

THESIS / THÈSE

LICENCE EN ZOOLOGIE

Mise au point des différentes étapes d'utilisation d'une banque de peptides aléatoires synthétisée sur support solide de polyacrylamide

Art, Muriel

Award date:
1992

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

011292



UNITE DE BIOCHIMIE CELLULAIRE

Année académique 1992-1993

Promoteur : J.REMACLE

**MISE AU POINT DES DIFFERENTES ETAPES
D'UTILISATION D'UNE BANQUE
DE PEPTIDES ALEATOIRES SYNTHETISEE SUR
SUPPORT SOLIDE DE POLYACRYLAMIDE**

**Muriel
ART**

Mise au point des différentes étapes d'utilisation d'une banque de peptides aléatoires synthétisée sur support solide de polyacrylamide

ART Muriel

Résumé

La banque de peptides aléatoires construite par synthèse chimique en phase solide s'élabore sur un principe statistique permettant d'avoir, en théorie, toutes les combinaisons de séquences possibles pour un peptide de taille n . Cet outil peut avoir de nombreuses applications en immunologie ou en biochimie notamment dans la recherche et l'identification de nouveaux épitopes. Au cours de ce travail, nous avons été amenés à mettre au point les diverses étapes d'utilisation d'une telle banque d'épitopes construite par voie chimique. Le support de synthèse que nous avons utilisé représente une partie de l'originalité de ce travail puisqu'il s'agit d'une résine de polyacrylamide hydrophile.

Les quatre étapes de mise au point furent les suivantes :

(1) La détection d'un Ag particulier (ici : le "Peptide Vasoactif Intestinal") greffé sur billes de polyacrylamide, par un complexe de reconnaissance Ac anti-VIP-protéine G-peroxydase. (2) L'isolement des billes ayant réagi positivement par micromanipulation (celles-ci présentent une coloration rougâtre). (3) Le lavage de ces même billes en vue d'éliminer le complexe protéique fixé sur le VIP afin de pouvoir microséquencer le peptide sur la bille. (4) Le microséquençage du peptide greffé sur son support.

Nous avons, en outre, ébauché une étude des caractéristiques de ce type de résine par une estimation de la taille des billes et une série de coupes microscopiques, qui nous ont permis de localiser de manière un peu plus précise la réaction Ag/Ac.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1992

Promoteur : J. Remacle

A maman...

Six heures vient de sonner au clocher de la cathédrale. Ma nuit blanche se termine, le temps est venu de remercier toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de ce mémoire.

A tout Seigneur, tout honneur, je commencerai donc par le Professeur Remacle en le remerciant de m'avoir permis de me joindre à son équipe durant ces quelques mois. Son expérience et son savoir furent à plusieurs reprises très précieux.

Ma seconde pensée sera, bien sûr, pour Pierre et Dominique. Le premier pour avoir clairsemé ce travail de remarques judicieuses. Quant au second, je ne le remercierai jamais assez pour ses nombreux conseils et pour l'oreille toujours attentive qu'il accorda à mes problèmes.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des gens du laboratoire pour le chaleureux accueil qu'ils nous ont réservé.

Je m'en voudrais, néanmoins, de ne pas saluer plus particulièrement Marc, sans qui le Macintosh serait à jamais rester une mystérieuse petite boîte, Carine, pour son aide en micromanipulation et son écoute, Marie, pour son travail discret mais tant indispensable, Isabelle, pour ses longues heures de sommeil sacrifiées devant l'ordinateur, à nos côtés et enfin Bobo et Thierry pour avoir partagé quelques-uns de nos fous-rires.

J'adresserai aussi un clin d'oeil complice aux 6 autres mémorants. Je ne suis pas prête d'oublier cette expérience à vos côtés.

Je n'oublierai pas d'adresser mes sincères remerciements au Professeur Letesson qui m'a ouvert la porte de son laboratoire. Son intérêt constant pour mon travail m'a été très cher.

Je tiens, d'ailleurs, à ce propos à remercier l'ensemble du laboratoire d'immunologie et plus particulièrement Karl, pour son aide, sa bonne humeur, ses gentils sermons et son extrême patience.

Merci aussi à la collaboration des Professeurs Fournier et Van Beeumen, sans qui ce mémoire n'aurait pas été possible.

Je voudrais également, profiter de l'occasion qui m'est offerte pour, de tout coeur, remercier Nadette, Fred, Philippe, Vincent, Marie, Philou et Simon d'avoir parsemé ces 5 années de moments inoubliables.

Enfin, je tiens à adresser un dernier remerciement à mon père et à ma belle-mère pour m'avoir permis de réaliser ces études.

Muciel

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

LISTE DES ACIDES AMINES

1. INTRODUCTION

- A. Intérêt et applications d'une banque de peptides aléatoires**
 - A.1. Recherche d'un épitope inconnu**
 - A.2. Etude des interactions entre ligands et molécules acceptrices**
 - A.3. Recherche d'un mimotope**

- B. Synthèse d'une banque d'épitopes**
 - B.1. Par synthèse peptidique classique**
 - B.1.1. Principe de la synthèse**
 - B.1.2. Screening de la banque**
 - B.1.3. Avantages**
 - B.1.4. Inconvénients**
 - B.2. Par synthèse chimique activée par la lumière**
 - B.2.1. Principe de la synthèse**
 - B.2.2. Stratégies de synthèses combinées**
 - B.2.3. Screening de la banque**
 - B.2.4. Avantages**
 - B.2.5. Inconvénients**
 - B.3. Par synthèse biologique = la banque de phages**
 - B.3.1. Quels sont les phages utilisés?**
 - B.3.2. Principe**
 - B.3.3. Screening**
 - B.3.4. Avantages**

B.3.5. Inconvénients

C. Buts et objectifs du mémoire

C.1. Choix de la méthode

C.2. Solution proposée

C.3. Objectifs du mémoire

C.4. Le peptide vasoactif intestinal

C.4.1. Séquence et localisation

C.4.2. Rôles

C.4.3. Structure

2. MATERIELS ET METHODES

A. Matériels

A.1. Test ELISA

A.2. Révélation à la peroxydase sur billes de polyacrylamide

A.3. Lavages des billes

B. Méthodes

B.1. Test ELISA

B.1.1. Principe

B.1.2. Solutions utilisées

B.1.3. Méthode

B.2. Synthèse peptidique sur billes de polyacrylamide

B.2.1. Préparation de la résine en vue de la synthèse

B.2.2. Fixation des a.a.

B.2.3. Clivages des groupements protecteurs des chaînes latérales

B.3. Révélation à la peroxydase sur billes de polyacrylamide

B.3.1. Principe

B.3.2. Solutions utilisées

B.3.3. Méthode

B.4. Prélèvement d'une bille par micromanipulation

B.5. Lavages des billes

B.5.1. Principe

B.5.2. Protocole à l'urée

- B.5.3. Protocole à la guanidine-HCl
- B.5.4. Protocole de désorption par changement du pH
- B.5.5. Protocole Pepscan
- B.6. Microséquençage du peptide sur la bille
- B.7. Microscopie optique

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

- A. Mise au point des étapes d'utilisation d'une banque d'épitopes
 - A.1. Détection des billes positives
 - A.1.1. Etude préliminaire
 - A.1.2. Détermination du nombre de lavages
 - A.1.3. Essai sur les billes
 - A.1.4. Quantification de la réaction Ac/peptide
 - A.2. Isolement d'une bille positive de la banque
 - A.3. Lavages des billes
 - A.4. Microséquençage du peptide
 - A.4.1. Séquençage proprement dit
 - A.4.2. Séquençage des billes lavées

- B. Caractérisation des billes de polyacrylamide
 - B.1. Estimation de la taille des billes
 - B.2. Coupes microscopiques

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

ABBREVIATIONS

a.a. :	acide aminé.
Ac :	anticorps.
ADN :	acide désoxyribonucléique.
AEC :	3-amino 9-éthyl carbazole.
Ag :	antigène.
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique.
AZT :	anilinothiazolinone.
BOP :	benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)phosphonium hexa-fluorophosphate
Boc-Aca :	Boc-ε-acide aminocaproïque.
DMF :	diméthylformamide.
D.O. :	densité optique ou absorbance.
ELISA :	Enzyme linked immuno-sandwich assay.
Fmoc :	groupement fluorénylméthoxycarbone.
HC :	hydrolysats de caséine.
HF :	acide fluorydrique.
H.I.V. :	Virus immunodéficientaire humain.
HPLC :	High Pressure Liquid Chromatography.
IgG :	immunoglobulines.
λ :	longueur d'onde.
LPS :	Lipopolysaccharides.
NVOC :	nitroveratryloxycarbonyl.
p III :	protéine III.
p VIII :	protéine VIII.
PBS :	Phosphate Buffer Saline.
PITC :	phénylisothiocyanate.
PTC :	phénylthiocarbomoyl.
PTH :	phénylthiohydantoïne.
OPD :	orthophénylènediamine.
SDS :	dodecylsulfate de sodium.
SN :	sérum normal.
SNC :	système nerveux central.
TMA :	triméthylamine.
Tw :	tween.
t-Boc :	groupement tertiobutyloxycarbone.
TFA :	acide trifluoroacétique.
V.I.P. :	Peptide vasoactif intestinal.

