

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de RELIZANE
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département : Sciences Biologiques



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en :
Microbiologie et contrôle de qualité

Intitulé

Vaccin multi épitope in silico contre *Brucella abortus*

Présenté par :

Mme : BENMAAZIZ Zina

Mme : BENMAAZIZ Afaf

Devant les membres de jury :

Président : Mme AZZOUZ Fatima

Maître de conférence (A) U. Relizane

Encadreur : Mme LAREF Nora

Maître de conférence (A) U. Relizane

Examineur : Mme HANIS Fouzia

Maître de conférence (B) U. Relizane

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous remercions ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous tenons à remercier notre encadrant Madame LAREF Nora pour ces précieux conseils et son aide durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à nos parents et nos familles pour leur soutien infaillible et leurs encouragements continus tout au long de nos années d'études et à travers le processus de recherche et d'écriture de ce mémoire.

Cette réalisation n'aurait pas été possible sans eux vous remercie.

Dédicace

Je dédie cet humble et modeste travail avec grand amour, sincérité et fierté:

A mes chers parents, source de tendresse et d'affection. Puisse cette étape constituer pour vous un motif de satisfaction.

A mes frères et mes sœurs, en témoignage de la fraternité, avec mes souhaits de bonheur, de santé et de succès.

Et à tous les membres de mes familles.

A tous mes amies, tous mes professeurs.

Et à tous ceux qui consultent ce modeste travail.

Zina et Afaf

Liste des tableaux

Tableau 1 : Identification par culture cellulaire des trois espèces de <i>Brucella</i> dangereuses pour l'homme	6
Tableau 2 : Les épitopes BCL.....	16
Tableau 3 : Les épitopes TCL.....	17
Tableau 4 : Les épitopes HTL.....	17

Liste des figures

Figure 1 : Coloration de Gram.....	5
Figure 2 : Coloration de Stamp.....	5
Figure 3 : Colonies de <i>Brucella abortus</i> qui ont été cultivées sur gélose de sang.....	6
Figure 4 : Gène de l'immunoglobuline B.....	9
Figure 5 : La séquence de protéine dans vaxijen.....	9
Figure 6 ; La base des données IEDB.....	10
Figure 7 : La prédiction des épitopes de lymphocyte B.....	10
Figure 8 : La prédiction CMHI.....	11
Figure 9 : La prédiction CMHII.....	11
Figure 10 : La prédiction de la structure 3D.....	12
Figure 11 : Correction de la qualité de la structure 3D.....	12
Figure 12 : La validation de vaccin.....	13
Figure 13 : Docking moléculaire.....	13
Figure 14 : Recherche de l'antigénécité.....	16
Figure 15 : La structure 3D de vaccin.....	19
Figure 16 : La structure 3D après la correction.....	19
Figure 17 : Test Ramachandran Plot.....	19
Figure 18 : Résultat de docking moléculaire.....	20

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

B : *Brucella*

LPS : Lipopolysaccharides

CO₂ : Dioxyde de carbone

Mb: Méga base

VFBD: Virulent Factor of Bacteria Database

IEDB : Immunue Epitope Database

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

HLA : Antigène leucocytaire humaine

TLR : Récepteur Toll Like

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Introduction.....1

Partie 1 : Rappel bibliographie

1. Historique.....3

2. Taxonomie.....4

3. Habitat de *Brucella*.....4

3.1. Système réticuloendothélial.....4

3.2. Système génito-urinaire.....4

3.3. Système ostéoarticulaire.....4

3.4. Système nerveux central.....4

3.5. Système cardiovasculaire.....4

4. Identification de *Brucella*.....5

4.1. Caractères morphologiques.....5

4.2. Caractères culturels.....5

4.3. Caractères biochimiques.....6

4.4. Caractères génomiques.....6

5. Les facteurs de virulence.....7

6. Traitement.....7

Partie 2 : Matériels et méthodes

1. Téléchargement de séquence.....	9
2. Recherche de l'antigénécité.....	9
3. Prédiction des épitopes.....	10
4. Recherche l'antigénécité des épitopes.....	11
5. Construction de vaccin.....	11
6. Prédiction de la structure 3D de vaccin.....	11
7. Docking moléculaire.....	13

Partie 3 : Résultats et discussion

1. Téléchargement de séquence.....	15
2. Recherche de l'antigénécité.....	15
3. Prédiction des épitopes.....	16
4. Construction de vaccin.....	18
5. Prédiction de la structure 3D de vaccin.....	18
6. Docking moléculaire.....	19
Conclusion.....	22
Références bibliographiques.....	24

Résumé

La brucellose est l'une des maladies endémiques dans le monde, et la vaccination apparaît comme une stratégie prometteuse pour la prévenir. Cette étude a utilisé des techniques informatiques avancées pour développer un puissant vaccin multi-épitopes contre la brucellose humaine. Des épitopes de *Brucella abortus*, choisis pour leur potentiel à induire des réponses cellulaires et humorales, ont montré une grande capacité antigénique. Des adjuvants ont été ajoutés pour améliorer l'immunogénicité du vaccin. Les propriétés physico-chimiques et immunologiques du vaccin ont été évaluées, et sa structure en 2D et 3D a été prédite. Le vaccin a été docké avec le récepteur TLR4 pour évaluer sa capacité à stimuler les réponses immunitaires innées, et la simulation immunitaire a révélé un profil de réponse post-injection prometteur. Le vaccin a montré une grande capacité à induire des réponses cellulaires contre la brucellose humaine, des propriétés physico-chimiques appropriées, une structure de haute qualité, et un fort potentiel pour l'expression dans un système procaryote.

Abstract

Brucellosis is one of the endemic diseases in the world, and vaccination appears to be a promising strategy for its prevention. This study used advanced computational techniques to develop a potent multi-epitope vaccine against human brucellosis. Epitopes from *Brucella abortus*, chosen for their potential to induce cellular and humoral responses, demonstrated significant antigenic capacity. Adjuvants were added to enhance the vaccine's immunogenicity. The physicochemical and immunological properties of the vaccine were evaluated, and its two- and three-dimensional structure was predicted. The vaccine was docked with the TLR4 receptor to assess its ability to stimulate innate immune responses, and immune simulation revealed a promising post-injection response profile. The designed vaccine showed a strong capacity to induce cellular responses against human brucellosis, appropriate physicochemical properties, a high-quality structure, and strong potential for expression in a prokaryotic system.

