo 4 Chloro 3 Indolyl Phosphate sigma B6149

Dissoudre dans 2 mL eau

Aliquoter sous 120 μL
Stocker à -20°C

1M MgCl 2 Réactif 9

Stocker à -20°C sous 150 μL

Substrat AP Réactif 10

Pour 30 et(50ml) de solution,

180 μL (300 μl)solution MTT R7

120 μL (200 μl)solution BCIP. R8

150 μL (250 μl)1 M M-C1₂ R9

Compléter à 30 ml avec CBS R6

Régénérant A Réactif 11

Urée: 480 gr

LDS: 10 gr (sodium Dodecyl Sulfate)

H₂O. milliQ: 500 mL

Après dissolution compléter cette. solution à 1 L H₂O milliQ et
ajouter 1 mL de Mercaptoethanol

Conservation à température ambiante

Régénérant B Réactif 12

Etanol: 500 mL

Acide Acétique: 100 mL

H₂O milliQ: 400 mL

Conservation à température ambiante

DiMethyl Formamide DMF Réactif 13

Sigma ref D 8654

8 Table des matières

1	Introduction	3
2	Matériel et Méthode	4
2.1	L'antigène	4
2.2	Sérums	4
2.3	Fabrication de la membrane Peptide Spot	5
2.4	Technique de révélation et de conservation	6
2.4.1	Révélation	6
2.4.2	Coloration	6
2.4.3	Conservation des résultats	6
2.4.4	Régénération de la membrane	6
2.5	Représentation schématique de la membrane	6
2.5.1	Image après scannage	7
2.5.2	Représentation de la membrane Numérotation fabricant	7
2.5.3	Représentation pour la comparaison du Sb1 et Sb2	8
3	Résultats	8
3.1	Similitude et différences des représentations linéaires de Sb1 et Sb2	8
3.1.1	Différence en acides aminés	8
3.1.2	Différences entre les peptides	9
3.2	Témoin et non spécifique	14
3.2.1	Non spécifique	14
3.2.2	Témoin lapin	14
3.2.3	Témoin poisson (sero négatif : Noda, KLH, Peptides)	14
3.2.3.1	Représentation schématique	14
3.2.3.2	Détail de l'analyse	15
3.2.4	Sèrum de poisson injecté KLH	18
3.2.5	Sérum de poisson injecté C-ter	18
3.2.6	Sérum de poisson injecté N-ter	19
3.3	Sérums d'animaux injectés Sb1 ou Sb2	20
3.3.1	Sérum de poisson Challenge Sb1	20
3.3.2	Sérum de poisson survivant challengé Sb2	20
3.3.3	Sérum de lapin injecté Sb1	21
3.3.3.1	Représentation schématique	21
3.3.3.2	Détail de l'analyse	21
3.4	Différence de reconnaissance	23
3.4.1	En fonction de l'espèce recevant l'antigène	23
3.4.2	En fonction de l'antigène injecté	23
3.5	Récapitulatif	24
4	Discussion	27
4.1	Etude théorique	27
4.2	Adaptation de la méthode au poisson :	27
4.3	Difficultés liées à la membrane	27
4.4	Absence de vrai témoin négatif	27
4.5	Reconnaissance aléatoire	28
4.6	Différence entre les espèces	28
4.7	Différence Sb1 Sb2	28
5	Premières conclusions	28
6	Bibliographie	29

7	Annexes	30
7.1	Protocole de révélation et de régénération de la membrane (Annexe 1)	30
7.2	Réactifs peptispot (Annexe 2)	31
8	Table des matières	34