LISTE DES ACIDES AMINES :

A (Ala) : alanine.

C (Cys) : cystéine.

D (Asp) : acide aspartique.

E (Glu) : acide glutamique.

F (Phe) : phénylalanine.

G (Gly) : glycine.

H (His) : histidine.

I (Ile) : isoleucine.

K (Lys) : lysine.

L (Leu) : leucine.

M (Met) : méthionine.

N (Asn) : asparagine.

P (Pro) : proline.

Q (Gln) : glutamine.

R (Arg) : arginine.

S (Ser) : sérine.

T (Thr) : thréonine.

V (Val) : valine.

W (Trp) : tryptophane.

Y (Tyr) : tyrosine.

INTRODUCTION

A. INTERET ET APPLICATIONS D'UNE BANQUE DE PEPTIDES ALEATOIRES :

Depuis moins d'une dizaine d'années, l'utilisation de peptides synthétiques s'est fortement étendue dans le monde de la recherche. Ceci est particulièrement vrai en pharmacologie, en biochimie et en immunologie où la synthèse peptidique représente une aide considérable dans des études aussi diverses que les interactions antigène-anticorps, la conformation des protéines ou encore la mise au point de vaccins.

Dans chacun de ces cas, un nombre important de peptides est souvent nécessaire (Houghten, 1988). C'est pourquoi, depuis le début des années '90, des recherches ont été menées à bien en vue du développement de ce qu'on appelle aujourd'hui des BANQUES DE PEPTIDES ALEATOIRES.

Ce nouvel outil est en fait constitué d'une multitude de peptides de séquences différentes, comprenant toutes les combinaisons de séquences possibles pour un nombre donné de résidus dans la chaîne peptidique. Ainsi, par exemple, une librairie d'hexapeptides où les 20 acides aminés sont représentés ne contient pas moins de 64 millions (20^6) de peptides différents qui peuvent être ensuite utilisés par le chercheur pour l'identification d'épitopes ou pour des études conformationnelles.

Comme nous le verrons plus loin, la construction d'une telle banque peut s'effectuer soit par synthèse peptidique chimique (synthèse t-Boc ou Fmoc), soit par synthèse biologique (banques de phages). Voici résumés, quelques exemples d'utilisation :

A1. Recherche d'un épitope inconnu :

Parce que les vaccins peptidiques présentent de nombreux avantages, un effort considérable a été fourni par les industriels et les chercheurs en vue de leur développement.

Il s'agit pour eux de greffer sur une molécule porteuse, l'épitope d'un pathogène. Cet épitope, entraînant une réponse immunitaire, il doit permettre une protection de l'individu vacciné contre toute attaque future de l'agent pathogène portant cet épitope.

Il existe, malheureusement, une limitation importante à cette approche générale : il s'agit de la détermination avec précision de la séquence à synthétiser (Wilson *et al*, 1984). Il est, en effet, difficile d'obtenir des renseignements sur la structure précise des épitopes ou bien encore sur les résidus impliqués dans la liaison avec un éventuel anticorps (Meloan *et al*, 1987; Getzoff *et al*, 1987).

Tester des Ac dirigés contre un pathogène particulier sur une banque d'épitopes permettrait de résoudre le problème (Scott and Smith, 1990; Felici *et al*, 1991). En effet, si l'on peut disposer d'Ac reconnaissant spécifiquement un pathogène, on peut supposer que l'épitope reconnu représente effectivement un site du pathogène pouvant par la suite servir à une immunisation efficace.

La technique a déjà été utilisée en France, dans le cadre d'une étude sur le virus H.I.V., responsable du SIDA (Madaule *et al*, 1991).

Cette équipe a, en effet, construit une banque de peptides sur phages en utilisant comme insert des fragments d'ADN de HIV-1, obtenus par un clivage aléatoire à la DNAase 1. Cette librairie exprimée dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a ensuite été passée au crible à l'aide de sérums humains infectés par HIV, ainsi qu'avec des Ac monoclonaux anti-HIV.

Deux nouveaux épitopes majeurs localisés au niveau de l'endonucléase et de la protéine p24, ont ainsi pu être isolés tandis que les anticorps monoclonaux ont permis la mise en évidence de plusieurs épitopes mineurs.

Quand on connaît toute l'importance d'une caractérisation des épitopes en vue d'une immunisation passive et active contre le SIDA, on peut se rendre compte de l'intérêt considérable que représente la banque de peptides en tant qu'outil de recherche.

Il est, de plus, à noter qu'il est possible d'isoler par cette méthode tant des épitopes séquentiels que conformationnels, puisque pour des peptides supérieurs à 6-8 acides aminés, la structure secondaire peut commencer à former.

A2. Etude des interactions entre ligands et molécules acceptrices:

Dans de nombreux cas encore, le mécanisme détaillé de la liaison entre un ligand et sa molécule réceptrice reste flou (Wilson *et al*, 1984; Getzoff *et al*, 1987). Que ce soit pour un antigène et son anticorps, pour une hormone et son récepteur et éventuellement même pour un substrat et son site catalytique, la banque de peptides permet une étude précise de l'interaction entre les deux molécules (Cwirla *et al*, 1990; Scott and Smith, 1990; Felici *et al*, 1991).

De plus, il est aussi possible par cette méthode, de mettre en évidence des peptides antagonistes, agonistes ou modulateurs de l'action physiologique du ligand naturel. Ceux-ci pourraient représenter alors des bons candidats pour le développement de médicaments nouveaux.

A3. Recherche d'un mimotope :

Une démarche semblable à celle mentionnée ci-dessus peut également être suivie pour des épitopes de nature non peptidique, tels que par exemple les liposaccharides (LPS) bactériens ou les arbres glucidiques des glycoprotéines. On recherche alors dans la banque peptidique un épitope qui adopte une structure semblable à celle d'un polysaccharide et est reconnu par un Ac monoclonal anti-LPS. Cet épitope est appelé "mimotope".

Cette méthode compte être envisagée au laboratoire d'immunologie dans le cas de la brucellose (Axel Kloeckaert, 1992), commune à l'homme et à certains animaux (principalement bovins, ovins, caprins et porcins). Cette maladie infectieuse est actuellement répandue dans le monde entier où elle provoque d'importantes pertes économiques, étant donné sa pathogénicité vis-à-vis du bétail.

Les lipopolysaccharides (LPS) présents au niveau de la membrane externe de *Brucella* représentent l'un de ses constituants antigéniques majeurs (voir fig 1). Ces LPS sont formés de trois parties :

- le lipide A : glycolipide enchassé dans la membrane et doué de propriétés toxiques .
- le core : composé de D-glucose, D-mannose et de 2-amino-2,6-didésoxy-D-glucose .
- la chaîne polysaccharidique O (=Antigène O) : portant les Ag A et M. Les souches ne portant pas cette chaîne sont dites R ("rough" ou "rugueuses") et celles la possédant sont dites S ("smooth" ou "lisses") . Les antigènes A et M sont donc uniquement portés par les souches S.

Dans ce cas précis de *Brucella*, l'antigène est connu et la banque de peptides aléatoires devrait permettre de tester des Ac monoclonaux anti-LPS contre une librairie d'épitopes et d'isoler ainsi un ou plusieurs peptides mimant la structure polysaccharidique de l'Ag réel.

Pour des raisons pratiques, les chercheurs préfèrent généralement travailler avec des mimotopes de nature peptidique que de travailler directement avec le LPS lui-même :

1. L'isolement et la manipulation des lipopolysaccharides de la membrane externe nécessite la mise en culture de l'agent pathogène, et ceci représente toujours un risque pour l'expérimentateur même si la bactérie est inactivée.