ملخص

البروسيل واحد من الأمراض المستوطنة في العالم، ويبدو أن التطعيم يعد استراتيجية واعدة للوقاية منها. استخدمت هذه الدراسة تقنيات حاسوبية متقدمة لتطوير لقاح متعدد الحواتم قوي ضد البروسيل البشرية. تم اختيار حواتم من *بروسيل إيبورتس* لقدرتها على تحفيز الاستجابات الخلوية والخلطية، وأظهرت قدرة مستضدية كبيرة. تم إضافة مساعدات لتحسين مناعة اللقاح. تم تقييم الخصائص الفيزيائية-الكيميائية والمناعية للقاح، وتنبأت بنيته في الأبعاد الثنائية والثلاثية. تم التحام لتقييم قدرته على تحفيز الاستجابات المناعية الفطرية، وكشفت المحاكاة المناعية عن نمط TLR4 اللقاح مع مستقبل استجابة واعد بعد الحقن. أظهر اللقاح قدرة كبيرة على تحفيز الاستجابات الخلوية ضد البروسيل البشرية، وخصائص فيزيائية-كيميائية مناسبة، وبنية عالية الجودة، وإمكانية قوية للتعبير في نظام بدائي النواة.

Introduction

Introduction

La brucellose, une maladie infectieuse humaine, est causée par des bactéries du genre *Brucella*. C'est la maladie la plus courante à l'échelle mondiale, ayant un impact économique considérable (Khettab et al., 2010).

Les thérapies contre la brucellose chez l'homme ne sont pas toujours efficaces, et divers éléments peuvent entraver leur efficacité. La brucellose peut évoluer vers une forme chronique, ce qui rend l'élimination totale de la bactérie plus complexe et demande des traitements prolongés et intensifs. Un problème de plus en plus important est la résistance aux antibiotiques, avec certaines souches de *Brucella* qui développent une résistance aux médicaments couramment utilisés. Malgré l'efficacité des traitements actuels, il est important de souligner que leur efficacité n'est pas assurée pour tous les patients, ce qui met en évidence l'importance d'efforts constants pour améliorer les stratégies thérapeutiques contre la brucellose.

Il est possible de préparer un vaccin inactivé en exposant l'agent pathogène à un traitement physique ou chimique qui entraîne une diminution définitive de sa virulence sans altérer son pouvoir immunogène. Il est essentiel de respecter scrupuleusement les conditions d'inactivation chimique ou thermique ainsi que les contrôles associés afin d'assurer l'absence totale de virulence.

Ce projet vise à développer un vaccin in silico contre la *Brucella abortus* en utilisant des épitopes (HTL, BCL, TCL).

La structure de ce mémoire est divisée en trois parties qui abordent la vaccination contre la bactérie *Brucella abortus* : - Partie 1 : Analyse bibliographique de la bactérie. - Partie 2 : Équipements et techniques employés lors de cette étude. - Partie 3 : Exposé et échange sur les résultats obtenus.

Partie 1

Rappel

bibliographie

1. Historique

Les médecins militaires britanniques ont découvert la brucellose pour la première fois en 1850, à Malte, sous le nom de fièvre méditerranéenne. Le microbiologiste David Bruce a découvert en 1887 la bactérie causatrice de la maladie à partir de la rate d'un soldat décédé, démontrant ainsi la corrélation entre un micro-organisme nommé *Micrococcus melitensis* et la maladie (**Dedet, 2007**).

En 1897, Wright a montré que le sérum des malades contient des anticorps agglutinants, ce qui a donné son nom au premier test diagnostique sérologique : la réaction d'agglutination de Wright. Zammit (1905) a révélé que la maladie était présente chez les chèvres à Malt, toutes ayant été positives au test de Wright. Les méthodes bactériologiques développées par Huddleson en 1929 permettent de différencier les espèces *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* et *Brucella suis*. Le premier vaccin vivant atténué, *B. melitensis* Rev1, a été développé par Elberg et Faunce en 1957.

La brucellose est présente en Algérie depuis le 19^{ème} siècle. Effectivement, les premières descriptions de la maladie ont été fournies par Cochez en 1895, qui suspecta l'existence de cette maladie à Alger, puis en 1899 par Legrain dans la vallée de la Soummam. Au début du 20^{ème} siècle, la maladie a été vérifiée par Gillot pour la première fois en raison des symptômes cliniques. Elle fut donc découverte en premier lieu chez l'homme. En 1907, à la suite de ces observations, des études furent menées sur des élevages caprins par Sergent et ses collègues à Alger et Oran. Ces recherches ont mis en évidence l'infection non seulement des caprins, mais également des autres animaux de compagnie. L'incidence était importante dans les élevages de chèvres maltaises. Après ces travaux, le gouverneur général de l'Algérie a pris un arrêté interdisant l'importation de caprins et de bovins provenant de Malte (le foyer de la brucellose). Ces mesures ont été les premières prises en Algérie pour prévenir la brucellose. De 1911 à 1956, plusieurs études, confirmant la présence de la brucellose à l'Ouest (Oran), au Centre (Alger), à l'Est (Constantine) et même au Sud (Hoggar), furent menées. Dès que la brucellose a été découverte en Algérie, de nombreuses recherches ont établi une corrélation entre son origine et l'importation de chèvres espagnoles, de chèvres et de vaches maltaises au nord. D'autres études expliquent l'introduction de la maladie à l'ouest du pays par les caravanes arabes. Selon Mignot en 1940, l'apparition de cette maladie dans le Hoggar n'aurait pu être due qu'aux caravanes maliennes (**Garin et Bastuji, 1993**).

2. Taxonomie

Les brucelles sont des alpha-Proteobacteria, de l'ordre des Rhizobiales et de la famille des Brucellaceae, avec les genres *Brucella*, *Mycoplana* et *Ochrobactrum* inclus... etc., le genre a été réparti en dix espèces, avec des biovars ou des biotypes, tandis qu'au niveau génomique, il n'y a qu'une seule espèce : *B. melitensis*. En réalité, les études qui reposent sur la distinction entre l'hôte et la pathogénicité. Des tests de laboratoire différentiels sont actuellement utilisés pour distinguer les espèces des biovars. Même s'il a été suggéré de regrouper les espèces de *Brucella* en tant que biovars d'une seule espèce en utilisant des études d'hybridation ADN-ADN et en analysant l'ADN, en comparant le génome de *B. melitensis* et de *B. suis* sur l'ADN. La catégorisation actuelle des brucelles dans les espèces de *B. melitensis* et de *B. suis* (**Godfroid et al., 2005**). D'autres espèces « marines » ont été suggérées pour distinguer les souches provenant de mammifères marins : *B. maris* est le nom donné à toutes les souches de mammifères marins, puis *B. Cetaceae* est une espèce de cétacés isolée (baleines, cachalots, dauphins, marsouins) et enfin *B. Les pinnipèdes* (phoques, otaries, morses) sont isolés de la famille des pinnipediae (**Godfroid et al., 2005**).

3. Habitat de *Brucella*

Brucella est un genre de bactéries pathogènes qui provoquent la brucellose chez les humains. *Brucella* a une préférence pour les habitats suivants :

3.1. Système réticuloendothélial : *Brucella* se lie spécialement aux organes du système réticuloendothélial, tels que le foie, la rate, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques.

3.2. Système génito-urinaire : La bactérie peut infecter les organes génitaux et urinaires, ce qui peut entraîner des complications comme l'orchépididymite chez les hommes.

3.3. Système ostéoarticulaire : Les articulations, les os et les tissus mous sont également des sites d'infection fréquents.

3.4. Système nerveux central : Bien que rare, *Brucella* peut causer une neurobrucellose, affectant le cerveau et les méninges.

3.5. Système cardiovasculaire : Parfois, l'infection peut affecter le cœur, provoquant une complication grave appelée endocardite brucellienne. *Brucella* a la capacité de survivre et de se reproduire à l'intérieur des macrophages, qui sont des cellules essentielles du système immunitaire responsables de l'ingestion et de la destruction des agents pathogènes. Cette capacité intracellulaire permet à *Brucella* d'éviter la réponse immunitaire et de persister dans l'organisme, ce qui rend le traitement plus complexe (**Freycon.,2015**).

4. Identification de *Brucella*

4.1. Caractères morphologiques

Les brucelles sont de petits cocci, coccobacilles ou petits bâtonnets avec des bords droits ou légèrement convexes et des extrémités arrondies. Ils mesurent entre 0.5-0.75 μm de largeur et 0.6-1.5 μm de longueur. Les bactéries sont présentes de manière isolée, plus rarement en paires, en chaînes courtes ou en petites grappes. Elles demeurent immobiles, sont Gram négatives (**Figure1**), ne génèrent pas de capsule, de spores ou de flagelle. Ce n'est pas une résistance à l'acide, mais ils peuvent être décolorés par les acides faibles. On les observe dans des produits pathologiques grâce à une coloration différentielle, où elles se distinguent en rouge sur un fond bleu à la coloration de Stamp (**Figure 2**) ou à la coloration modifiée de Ziehl Neelsen (**Lavigne et al., 2017**).

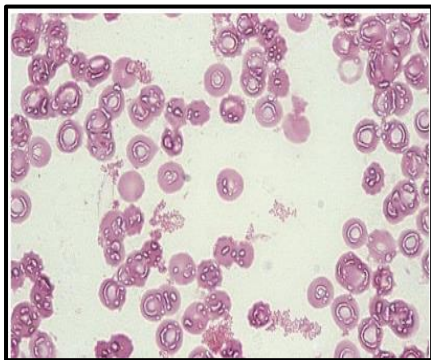


Figure1 : Coloration de Gram
(Matthieu,2016)

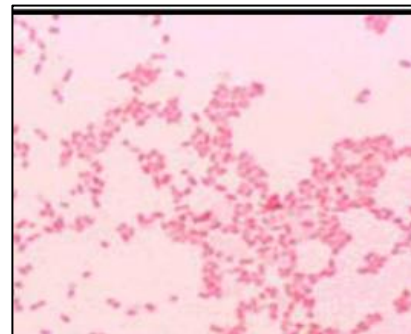


Figure2 : Coloration de Stamp
(Ouchene,2020)

4.2. Caractères cultureux

La majorité des bactéries sont strictement aérobies, cependant certaines souches se développent mieux dans une atmosphère contenant 5 à 10 % de CO_2 , telles que *Brucella abortus* et *Brucella ovis* (**Bounaadjia., 2010**).

L'optimum de croissance est de 34°C, mais elle peut fluctuer entre 20 et 40°C dans un environnement approprié, même si les *Brucella* sont généralement cultivées à 37°C. Le pH nécessaire à la croissance est compris entre 6,6 et 7,4, avec un pH idéal de 6,8 (**Bervas et al., 2006**).

Dans un milieu solide approprié, les colonies de *Brucella* sont visibles en 2 ou 3 jours (**Figure 3**). Ils produisent deux types de souches lors de leur culture : les colonies S (smooth=lisse) et R (rough=rugueuse). Les colonies S sont de petites tailles, rondes et convexes, cependant une dissociation, avec la perte des chaînes O du LPS, est souvent

observée pour former des variantes R. Cette phase de dissociation revêt une grande importance en matière de vaccination (**Bervas et al., 2006**).



Figure3 : colonies de *Brucella abortus* qui ont été cultivées sur gélose au sang
(**Bouhali et al.,2022**)

4.3. Caractères biochimiques

Les différentes espèces de *Brucella* n'ont pas visiblement acidifié les milieux sucrés. Il n'y a pas eu de production d'indole en eau peptone. On a réduit les nitrates en nitrites (à l'exception de *B. Ovis*). Une oxydase irrégulière et une catalase plus ou moins active ont été observées de manière constante (**Pilet et al.,1979**). Huddleson a identifié plusieurs variétés de *Brucella*, en analysant les résultats obtenus à partir de trois tests : l'exigence en CO₂. La production d'H₂S. Exposé à la thionine et à la fuchsine. Par conséquent, trois espèces sont identifiées comme dangereuses pour l'homme : *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* et *Brucella suis* (**Pilet et al., 1979**) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Identification par culture cellulaire des trois espèces de *Brucella* dangereuses pour l'homme (**Philippon.,2003**)

Espèces	Exigence en CO ₂	Production d'H ₂ S	Résistance à thionine	Résistance à fusine basique
<i>B.melitensis</i>	-	-ou traces	+	+
<i>B.abortus</i>	+	+ en 2j et plus	-	+
<i>B.suis</i>	-	++ en 4j	+	-

4.4. Caractères génomiques

Le génome de *Brucella* est composé de deux chromosomes circulaires, mesurant respectivement environ 2,11 Mb pour le premier et 1,18 Mb pour le deuxième, à l'exception de *B. suis* biovar 3 qui ne possède qu'un seul chromosome. Il y a entre 3200 et 3400 gènes,

avec un pourcentage moyen de GC (guanine et cytosine) de 57,2 %. Des bactériophages ont été trouvés chez *Brucella*, mais aucun plasmide ni phage lysogénique. Les différentes espèces de *Brucella* sont phylogénétiquement très semblables, avec un taux d'homologie de plus de 90 %. Certains chercheurs suggèrent de les classer toutes comme des biovars plutôt que des espèces distinctes en raison de cette similarité, mais cette proposition n'a pas été adoptée en raison des différences de pathogénicité pour l'homme et des hôtes variés, ainsi que pour des raisons pratiques et de sécurité biologique (**Ponsard et al., 2020**).