2. La quantité de lipopolysaccharides fournie par culture de bactéries est relativement faible.

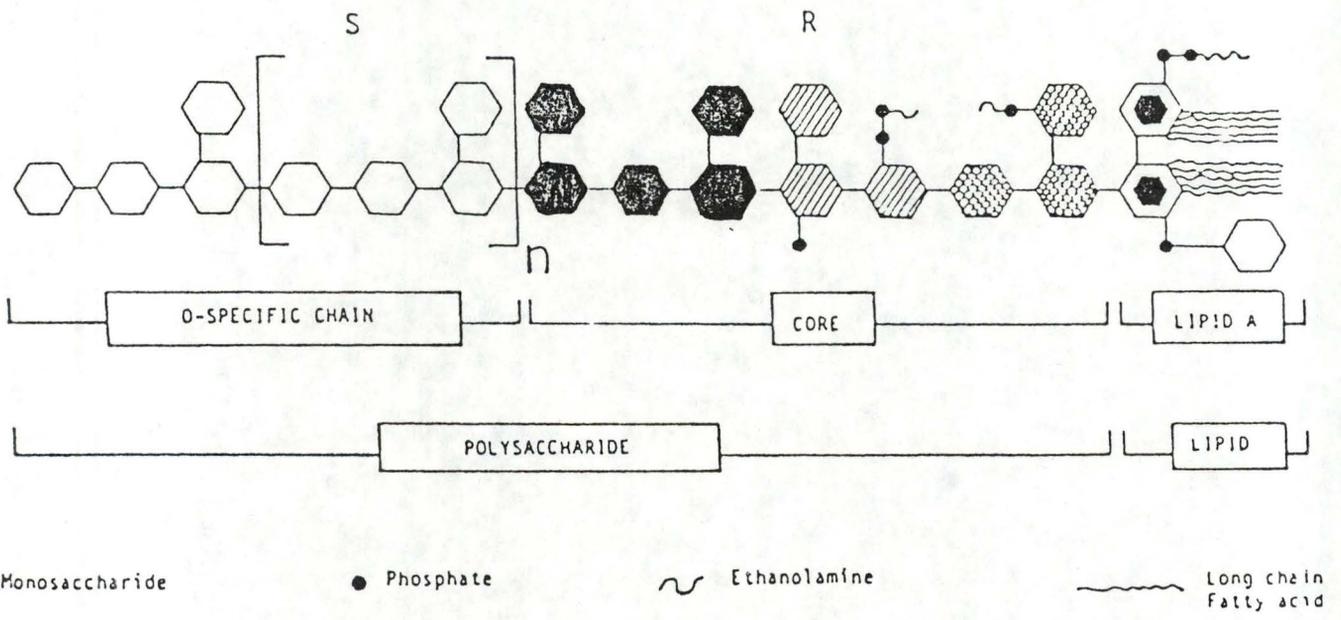


Fig.1 : Structure chimique des lipopolysaccharides.

3. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de synthèse chimique simple pour les chaînes polysaccharidiques.

4. Enfin, on peut espérer à l'avenir une plus grande spécificité de reconnaissance des anticorps vis-à-vis des épitopes peptidiques que vis-à-vis de leurs correspondants polysaccharidiques comme ce pourrait être le cas pour la brucellose. En effet, Hurvell *et al* (1973) ont montré une réactivité croisée entre le LPS de *Brucella abortus* et le LPS de *Yersinia enterocolitica*. Cette réaction croisée s'explique par l'homologie structurale des polysaccharides de leurs chaînes O.

La banque d'épitopes permettrait d'identifier des peptides reconnus par les Ac anti-*Brucella*. Parmi ceux-ci, certains pourraient être spécifiques de la brucellose et permettraient une amélioration des vaccins et des tests de diagnostic.

B. SYNTHÈSE D'UNE BANQUE D'ÉPITOPES :

B.1. Par synthèse peptidique classique :

B.1.1. Principe de la synthèse :

Celui-ci a été développé récemment par une équipe américaine (Lam *et al*, 1991). Par une stratégie de synthèse en phase solide probablement analogue à la méthode t-Boc (Merrifield, R.B., 1963), que nous rappellerons plus loin, ce laboratoire est parvenu à synthétiser sur des billes de résine une banque constituée de plusieurs millions de peptides différents.

L'ensemble de la résine est dans un premier temps divisée en plusieurs lots; chacun de ceux-ci est alors mis en présence d'un a.a. réactionnel différent. Par conséquent, si les 20 a.a. sont représentés dans la banque, c'est en 20 lots que la résine sera répartie. Après la fixation du premier résidu, la totalité des billes est rassemblée, remélangée et

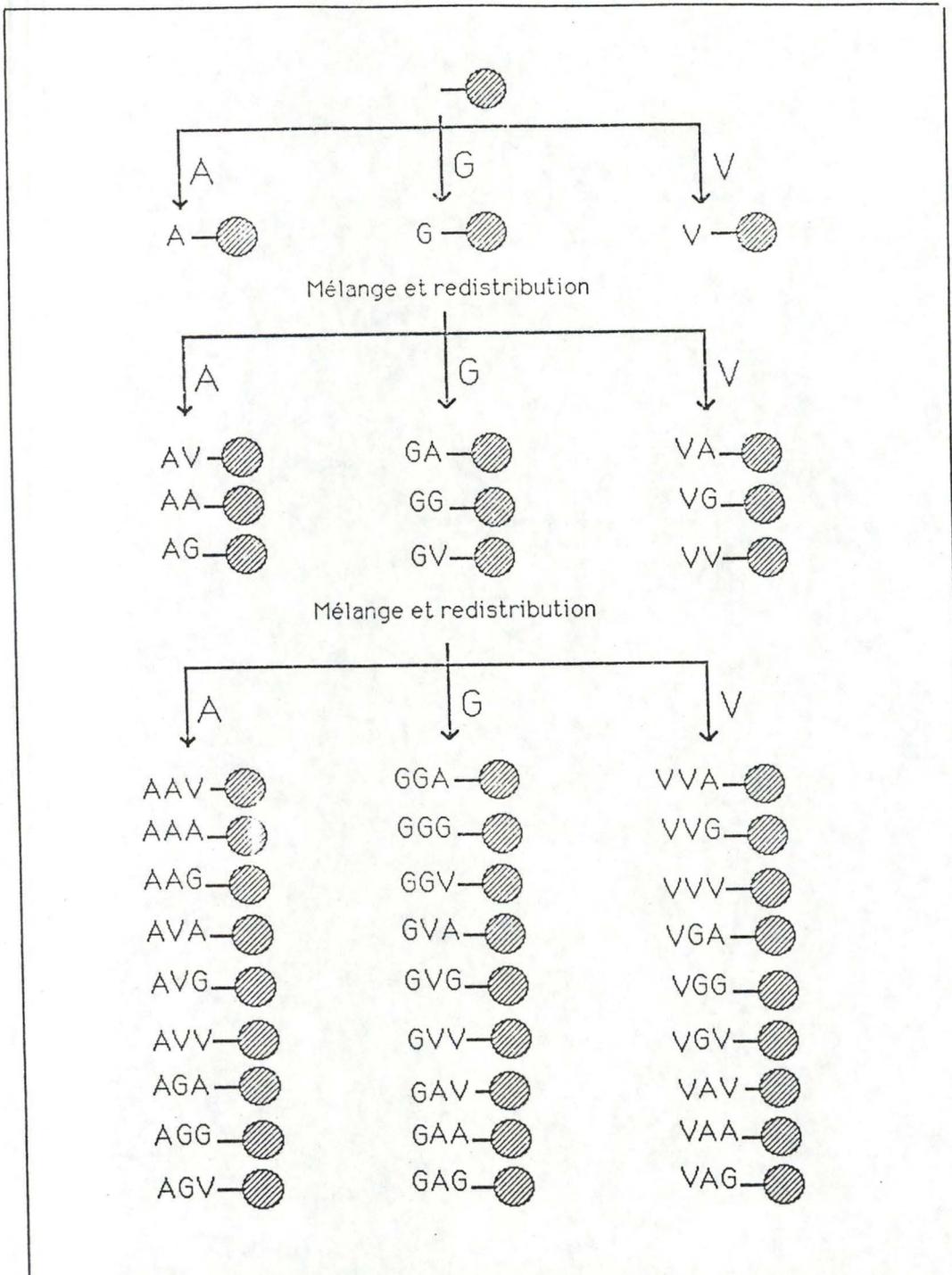


Fig.2a : Représentation schématique du principe de synthèse d'une banque de peptides aléatoires par voie chimique en phase solide. Des tripeptides sont construits à partir de l'alanine (A), la glycine (G) et la valine (V). Après chacune des étapes de couplage, les billes sont rassemblées, mélangées et redistribuées aléatoirement vers les trois acides aminés. Après trois étapes, 27 (3^3) possibilités de séquences peptidiques sont représentées sur des billes différentes.

redistribuée *aléatoirement* en 20 nouveaux lots en vue d'y fixer un second résidu (fig.2a). Cette opération est recommencée autant de fois qu'il est nécessaire pour obtenir la longueur peptidique désirée.

Dans ce cas bien précis, cette approche a permis la construction d'une banque de pentapeptides formée à partir de 19 a.a., ce qui représente 2 476 099 (19^5) peptides différents où chacune des séquences est représentée en théorie sur au moins une bille de résine. Bien entendu, le nombre de billes pour une séquence donnée suit une distribution de Poisson, il est par conséquent indispensable d'utiliser un nombre de billes plusieurs fois supérieur au nombre théorique maximum de peptides possibles afin de s'assurer de la présence de chacun des peptides dans la banque.

Il est toutefois à noter que parmi les 20 acides aminés, 2 résidus demandent une attention particulière : il s'agit de la cystéine (en raison de la formation éventuelle de ponts disulfures) et du tryptophane qui pour cause d'encombrement stérique ne se fixe pas toujours à 100% lors de la réaction d'acylation. De ce fait, il est généralement conseillé par la littérature de les éviter lors de la construction de la banque (Houghten *et al*, 1991). C'est également ce qui a été fait par Lam *et al* (1991), du moins en ce qui concerne la cystéine.

B.1.2. Screening de la banque :

Le but de cette étape est de reconnaître, isoler et identifier le(s) peptide(s) capable(s) de se lier à une "molécule acceptrice" particulière (un Ac, par exemple).

La molécule acceptrice peut être couplée à un enzyme marqueur comme la phosphatase alcaline ou à une molécule fluorescente comme la fluorescéine; elle est alors incubée, sous forme soluble, en présence de la banque peptidique. Certains peptides sont alors reconnus et les billes sur lesquelles ils sont greffés, deviennent détectables de l'ensemble de la banque soit grâce à la coloration du produit de la réaction de la phosphatase, soit grâce à la fluorescence émise par la fluorescéine.

A l'aide de petits forceps couplés à un micromanipulateur, les billes sélectionnées peuvent alors être isolées de la banque pour analyse (fig. 2b).

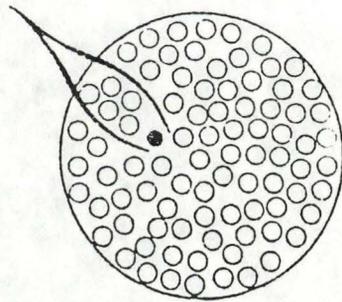


Fig.2c : Représentation schématique de l'isolement par micromanipulation des billes reconnues par la "molécule acceptrice".

Elles sont ensuite lavées à l'aide de guanidine HCl 8M, afin d'éliminer toute trace de "molécule acceptrice" et "révélatrice". On peut alors enfin réaliser le microséquençage du (des) peptide(s) greffée(s) sur la résine pour identifier définitivement la séquence reconnue par la "molécule acceptrice".

B.1.3. Avantages :

1. Il s'agit d'une méthode relativement simple et rapide.
2. La chimie de la synthèse peptidique est relativement bien maîtrisée.
3. On dispose de nombreuses potentialités chimiques. On pourrait, par exemple, par cette méthode, introduire dans la banque :
 - des acides aminés D
 - des résidus possédant des chaînes latérales modifiées ou inexistantes dans la nature
 - des structures secondaires spécifiques
4. Les peptides ainsi identifiés peuvent avoir une affinité vis-à-vis de leur molécule acceptrice semblable à celle des ligands naturels. Ceci ne semble pas être le cas avec les banques de phages.

Prenons un exemple :

Lam *et al* (1991) ont étudié un Ac monoclonal dirigé contre la β -endorphine qui reconnaît la séquence épitope YGGFL avec une forte affinité ($K_i = 17,5$ nM). D'une banque de peptides sur résine, ces auteurs ont pu isoler 6 billes, dont une portant la séquence YGGFQ qui a une affinité ($K_i = 15,0$ nM) presque identique à celle de l'épitope natif. Steven Cwirla (Cwirla *et al*, 1990) de son côté a effectué un travail similaire sur la β -endorphine à l'aide d'une banque d'épitopes sur phages.

Six hexapeptides ont aussi été sélectionnés et leur affinité de liaison a été testée. Les valeurs obtenues sont de l'ordre de $0,35$ μ M à $8,3$ μ M alors que celle du peptide natif est de $7,1$ nM.

5. A côté d'une étude de structure primaire des peptides reconnus, il est également possible de réaliser une étude plus biochimique.

Il suffit pour cela d'introduire sur le support des liens d'ancrage qui soient clivables en fin de synthèse. Après exposition à un agent clivant, une portion de peptides pourra alors être libérée dans le milieu et utilisée pour d'autres analyses (Lam *et al*, 1991).

B.1.4. Inconvénients :

1. Il s'agit d'une méthode très coûteuse.

2. La cystéine et le tryptophane pouvant poser des problèmes lors de la synthèse, ils sont souvent évités. Toutes les combinaisons d'a.a. possibles ne sont donc pas nécessairement représentées dans une banque synthétisée chimiquement.

3. Les billes sélectionnées étant destinées au microséquençage, elles ne peuvent se retrouver à nouveau dans la banque après la manipulation. La librairie subit donc une dégradation progressive au fur et à mesure de son utilisation.

B.2. Par synthèse chimique activée par la lumière :

B.2.1. Principe de la synthèse :

Ce procédé encore peu usité et peu connu actuellement, a été décrit par Stephen Fodor (S.P.A Fodor *et al*, 1991). Il s'agit d'une méthode de synthèse chimique en phase solide utilisant des groupements protecteurs photolabiles.

Le support sur lequel a lieu la synthèse est exposé à la lumière à travers des caches en forme d'échiquiers (fig.3a) où alternent cases opaques et transparentes (afin d'activer une partie ou l'autre de la résine). La dimension des cases peut varier et est généralement de l'ordre du μm .

Cette activation par la lumière aboutit au clivage des groupes protecteurs nitroveratryloxycarbonyles photolabiles (NVOC) dans les cases

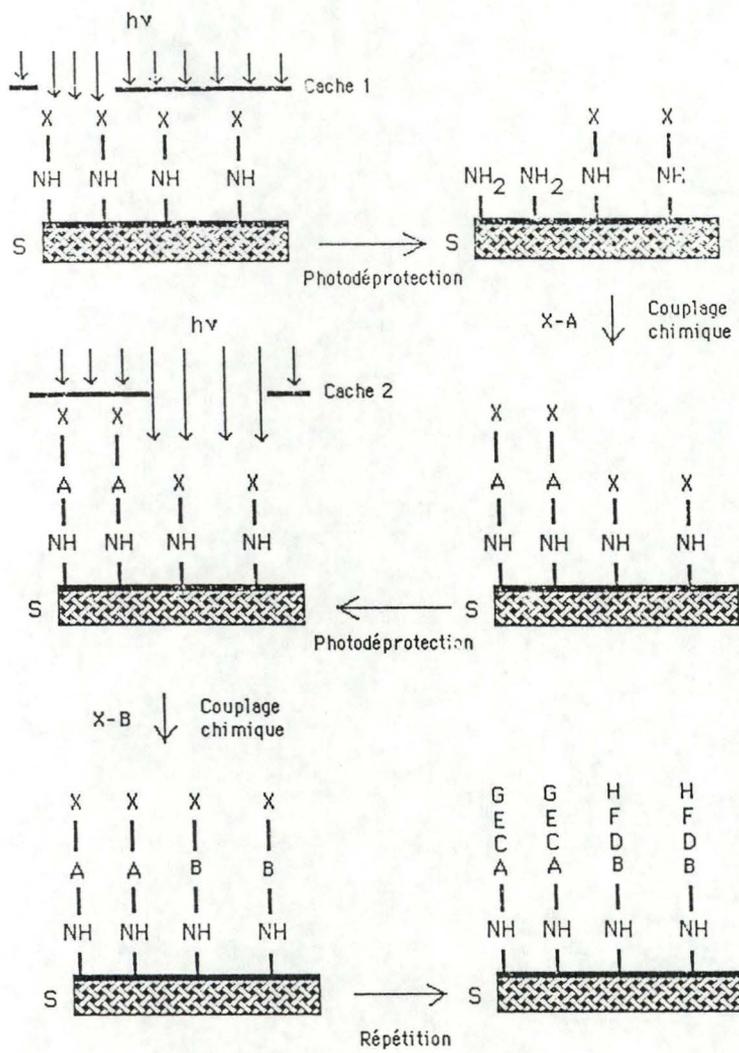


Fig.3a : Représentation schématique du principe de la synthèse peptidique activée par la lumière. Le support S, présentant des amines bloquées par des groupements protecteurs photolabiles (NVOC) est illuminé à travers un premier cache. Ceci provoque la déprotection des amines dans les régions illuminées qui sont ainsi devenues accessibles au premier résidu. Un second cache est ensuite utilisé pour photoactiver une région différente du support. Après plusieurs cycles de photodéprotection et de couplage, les produits désirés sont obtenus.

sélectionnées. Après cette déprotection, une première série de résidus est mise en présence de l'ensemble du support. La réaction ne se déroule que dans les cases qui ont été exposées à la lumière durant l'étape précédente.

Le substrat est alors illuminé à travers un second motif de caches, activant une région différente du support en vue de la réaction avec le deuxième groupe d'a.a. protégés. L'ensemble de ce processus est ainsi répété plusieurs fois jusqu'à obtention de la longueur de chaîne peptidique souhaitée.

B.2.2. Stratégies de synthèses combinées :

On constate donc que ce sont les types de caches, leur succession ainsi que la séquence des réactifs qui déterminent les produits finaux et leur emplacement (fig 3b). Par un procédé mathématique assez complexe, où chaque composé est défini par un produit de 2 vecteurs, la synthèse peptidique peut être représentée sous forme de matrice. A partir de celle-ci, il est alors possible de déterminer les types de caches (et leur succession) à utiliser afin d'obtenir le résultat souhaité.

A l'heure actuelle, seule une banque de 1024 peptides différents a été réalisée mais il est tout à fait envisageable, par ce procédé, d'en construire une plus conséquente, surtout en sachant que 40 000 composés différents peuvent être synthétisés par cm^2 .