5. Les facteurs de virulence

La virulence des espèces de *Brucella* est principalement influencée par le lipopolysaccharide (LPS) présent dans la paroi cellulaire. Il existe à la fois des formes lisses de type « S » et des formes « B » *B. melitensis* *B. abortus*, *B. suis* et « R » rugueuses (*B. Canis*). Les dernières souches présentent des LPS rugueux qui ont une virulence beaucoup moins importante chez l'homme. À la suite de leur opsonisation et de leur ingestion par les cellules phagocytaires, les bactéries peuvent survivre et se reproduire à l'intérieur des phagosomes. Cela se fait grâce à la synthèse de dérivés azotés tels que l'adénine et la guanine monophosphate, qui empêchent la fusion du phagosome et du lysosome, l'activité oxydative et la production de facteurs de nécrose tumorale correspondant au système bactéricide (**Hoover, Friedlander., 1997**).

6. Traitement

Les antibiotiques

Les antibiotiques recommandés ont dû être efficaces contre *Brucella*, avoir été bien diffusés dans les cellules et maintenir leur activité intracellulaire. Les cyclines (oxytétracycline et doxycycline), les aminosides (streptomycine et gentamicine) et la rifampicine ont été les antibiotiques les plus efficaces. Les cyclines et la rifampicine ont maintenu leur activité à l'intérieur et à l'extérieur des cellules, tandis que les aminosides ont principalement exercé leur activité en dehors des cellules (**Maurin.,2005**).

Partie 2

Matériels et méthode

Matériels et méthodes

1. Téléchargement de séquence

L'immunoglobuline B (bigB) de la bactérie *Brucella abortus* a été choisie à partir de la base de données VFBD (Virulent Factor of Bacteria Database) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>), au format Fasta, pour une utilisation ultérieure (Figure 4).

Virulence factors	Related genes	B. abortus 519		B. abortus bv. 1 str. 9-941 (biovar 1)		B. canis ATCC 23365		B. melitensis ATCC 23457		B.
		chromosome I	chromosome II	chromosome I	chromosome II	chromosome I	chromosome II	chromosome I	chromosome II	
		NC_010742	NC_010740	NC_006932	NC_006933	NC_010103	NC_010104	NC_012441	NC_012442	N
Adherence										
BigA	bigA					BCAN_RS16725				BA
bigB (Bacterial Immunoglobulin Gene B)	bigB	BABS19_RS0958		BRIUAB_RS09565		BCAN_RS16730		BMEA_RS09440		BA
BmaA	bmaA									
BmaB/OmaA	bmaB/omaA							BMEA_RS09445		
View VF details	bmaC		BABS19_RS15705		BRIUAB_RS15665					
BtaE	btaE	BABS19_RS00335		BRIUAB_RS16045						BA
BtaF	btaF	BABS19_RS08805		BRIUAB_RS08795		BCAN_RS16650		BMEA_RS08670		BA
Effector delivery system										
	bspA	BABS19_RS03250		BRIUAB_RS03245		BCAN_RS03045		BMEA_RS03175		BA
	bspB	BABS19_RS03395		BRIUAB_RS03390		BCAN_RS03190		BMEA_RS03320		BA
	bspC	BABS19_RS04050		BRIUAB_RS04035		BCAN_RS03830		BMEA_RS03975		BA
	bspE	BABS19_RS07985		BRIUAB_RS07970		BCAN_RS07705		BMEA_RS07850		BA

Figure4 : Gène de l'immunoglobuline B

2. Recherche de l'antigénécité

La protéine de l'immunoglobuline B a été insérée au format FASTA dans Vaxijen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) afin d'analyser son potentiel antigénique (Figure5).

Figure 5 : La séquence de Protéine dans Vaxijen

3. Prédiction des épitopes

On a utilisé la base de données IEDB Immune Epitope (<https://www.iedb.org/>) (**Figure6**) pour prédire les épitopes linéaires de la séquence protéique. Ensuite, on a copié la séquence Fasta pour obtenir BCL (**Figure7**). Puis, sélectionner la cellule T qui contient (CMHI et CMHII). Dans CMHI, la séquence Fasta a été copiée et les allèles ont été choisis sont (HLA.A.30 :1/HLA.A.25 :1) (**Figure8**). Dans CMH II, on a également copié la séquence Fasta et sélectionné les allèles (DRB°01 :11/DRB°01 :16) et longueur 14 pour obtenir HTL (**Figure9**).

Figure6 : La base des données IEDB

Figure7 : La prédiction des épitopes de lymphocyte B

The screenshot shows the NetMHCpan 4.1 EL web interface. The 'Specify Sequence(s)' section has a text area containing a protein sequence in FASTA format. Below it, the 'Choose a Prediction Method' section shows 'NetMHCpan 4.1 EL (recommended epitope predictor-2023.09)' selected. The 'Specify what to make binding predictions for' section shows 'human' selected for MHC source species. The 'Specify Output' section shows 'Predicted Score (descend)' for sorting peptides and 'XHTML table' for output format. The 'Submit' button is visible at the bottom right.

Figure8 : La prédiction des épitopes CMHI

The screenshot shows the MHC-II Binding Predictions web interface. The 'Specify Sequence(s)' section has a text area containing a protein sequence in FASTA format. Below it, the 'Choose a Prediction Method' section shows 'NetMHCpan 4.1 EL (recommended epitope predictor-2023.09)' selected. The 'Specify what to make binding predictions for' section shows 'Human_HLA-DR' selected for MHC source species. The 'Specify Output' section shows 'Percentile Rank' for sorting peptides and 'XHTML table' for output format. The 'Submit' button is visible at the bottom right.

Figure9 : La prédiction de la liaison CMHII

4. Recherche l'antigénécité des épitopes

Le site utiliser pour l'antigénécité est : Vaxijen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) pour voir les ensembles des épitopes au format Fasta.

5. Construction du vaccin

La structure linéaire du vaccin n'a été construite qu'avec des épitopes antigéniques. Par la suite, ces épitopes choisis ont été associés à des connecteurs adéquats afin de structurer la séquence vaccinale. Plusieurs types de connecteurs ont été employés : la séquence Fasta a débuté avec un adjuvant associé au EAAAK, puis les autres épitopes ont suivi. Le connecteur GPGPG a été employé afin de connecter HTL et AAY a été employé pour connecter CTL.