B.2.3. Screening de la banque :

Pour détecter les régions du support ayant réagi avec l'Ac, on utilise des anti-Ac liés à une molécule fluorescente (fig. 3c). Comme, par cette méthode, on connaît l'emplacement exact de chaque produit, on connaît également, par sa localisation, la séquence du peptide qui a réagi avec les anticorps.

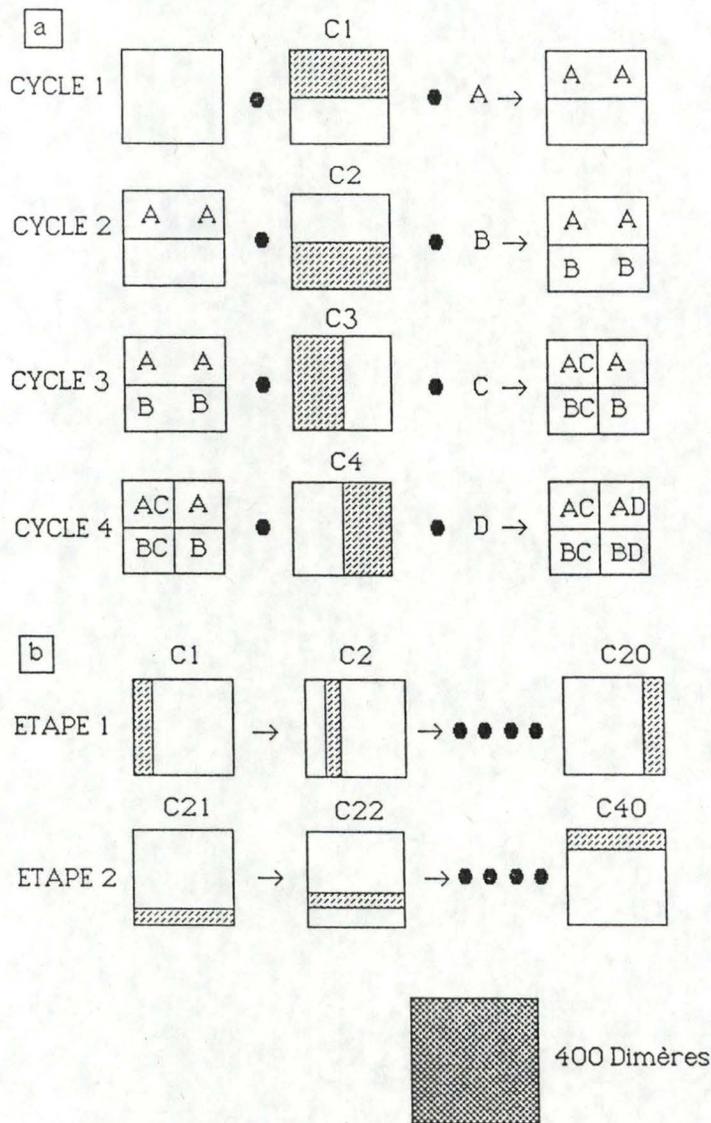


Fig.3b : Représentation schématique de 2 stratégies permettant la synthèse d'un plus grand nombre de peptides différents sur le support grâce à l'utilisation d'une succession de caches différents.

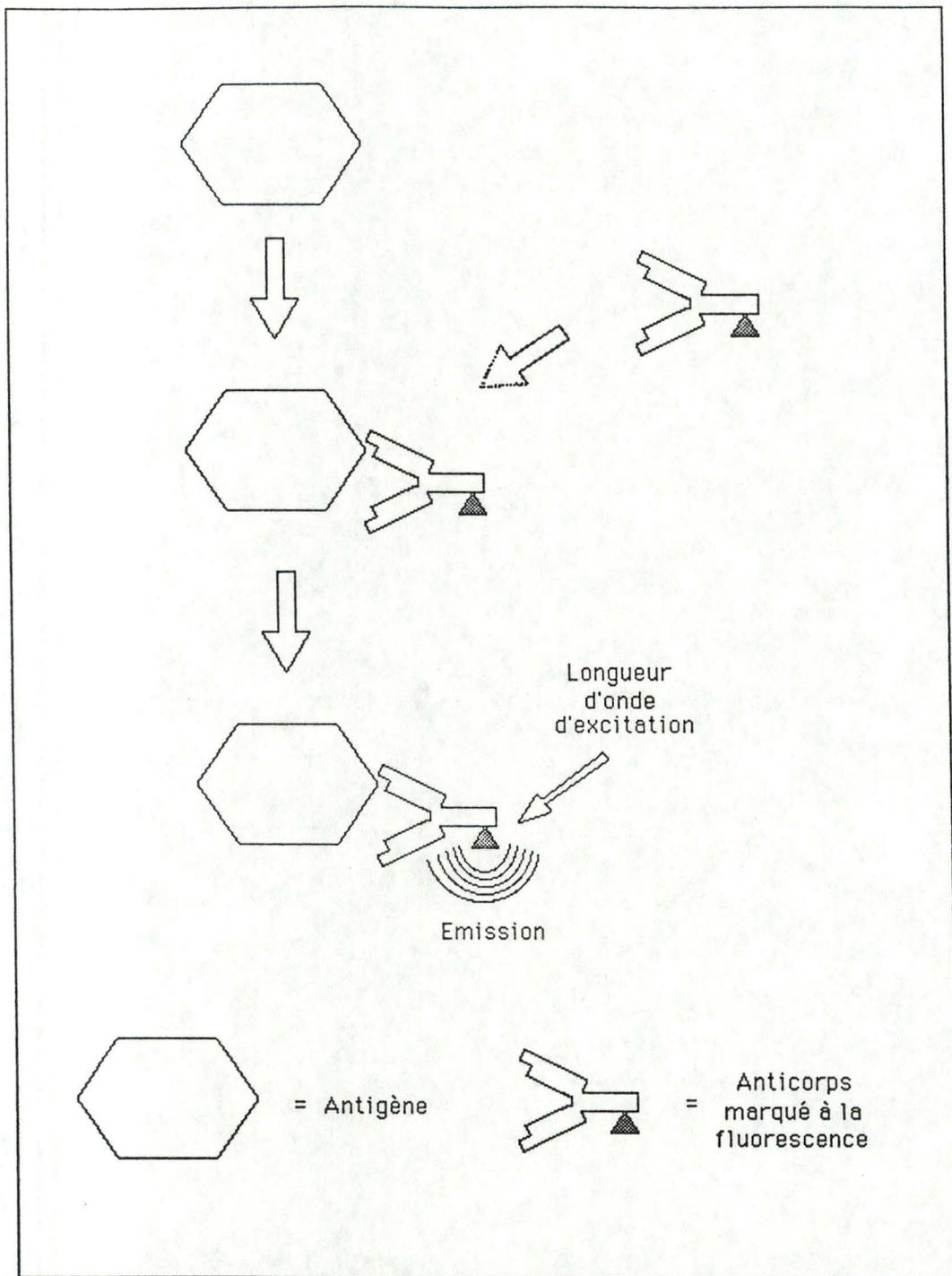


Fig.3c : Représentation schématique de la reconnaissance de peptides synthétisé par activation par lumière.

B.2.4. Avantages :

1. Comme pour la méthode précédente, ce procédé original possède certains avantages liés au fait même d'une synthèse chimique, à savoir essentiellement : la possibilité d'introduire des composés chimiques non synthétisables par les systèmes biologiques.

2. Mais son atout majeur réside surtout en la connaissance tout à fait précise de l'emplacement sur le support des différents composés synthétisés, ce qui évite, en fin de réaction, le séquençage des peptides qui réagissent avec l'anticorps et donc la destruction d'une partie de la banque lors de chacune de ses utilisations.

B.2.5. Inconvénients :

1. L'instrumentation nécessaire à la synthèse reste actuellement relativement coûteuse et la méthode mathématique complexe d'utilisation.

2. Du point de vue chimique, ce type de synthèse est encore peu connu.

3. A l'heure actuelle, aucune banque de taille importante n'a réellement été construite par cette méthode.

B3. Par synthèse biologique : la banque de phages .

Ce type de librairie d'épitopes est constitué d'une multitude de phages qui présentent à leur surface un déterminant antigénique, inséré à l'intérieur d'une protéine de leur membrane externe.

B.3.1. Quels sont les phages utilisés?

Très rapidement, ce sont les phages filamenteux qui ont été choisis. En effet, contrairement aux vecteurs d'expression conventionnels, tel que λ gt 11 (Young et David, 1983), les peptides, codés par des inserts aléatoires, sont

exprimés dans des protéines qui se trouvent exposées à la surface du virion lui-même, et non à l'intérieur de protéines cytoplasmiques (Parmley *et al*, 1988). Ceci représente un avantage considérable lors du screening ultérieur de la banque, puisque les anticorps peuvent être utilisés directement pour sélectionner les clones désirés.

De plus, ces phages ayant une affinité plus importante que d'autres phages pour le support, ils permettent l'étalement d'un plus grand nombre de phages en une seule étape et par conséquent le screening simultané d'un nombre plus élevé d'épitopes (Devlin *et al*, 1990).

Il est possible, mais peu intéressant d'utiliser les phages filamenteux sous leur forme sauvage. Les chercheurs ont donc amélioré ces vecteurs par mutagenèse dirigée, afin de les rendre plus adaptés encore à la technique. Nous citons ci-dessous quelques exemples d'améliorations apportées à la méthode des phages et qui ont conduit récemment à la création des vecteurs dits de la série fUSE (Parmley *et al*, 1990).

- la formation de nouveaux sites de restriction permettant de placer l'insert étranger, non plus au milieu de la protéine de surface mais du côté NH₂-terminal. Cette position externe permet de minimiser l'effet de l'insert sur les fonctions de la protéine.
- l'insertion d'un gène de résistance à la tétracycline, permettant une sélection visuelle des phages.
- la création d'un décalage de lecture dans la séquence; de cette manière, seuls les vecteurs ayant bien accepté l'insert étranger restaurant la phase de lecture seront produits.

B.3.2. Principe :

Dans tous les articles, l'insert étranger est représenté comme suit : (NNK/S)_x où :

- N = un mélange de G, T, A, et C.
- K (ou S) = une mixture de G et C.
- x = le nombre d'a.a. désirés.

Le fait d'éviter A et T en troisième position permet de ne produire qu'un seul des 3 codons STOP. Un tel mélange de nucléotides entraîne donc la

traduction des 20 résidus de manière aléatoire. L'insert est alors intégré dans l'ADN du vecteur au niveau du gène codant pour une protéine de surface, formant ainsi ce qu'on appelle un "phage de fusion".

Les protéines de surface les plus couramment utilisées sont :

-la protéine III :

Il s'agit d'une protéine de la capsid, représentée en cinq exemplaires sur le virion (Felici et al, 1991; Parmley et al, 1988). Son domaine C-terminal est enfoui et nécessaire à l'assemblage d'un phage normal. Son domaine N-terminal est exposé à l'extérieur du virion et se lie au pilus F des bactéries pour initier l'infection. La protéine III intervient donc lors de 2 phénomènes principaux : l'infection et la morphogénèse.

Il est important de noter que l'insert étranger peut parfois modifier la protéine au point d'interférer avec sa fonction, formant ainsi, par exemple, des phages non-infectieux. Par ailleurs, la présence de séquences hydrophobes peut parfois empêcher le transfert de pIII au niveau de la membrane.

-la protéine VIII :

Il s'agit d'une protéine majeure de la capsid du phage ϕ 1. La protéine mature est composée de 50 résidus et peut être divisée en 3 domaines d'après sa composition en a.a. P VIII est initialement synthétisée sous forme d'un précurseur possédant du côté N-terminal une extension de 23 a.a. Cette extension, après avoir contribué à l'insertion de la protéine dans la membrane cytoplasmique, est processée par une peptidase. Ce domaine N-terminal n'intervenant ni lors de l'infection ni lors de l'assemblage du phage, fait de la protéine VIII un candidat idéal pour l'insertion d'un fragment étranger.

B.3.3. Screening de la banque :

Les phages de fusion qui présentent le déterminant antigénique désiré, peuvent être sélectionnés à partir d'un très grand nombre de phages par purification d'affinité (Scott et Smith, 1990).

Dans un premier temps, on fait réagir les phages avec un anticorps biotinylé.

Ensuite, les phages sont dilués et placés dans des boîtes de Petri coatées avec de la streptavidine. De ce fait, seuls les phages ayant réagi avec l'Ac s'attachent à la surface du plastique via une liaison biotine-streptavidine, tandis que le reste des phages est lavé (fig.4.). Les phages qui se sont liés sont finalement élués à l'acide et utilisés pour infecter *E. coli*.

B.3.4. Avantages :

1. Cette méthode est moins coûteuse que la méthode de synthèse chimique en phase solide.

2. Les 20 résidus sont exprimés, y compris la cystéine et le tryptophane qui posaient des problèmes en synthèse chimique.

3. Après avoir sélectionné les phages intéressants, il est possible d'amplifier le matériel par une seconde infection.

4. Enfin, ce qui représente sans doute le plus grand intérêt de cette méthode, c'est l'association génotype/phénotype, puisque sont à la fois présents le déterminant antigénique et l'insert d'ADN codant pour celui-ci. Les deux peuvent donc être déterminés.

B.3.5. Inconvénients :

1. Seules les structures synthétisables biologiquement sont représentées dans ce type de banque.

2. Le déterminant antigénique se trouve à l'intérieur d'une protéine. Il peut subir, de ce fait, des contraintes conformationnelles susceptibles de

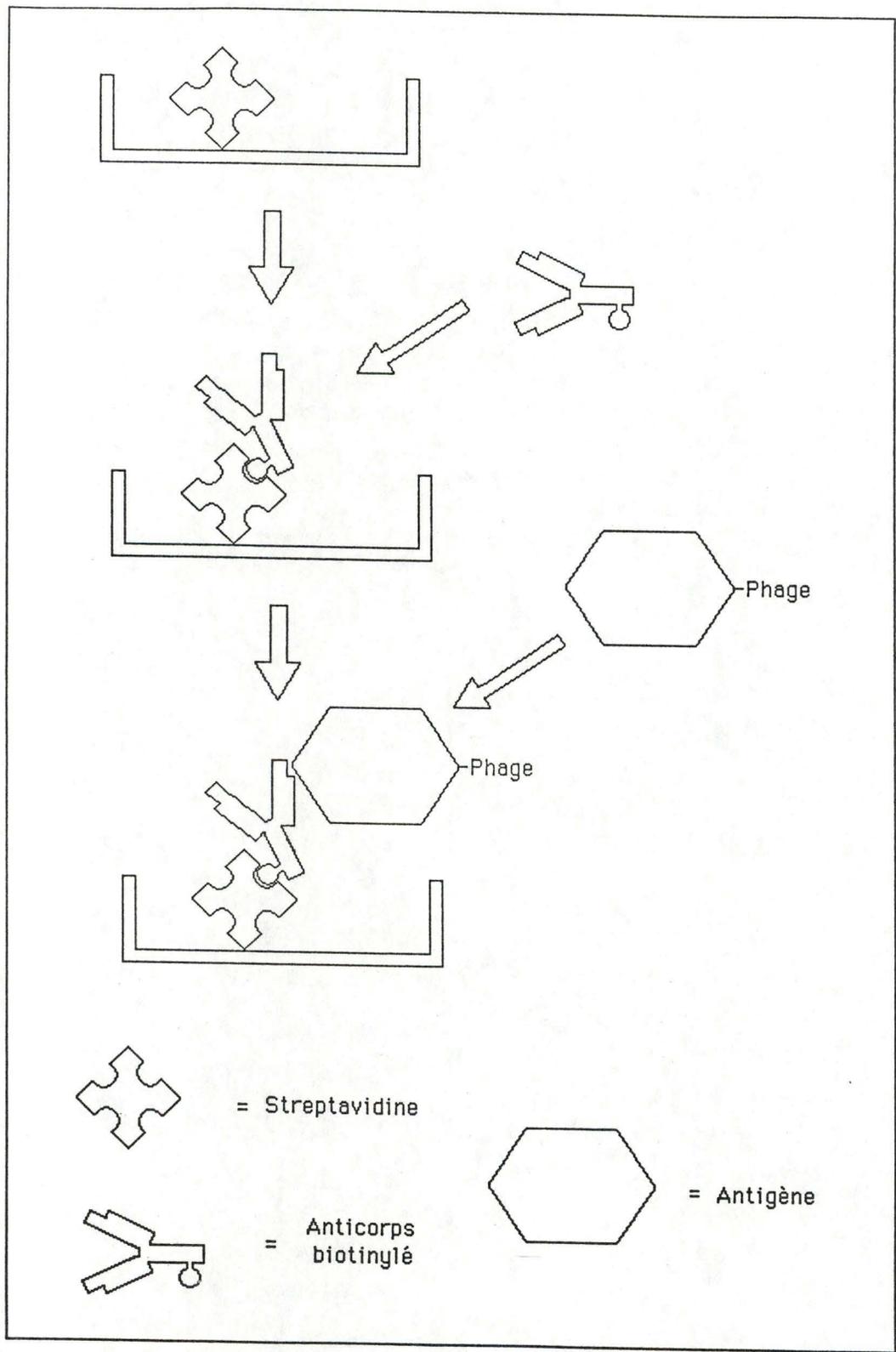


Fig.4 : Représentation schématique de la reconnaissance du peptide par la "molécule acceptrice" lors du screening d'une banque de phages.

modifier, de diminuer ou même d'empêcher sa reconnaissance par la "molécule acceptrice".

3. L'isolement du (des) peptide(s) intéressant(s) ne se réalise pas en une seule étape mais bien suite à plusieurs purifications d'affinité successives.