6. Prédiction de la structure 3D de vaccin

La structure 3D a été faite lorsque la séquence de vaccin en format Fasta a inséré dans Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Figure10).

The screenshot shows the Phyre2 web interface. At the top, there's a logo for 'Phyre2' and a subtitle 'Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0'. There are links to subscribe to Google Groups, visit the site, and follow on Twitter. A registration prompt asks users to log in for 'Expert Mode' features. A 'New!' announcement mentions 'One-to-One Threading' and the 'AlphaFold Protein Structure Database'. A status bar shows 'Current Phyre2 server load = 9% (normal running)'. The main form includes fields for 'E-mail address', 'Optional Job description', and 'Amino Acid Sequence'. There's a section for uploading a sequence file or UniProt accession. The 'Modelling Mode' is set to 'Normal'. At the bottom, there are checkboxes for 'NOT for Profit' and 'FOR Profit (Commercial)', and a 'Phyre Search' button.

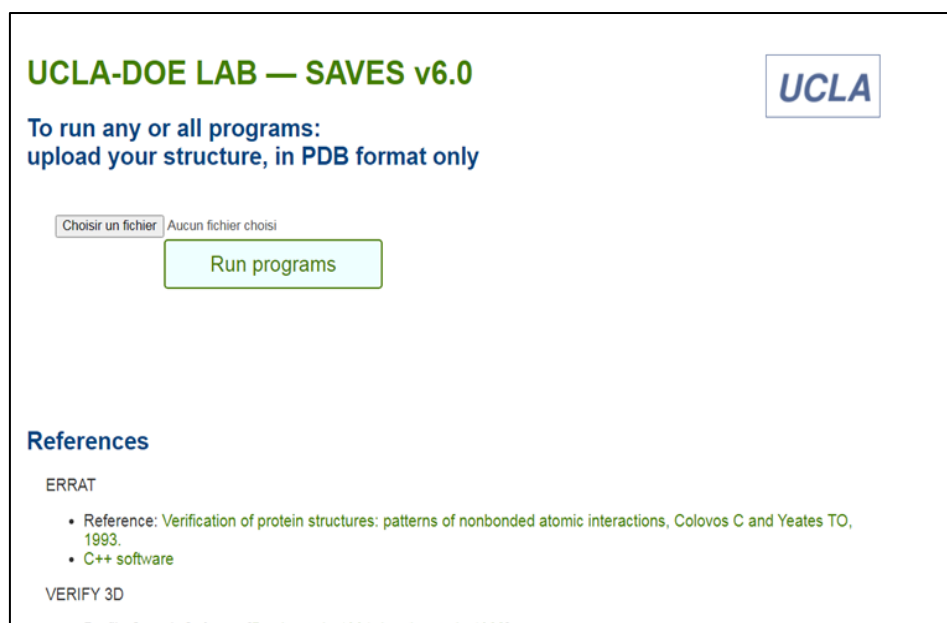
Figure10 : La prédiction de la structure 3D

Ainsi, le fichier extrait du site Phyre² au format PDB a été intégré sur GalaxyWeb (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) (**Figure11**), pour améliorer la qualité de la structure 3D.

The screenshot shows the GalaxyWEB interface. The header includes the 'GalaxyWEB' logo and a description: 'A web server for protein structure prediction, refinement, and related methods'. Below the header is a navigation bar with links: Home, Services, Database, Design, Queue, Help, Softwares, Suppl. The main content area is titled 'GalaxyRefine'. It contains a message: 'Model structures generated by protein structure prediction methods can be refined. No gaps are allowed in the middle of initial protein structure.' There are input fields for 'Job name' and 'E-mail address (Optional)'. Below these is a section 'Model Structure to be refined' with a 'PDB File' input field and a 'Protein Structure File' input field. A 'Submit' button is at the bottom. On the right side, there is a 'Help' section with links for 'Information', 'PDB File: File Format', and 'E-mail: Average run time is 1~2h'. An 'Example' section lists 'PDB file: TR747.pdb' and a 'Report: [View]' link.

Figure11 : Correction de la qualité de la structure 3D

Après que GalaxyWeb a corrigé la qualité de la structure 3D du vaccin, le fichier résultant a été intégré sur SAVES (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) en vue de la validation de la structure 3D (**Figure12**).



UCLA-DOE LAB — SAVES v6.0

To run any or all programs:
upload your structure, in PDB format only

Choisir un fichier Aucun fichier choisi

Run programs

References

ERRAT

- Reference: Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions, Colovos C and Yeates TO, 1993.
- C++ software

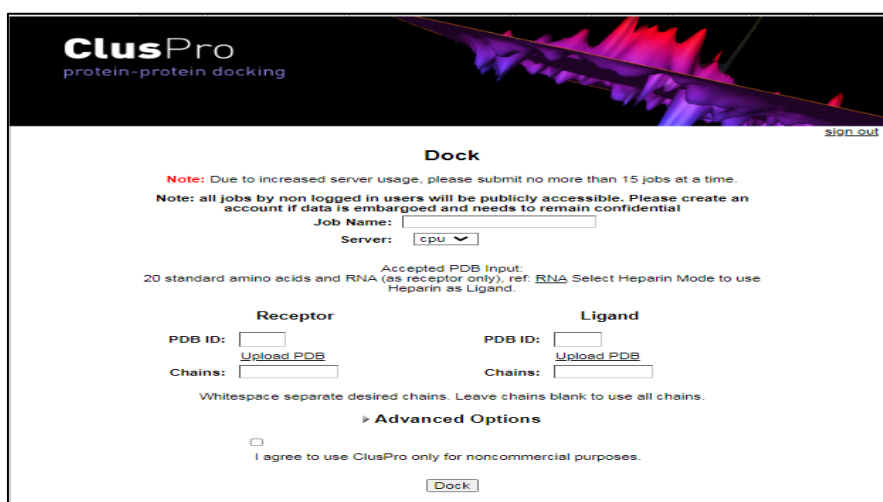
VERIFY 3D

• Profile Search Software [Bowie et al., 1991; Luttky et al., 1991]

Figure12 : La validation de vaccin

7. Docking moléculaire

L'étude de l'interaction entre la structure 3D de vaccin avec le récepteur TLR 4 en utilisant ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/login.php?redir=/models.php?job=1071450>) (Figure13).



ClusPro
protein-protein docking

sign out

Dock

Note: Due to increased server usage, please submit no more than 15 jobs at a time.

Note: all jobs by non logged in users will be publicly accessible. Please create an account if data is embargoed and needs to remain confidential

Job Name:

Server:

Accepted PDB Input:
20 standard amino acids and RNA (as receptor only). ref: RNA Select Heparin Mode to use Heparin as Ligand.