4. Le microséquençage ne peut s'effectuer sur le phage lui-même. Une purification préalable du peptide est nécessaire.

C. BUTS ET OBJECTIFS DU MEMOIRE :

Notre travail a été envisagé dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Microbiologie et d'Immunologie des FUNDP. En effet, l'un des principaux sujets de recherche développé par l'équipe du Prof. Letesson porte sur la brucellose bovine. Comme nous l'avons déjà explicité au point **A3** de cette introduction, une banque d'épitopes testée à l'aide d'Ac monoclonaux anti-LPS dirigés contre *Brucella* pourrait apporter une aide considérable dans la recherche de "mimotopes" de l'Ag réel.

C'est donc dans le but d'apporter une contribution à cette recherche que nous nous sommes attachés, au cours de ce mémoire, à mettre au point les diverses étapes nécessaires à l'utilisation d'une banque de peptides aléatoires synthétisée par voie chimique.

Pour ce faire, nous avons eu la possibilité d'établir une collaboration avec le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie de l'Université de Sherbrooke (Québec, Canada). Le Prof. Fournier et ses chercheurs sont, en effet, spécialisés dans la synthèse de peptides sur billes de résine relativement hydrophile (de type polyacrylamide), convenant particulièrement bien pour l'élaboration d'une telle banque.

C'est donc sur ce type de support que nous avons tenté de réaliser toutes les mises au point et cela en choisissant comme modèle des billes sur lesquelles se trouve greffé le peptide vasoactif intestinal de porc (VIP).

C1. Choix de la méthode :

La méthode que nous avons choisie pour l'élaboration de la banque peptidique se base essentiellement sur l'article de Lam. *et al*, (1991). Les auteurs proposaient la synthèse d'une banque d'épitopes par voie chimique où l'ensemble des combinaisons possibles de résidus est représentée.

Cette librairie peut alors être testée à l'aide d'Ac monoclonaux dans le but d'isoler les peptides se liant à la "molécule acceptrice" désirée. Après avoir isolé de l'ensemble de la banque les quelques billes intéressantes, les peptides greffés sont séquencés sur leur support.

Malheureusement, l'article original de Lam *et al*, (1991) ne mentionne aucun détail de la procédure pratique à suivre concernant la synthèse proprement dite. C'est pourquoi, nous avons, dans le cadre de ce mémoire, gardé l'idée originale des travaux de Lam *et al* (1991) mais en élaborant de par nous-même une manière de procéder afin d'atteindre ce but.

La méthode de synthèse peptidique la plus utilisée à l'heure actuelle est la synthèse en phase solide telle qu'elle a été décrite en 1963 par Merrifield (R. B. Merrifield, 1963 et 1969).

Suivant cette méthode, on utilise comme support solide pour la synthèse une résine de polystyrène activée de manière à y introduire des groupements $-NH_2$ réactionnels.

Dans la représentation schématique (fig. 5), on peut constater que durant la synthèse, chaque résidu est ajouté sous sa forme activée (extrémité carboxy-terminale) et protégée (extrémité amino-terminale). Ceci a l'avantage de minimiser les risques de réactions secondaires indésirables ou une fixation non contrôlée des a.a.

Le premier a.a. est fixé par son extrémité carboxyterminale à la résine (support polymérique insoluble). Les résidus suivants se lient ensuite également par liaison peptidique. Par conséquent, après la fixation, le groupement protecteur de l'amine doit être enlevé (déprotection) pour permettre l'addition de l'a.a. protégé suivant (acylation).

Les étapes de déprotection et d'acylation sont répétées, entrecoupées de lavages pour enlever les produits de réaction et les réactifs en excès jusqu'à ce que le peptide souhaité soit obtenu. Celui-ci est ensuite clivé de son

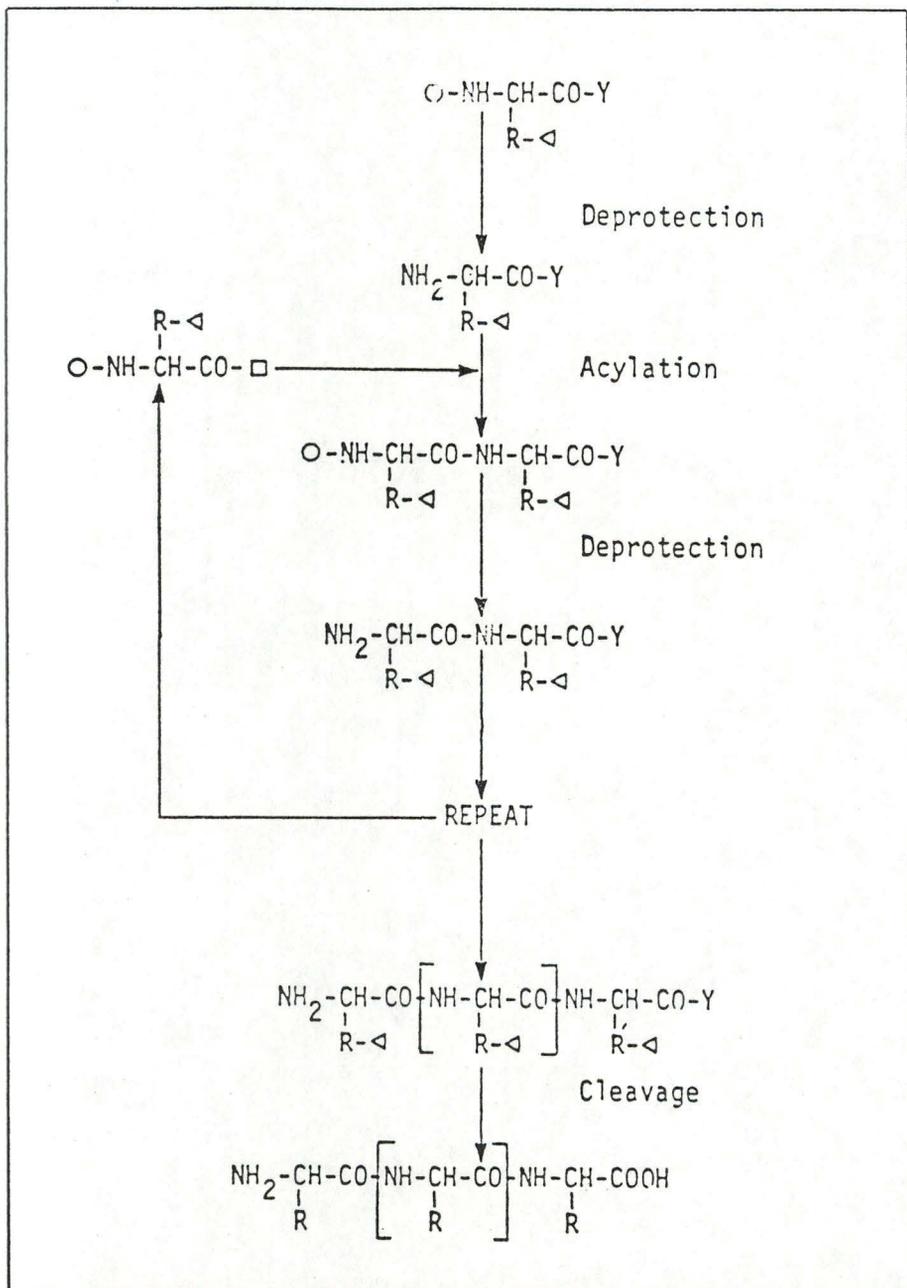


Fig.5 : Principe schématisé de la synthèse peptidique t-Boc.

△ = groupement protecteur des chaînes latérales

○ = groupement protecteur Boc de l'amine terminale

Y = résine, support solide de la synthèse

support solide et complètement déprotégé après traitement par un réactif de clivage.

Ce procédé régulièrement utilisé au laboratoire de Biochimie Cellulaire constitue ce que l'on nomme la méthode t-Boc, en référence au nom du groupement tertio-butyloxycarbone protecteur de l'amine, utilisé lors de la synthèse. Cette technique pourrait convenir pour la synthèse d'une banque peptidique telle que celle décrite plus haut moyennant quelques modifications:

En effet, lors de l'étape finale, les groupements protecteurs des diverses chaînes latérales sont clivés à l'HF. Cette réaction provoque également le clivage des peptides de la résine. Hors dans ce cas précis, les peptides doivent rester greffés sur le support, même après le clivage des groupements protecteurs latéraux.

Un second problème rencontré est lié au caractère particulièrement hydrophobe de la résine de polystyrène qui la rend insoluble en milieux aqueux et qui pourrait, de ce fait, empêcher les réactions de reconnaissance Ag-Ac de se dérouler correctement. Nous soupçonnons donc sur ce point une incompatibilité de la résine de polystyrène avec les méthodes de détection présentées plus haut. Nous suspectons que ce genre de problèmes puisse être à l'origine des problèmes de détection actuellement rencontrés au laboratoire de Chimie des Biomolécules (Institut Pasteur, Lille) par l'équipe du Prof. Tartar.