Receptor

PDB ID:

Chains:

[Upload PDB](#)

Ligand

PDB ID:

Chains:

[Upload PDB](#)

Whitespace separate desired chains. Leave chains blank to use all chains.

► **Advanced Options**

☐ I agree to use ClusPro only for noncommercial purposes.

Figure13 : Docking moléculaire

Partie 3

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Brucella abortus est une bactérie pathogène et est considérée comme un grand réservoir trouvé chez les animaux vecteurs ou chez les animaux sains, et pour traiter cette maladie, un vaccin est fabriqué en collectant divers épitopes antigéniques CTL.HTL.BCL en utilisant des liens EAAAK.GPGPG.AAY pour évaluer la possibilité d'améliorer vaccin et réduire la mortalité par *Brucella* (Wang et al .,2024).

1. Téléchargement de séquence

La séquence Fasta qui a téléchargé par la base des données VFBD est la suivant :

```
MAVSAVINNIPNIMVSNISSPAGSQVITATLTYDGNGNDAQKPGTDRFTFIFASNPNGN
VKVASGSSLDAAITQDSANPNVYTASITVIAAAAYGVCSASGNKTGDSTQWLASATSF
SILPSVSFPVITRNPSPALQVSPVPGTPDSDATLVTQMDVTVTDEGGNPIPDSSVTFTVK
DVRTTSATQTGVFYASAKTPISLAPLTPQDPRSDSRFAQATNKLGVATIFIATNQNPQY
LRIFCETNTIRGASAFVYIFDTAFGTELEAPDTDIGPDLSNYTDTTFPVTINNKNKNTSPNE
FIALFLNNKFQNQIAGTNLNGSALTVANAAADLNVGSSSAKPQNNFLYTIRTSNGDL
INSKTTLLQLFGPLPTPNPKNQILGPLVDPNGGVINLGSIFIQGNPTDYTTTIDLSKDKT
TLADKMSYTLKQNDIVTLHATFQGDFQSDDNFQVNPFTYTKTITDPTDSAFNIIIPFDD
ISGYGTPKDPKRSNLYKMYYEITPASATTPIAASSLTQGVLSTRVI
```

2. Recherche de l'antigénicité

La séquence de protéine issue du gène big B extrait de VFBD est antigène à un taux 0,5734 (Figure14).

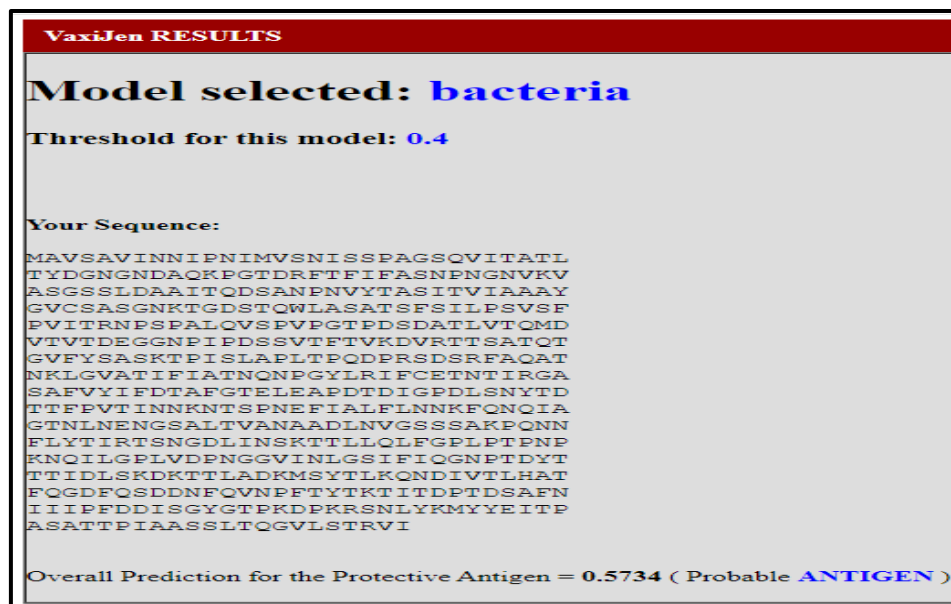


Figure14 : Recherche de l'antigénicité

3. Prédiction des épitopes

Les résultats obtenir par la prédiction des épitopes dans le site IEDB avec la recherche de l'antigénécité par Vaxijen tant que l'amélioration de l'efficacité de vaccin dépend la sélection des épitopes antigéniques.

- Pour la prédiction des épitopes BCL, la séquence Fasta a intégré dans la cellule B.

Le résultat est présenté dans le tableau 2.

Tableau2 : Les épitopes BCL

Epitopes	Antigénécité
VSNISSPAGS	Non antigène
GNGNDAQKPGT	Antigène
NVKVASGSSLDAAITQDSANPN	Antigène
ASGNKTGDSTQWLASATSFSILPSV	Antigène
GPLPTPNPKNQIL	Non antigène
DLSKDKTTLADK	Non antigène
DFQSDDNFQVN	Antigène
PVITRNPSALQVSPVPGTPDSDAT	Antigène
DEGGNPIPDS	Antigène
GTELEAPDTDIGPDLSNYTD	Non antigène

- Pour la prédiction des épitopes TCL la séquence Fasta a été intégré dans la cellule T (CMHI) avec le choix des allèles (HLA-A30 :1 /HLA-A25 :1).

Le résultat est présenté dans le tableau 3.

Tableau3 : Les épitopes TCL

Epitopes	Antigénécité
TTFPVTINNK	Antigène
FYSASKTPISLA	Non antigène
SAKPQNNFLYTIR	Non antigène
EFIALFLNNK	Non antigène
GSSSAKPQNNF	Antigène
LHATFQGDFQSDD	Antigène
LHATFQGDFQSDDN	Antigène

- Pour la prédiction des épitopes HTL la séquence Fasta a été intégré dans la cellule T (CMHII), avec le choix des allèles (DRB *01 :11 / DRB *01 :16).

Le résultat est présenté dans le tableau 4.

Tableau4 : les épitopes HTL

Epitopes	Antigénécité
QGDFQSDDNFQVNP	antigène
KMYYEITPASATTP	antigène
PNVYTASITVIAAA	antigène
LTPQDPRSD	antigène
PDSDATLVT	antigène
PGTDRFTFI	Non antigène
SATQTGVFY	Non antigène
PKNQILGPL	Non antigène
PNVYTASIT	Non antigène
ASGNKTGDS	antigène
PTPNPKNQI	antigène
SKTTLLQLF	antigène
ATNQNPGYL	antigène
NDAQKPGTD	antigène

4. construction de vaccin

Pour la construction d'un vaccin avec une immunogénicité réduite, les linkers AAY et GPGPG ont été intégrés pour la stabilité et le renforcement du vaccin. Le linker EAAAK a également été inséré pour réduire son interaction avec d'autres régions et permettre une séparation plus efficace, aussi l'adjuvant sélectionné est le composant le plus important d'un vaccin multi-épitopes qui induit une forte réponse immunitaire dans le corps de l'hôte. Le résultat est le suivant :

MAENSNIDDIKAPLLAALGAADLALATVNELITNLRERAEETRTDTRSRVEESRARLTKLQED
 LPEQLTELREKFTAEEELRKAAEGYLEAATSRYNELVERGEAALERLRSQQSFEEVSARAEGYV
 DQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPKKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKA
 PAKKAAAKKVTQKEAAAKGNGNDAQKPGTGPGPGNVKVASGSSLDAAITQDSANPNGPGP
 GASGNKTGDSTQWLASATSFSILPSVGPVGDFQSDDNFQVNGPGPGDISGYGTPKDPKRSNL
 YGPVGGAADLNVGSSSAKPQGPVGPGPVITRNPSPALQVSPVPGTPDSDATGPVGDEGGNPIPD
 SGAAYTTFPVTINNKAAYETNTIRGASAFAAYYTASITVIAAAAYAA YEAPDTDIGPDL SNYAA
 YGSSSAKPQNNFLAAYGSSSAKPQNNAAYSRFAQATNKLAAYLHATFQGDFQSDDAAYLHA
 TFQGDFQSDDNAA YQGDFQSDDNFQVNPAA YKMYYEITPASATTPAA YPNVYTASITVIAAA
 AAYLTPQDPRSDAAYPDSDATLVTAA YASGNKTGDSAA YPTPNPKNQIAAYSKTTLLQLFAA
 YATNQNPGYLAAYNDAQKPGTD

5. Prédiction de la structure 3D

Après la construction de vaccin, la structure 3D a été obtenue en insérant la séquence au format Fasta dans Phyre2. Résultat est le suivant (**Figure15**).

La correction des erreurs de la structure a été réalisée par l'insertion de la structure 3D obtenu par Phyre2 dans GalaxyWeb qu'on a sélectionné le meilleur modèle. Le résultat est le suivant (**Figure16**).

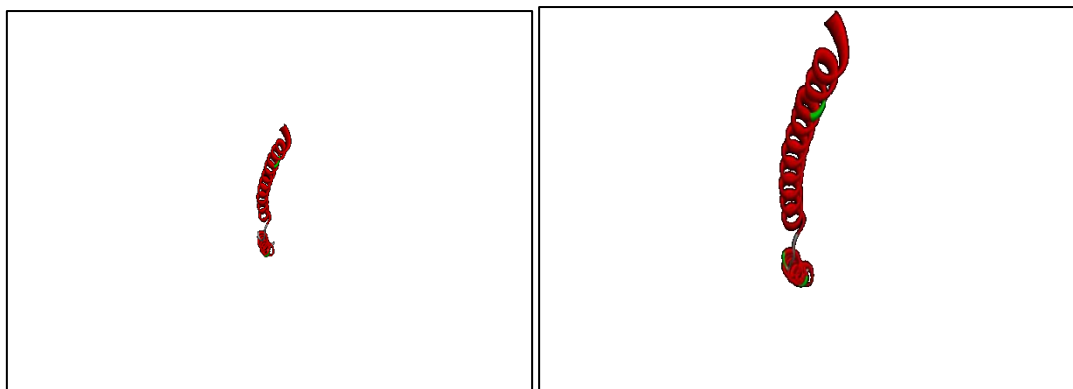


Figure15 : La structure 3D de vaccin **figure16** : La structure 3D après la correction

Nous avons validé la qualité de la structure 3D du vaccin en utilisant PROCHECK, effectué via le site SAVES. Le raffinement de la structure 3D a révélé des caractéristiques appropriées selon les résultats du diagramme de Ramachandran, indiquant que 100 % des résidus se trouvent dans les régions favorisées. Le résultat de la validation est présenté ci-dessous (**Figure 17**).

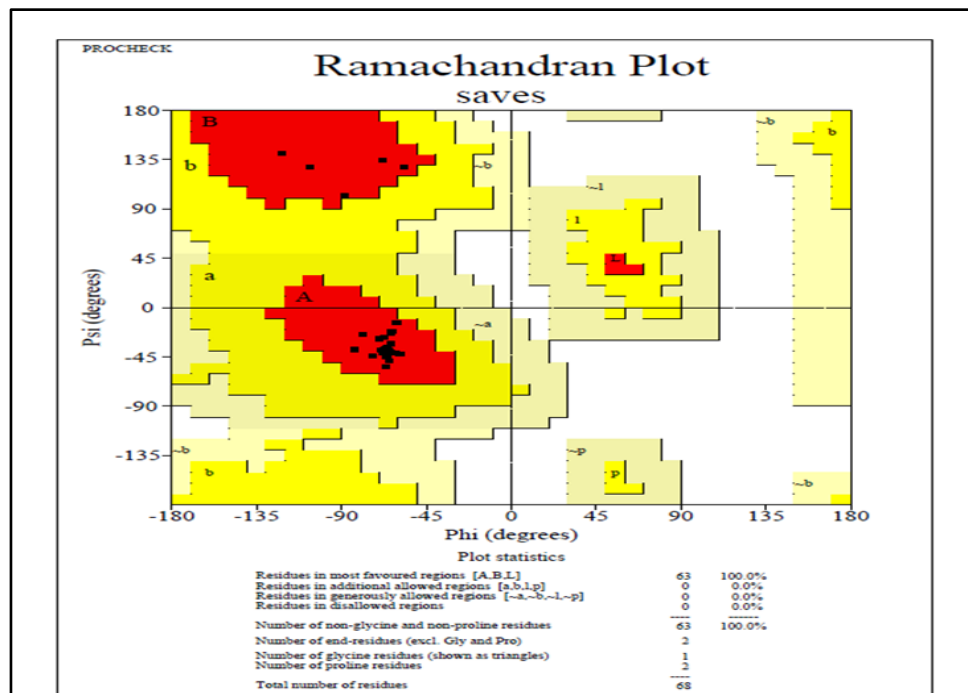


Figure17 : Test Ramachandran plot

6. Docking moléculaire

Le résultat de complexe TLR4 et la structure 3D de vaccin est obtenue par ClusPro est le suivant (**Figure18**).

TLR4 joue un rôle clé dans le processus de docking moléculaire en influençant l'interaction entre les ligands et les récepteurs. Cette interaction peut moduler la réponse immunitaire, particulièrement dans le contexte des infections bactériennes intracellulaires, où TLR4 est essentiel pour la reconnaissance des pathogènes et l'activation des réponses immunitaires appropriées.

Dans notre étude le vaccin multi épitope avait une affinité de liaison élevée avec le récepteur immunitaire TLR4, assurant son effet immunoprotecteur.

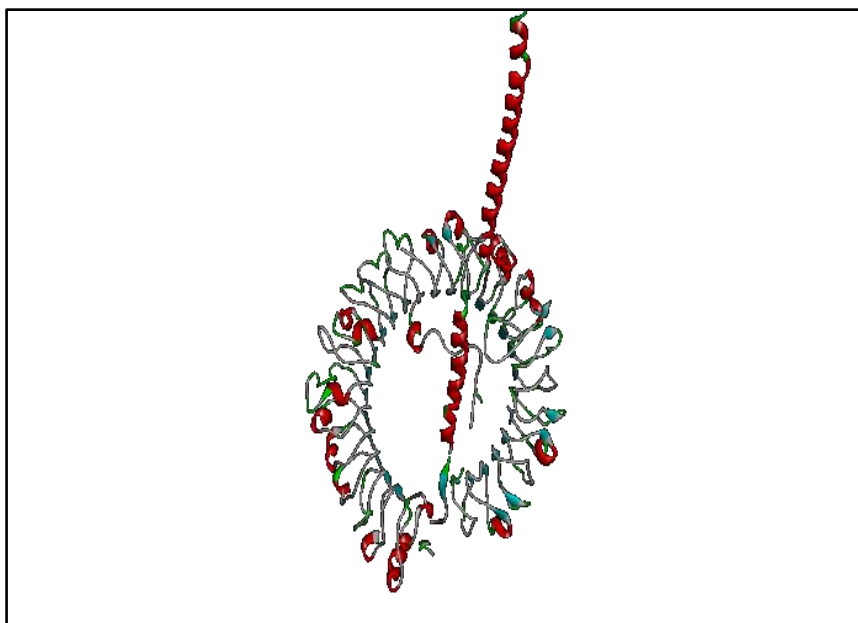


Figure18 : Résultat de docking moléculaire.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

La vaccination est une méthode simple, sûre et efficace pour se protéger contre des maladies graves telles que la brucellose, causée par les bactéries intestinales du genre *Brucella*. Cependant, des essais biologiques in vitro et in vivo sont nécessaires pour développer des vaccins efficaces contre les infections provoquées par la bactérie *Brucella*. Nos efforts ont abouti à la création d'un vaccin in silico, basé sur les liens entre les épitopes BCL, HTL et CTL.

Cette avancée ouvre la porte à de nouveaux vaccins, avec un potentiel d'efficacité élevé et en cours de développement. La conception et la production de vaccins sont les mesures les plus efficaces pour prévenir la brucellose. Les formulations vaccinales à base de protéines offrent une sécurité supérieure, des coûts de production réduits et une plus grande couverture par rapport aux autres types de vaccins contre *Brucella*, tels que les vaccins inactivés et vivants. Les progrès réalisés avec les vaccins in silico complètent ces avancées, offrant de nouvelles solutions vaccinales plus efficaces et accessibles contre la brucellose.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BOUHALI Dounia.,BOUKAIL Sawsen., Allal Asma,2022. Contribution à l'étude épidémiologique de la brucellose de l'est Algérien (Guelma).Mémoire de Master. Université 8 mai1945 Guelma, 22 p.
2. BERVAS C., GUTIERREZ C., LESTERLOU S, 2006 .Point sur les risques liés à la présence de *Brucella* dans l'environnement. Mémoire à fin d'obtention de diplôme d'ingénieur en génie sanitaire. Ecole nationale de santé publique, 58 p.
3. BOUNAADJA L, 2010 .Développement d'une PCR en temps réel pour la détection des Brucelles et relations avec le genre *Ochrobactrum*, Thèse de doctorat en biologie des organismes. Université du Maine.
4. DEDET J., 2007. La microbiologie de ses origines aux maladies émergentes, Dunod, 74-76p.
5. FREYCON Pauline.,2015. Rôle du bouquetin capra ibex dans l'épidémiologie de la brucellose a *Brucella melitensis* en haute s'avoie. Université CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie).Thèse en vue de l'obtention le grade de Docteur vétérinaire.
6. GODFROID J., CLOECKAERT A., LIAUTARD J-P., KOHLER S., FRETIN D., Walravensk K., GARIN-BASTUJII B., LETESSON J-J., 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the Discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Veterinary Research N°36, 313–326p.
7. HOOVER D., FRIEDLANDER A, 1997. Brucellosis. Medical Aspects of Chemical and Biological Department of the Army, Surgeon General, and the Borden Institute, 513-521p.
8. KHETTAB Soraya.,TALLEB Lamia Malika.,BOUDJEMAA Wassila.,2010.La Brucellose. Mémoire fin de cycle. Université Abou Bakr Belkaid Telemcen.
9. LAVIGNE, J-P., MAILLES, A., Sotto, A.,2017. Brucellose EMC – Maladies infectieuse: 1-10 [Article 8-038-A-10].
10. MAURIN M., 2005. Brucellosis at the dawn of the21st century.Médecine et maladies infectieuses, 6–16p.
11. MATTHIEU Jouan., 2016. Prophylaxie de la brucellose humaine: vers une vaccination ciblée de la faune sauvage? Étude du cas des bouquetins du massif du Bargy.Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes,55p.

12. OUCHENE Hind.,2020. Etude épidémiologique rétrospective de la brucellose humaine et bovine dans la région Médéa. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Docteur vétérinaire. Université Saad Dahlab Blida,6p.

13. PILET CH., BOURDON J-L., TOMA B., MARCHAL N., BALBASTRE C.,1979. Bactériologie médicale et vétérinaire - systématique bactérienne, 2ème édition. Doin éditeurs,437p.

14. PHILLIPON A .,2003. Cours de bactériologie médicale. Faculté de médecine, université de Paris V.9P.

15. CLAIRE Ponsard.,LUCA Freddi, Acacia Ferreira-Vicente, Vitomir Djokic, MARYNE Jaÿ,GINA Zanella, Guillaume Girault.,2020. Brucella, un genre bactérien en expansion : nouvelles espèces, nouveaux réservoirs. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France.