C2. Solution proposée :

Afin d'éviter les 2 inconvénients décrits ci-dessus, nous avons dès lors pris contact avec le Prof. Fournier, de l'Université du Québec (Canada) qui a mis au point un procédé original permettant la synthèse de peptides sur des billes de polyacrylamide hydrophiles. (Fournier *et al*, 1992).

Le principe de la synthèse est le suivant :

1. Avant le greffage du premier résidu, la résine de polyacrylamide doit être préparée en vue de la synthèse. Ceci s'effectue en plusieurs étapes :

- fonctionnalisation au méthylester de sarcosine
- traitement à l'éthylènediamine permettant l'introduction d'amines libres sur le support
- greffage d'un spacer : le Boc- ϵ -acide aminocaproïque (Boc-Aca)

2. Après avoir enlevé le groupement Boc de l'acide aminocaproïque et avoir lavé plusieurs fois la résine, la synthèse peptidique proprement dite peut commencer. La grande nouveauté apportée dans la stratégie du Prof. Fournier est l'utilisation de groupements protecteurs des chaînes latérales non clivés à l'HF. En effet, alors que les peptides pourraient être clivés classiquement à l'HF, les groupements protecteurs sont quant à eux éliminés à l'aide d'une solution de TFA (90%), thioanisole (5%), EDT (3%) et anisole (2%).

Cette nouvelle synthèse nous est donc apparue comme la solution idéale dans le cadre de la construction d'une banque peptidique. Elle se trouve, à titre indicatif, plus complètement décrite dans le chapitre "matériels et méthodes".

C3. Objectifs du mémoire :

Au cours de ce travail, nous avons donc voulu mettre au point les différentes étapes nécessaires à l'utilisation d'une banque de peptides aléatoires. Celles-ci sont au nombre de 4 :

1. la mise en évidence des billes positives par une réaction avec un anticorps spécifique dirigé contre un peptide particulier et révélé à la protéine-G peroxydase.

2. l'isolement de celles-ci de l'ensemble de la banque par micromanipulation.

3. le lavage des billes afin d'éliminer du support les anticorps et les molécules révélatrices.

4. le microséquençage du peptide sur la bille de polystyrène.

Nous avons également essayé de caractériser brièvement ce nouveau type de support de synthèse.

Dans ce but, le Prof. Fournier nous a procuré un lot de billes vierges ainsi qu'un second lot de billes sur lesquelles se trouve greffé du peptide vasoactif intestinal de porc (VIP). C'est donc ce peptide particulier, décrit de manière plus détaillée au point suivant, qui a servi de modèle tout au long des expériences.

C4. Le peptide vasoactif intestinal de porc (V.I.P.) :

C.4.1. Séquence et localisation :

Le V.I.P. est un octacosapeptide, isolé initialement du duodénum de porc par Said et Mutt en 1972. La séquence peptidique (Merck Index, 1983) greffée sur les billes de polyacrylamide est représentée en fig 6. Cette séquence est très proche de celle de la sécrétine et du glucagon et est extrêmement bien conservée entre les différentes espèces (Ito et Tachibana, 1990).

Outre le tractus gastrointestinal, le V.I.P. a également été retrouvé au niveau :

- du SNC et périphérique
- des organes génitaux
- du tractus respiratoire.

**His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-
Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-
Ser-Ile-Leu-Asn.**

Fig.6 : Séquence du peptide vasoactif intestinal de porc (VIP).

C.4.2. Rôles :

Les actions biologiques du V.I.P. couvrent un large spectre (Magistretti, 1986). En voici, les principales :

- vasodilatation
- relaxation de la musculature lisse et effet bronchodilatateur
- stimulation de la sécrétion pancréatique exocrine et endocrine
- stimulation de la sécrétion d'eau et de certains ions au niveau intestinal
- neurotransmetteur, au niveau du cortex cérébral

Au niveau cellulaire, une action du V.I.P. a été établie dans divers systèmes cellulaires, y compris le cortex cérébral. Il joue un rôle de stimulateur de l'enzyme membranaire adénylate-cyclase, qui résulte en une augmentation des niveaux d'AMPc, à l'intérieur de la cellule cible. L'AMPc, étant un messenger intracellulaire, il va induire une cascade de phosphorylations de protéines, modulant ainsi de nombreuses activités enzymatiques.

C.4.3. Structure :

Il a été démontré que le V.I.P. sous sa conformation active possède principalement une structure en hélice- α , du côté C-terminal (Fry *et al*, 1988).

Par mutations progressives de tous les a.a. du V.I.P., on a pu montrer quels étaient les résidus importants pour la liaison avec le récepteur.

Il s'agit de : Asp₃, Phe₆, Thr₇, Tyr₁₀ et Leu₂₃ (O'Donnell *et al*, 1991).

La majorité de ces a.a. se situent dans la région N-terminale ce qui appuyerait l'hypothèse suggérée par A. Fournier (Fournier *et al*, 1984) selon laquelle la structure α -hélicoïdale adoptée par la portion C-terminale du V.I.P. serait en fait nécessaire à la stabilisation du domaine N-terminal en vue d'une interaction avec le récepteur et indispensable à la formation de β -turns (en position 1-4).

MATERIELS ET METHODES

A. MATERIELS :

A.1. Test ELISA :

Le peptide vasoactif intestinal (VIP) a été fourni par Saxon Biochemicals GMBN (Hannovre, Allemagne) et l'anticorps anti-VIP par Biogenesis (Bournemouth, Grande-Bretagne). Le NaCl ainsi que l'eau oxygénée (H₂O₂) proviennent de Merck (Darmstad, Allemagne). La protéine-G peroxydase a été procurée par Biorad (Richmond, USA) et le 1,2-Ophénylènediamine (OPD) par Sigma Chemicals Company (St Louis, USA). Le Tween provient de chez Fluka Chemica (Suisse). Quant aux plaques multipuits Maxisorb, elles proviennent d'Inter Med (Nunc, Danemark).

A.2. Révélation à la peroxydase sur billes de polyacrylamide :

Les billes de polyacrylamide vierges ainsi que celles sur lesquelles se trouve greffé le VIP proviennent du laboratoire du Prof. Fournier (Université du Québec, Montréal, Canada). Le NaN₃ (azide de sodium), l'acétate de sodium, ainsi que l'acide acétique sont fournis par UCB (Leuven, Belgique). Le 3-amino 9-éthyl carbazole (AEC) et le sulfonylfluorure de phénylméthyl (PMSF) ont été procurés par Sigma. Les références de l'anti-VIP, de la protéine-G peroxydase, de l'eau oxygénée et des différents composés du PBS (Phosphate Buffer Saline), ont déjà été mentionnées au point A.

A.3. Lavages des billes :

L'acide chlorhydrique (HCl) et la glycine proviennent de Merck. L'urée, le Tris ainsi que la guanidine-HCl sont fournis par Janssen Chimica (Beerse, Belgique).

B. METHODES :

B.1. Test ELISA :

B.1.1. Principe :

Il s'agit d'une technique très sensible qui permet la détection d'antigènes (Ag) et d'anticorps (Ac) à de faibles concentrations (Roitt I. *et al*, 1988)

Le principe est le suivant :

Dans un premier temps, l'Ag en solution est incubé sur une plaque de polystyrène multipuits (96 puits) afin de l'immobiliser par adsorption sur le plastique. L'excès d'Ag non fixé est éliminé par lavage. La plaque peut ensuite être saturée par un excès de protéines balastes de manière à prévenir toute fixation non spécifique de protéines sur la plaque de plastique. Il s'agit là de l'étape de saturation. L'anticorps (Ac) à doser est ajouté et se fixe de façon spécifique à son Ag. Les protéines non fixées sont alors éliminées par lavages et l'Ac est détecté par un ligand couplé à un enzyme marqueur. Il s'agit souvent d'une protéine-G (se fixant sur les parties Fc des IgG) couplée à la peroxydase. La révélation se fait par addition d'un chromogène, substrat incolore oxydé par la portion enzymatique pour donner un produit coloré. La mesure de la densité optique (D.O.) de chacun des puits de la plaque permet de quantifier la fixation de l'Ac sur l'Ag.

B.1.2. Solutions utilisées :

Le PBS Tween, pH 7,4 est préparé à partir de :

- KCl : 200 mg
- KH₂PO₄ : 200 mg
- NaCl : 8,0 g
- Na₂HPO₄·2H₂O : 1,44 g
- Tween (0,1%) dans l'eau distillée.

Le sérum normal de lapin (SN) a été dilué à la même concentration que l'anti-VIP qui nous a été fourni en solution (0,575 mg/ml) dans du PBS azide. La concentration en immunoglobulines (IgG) dans le sérum négatif a été estimée par la mesure de son absorbance à 280 nm.

La solution de révélation a été réalisée comme suit :

- 9 ml de tampon citrate (0,2 M)phosphate (0,1 M) pH 5,0.
- 1 ml d'OPD (4mg/ml)
- 20 µl d'H₂O₂ 30% aq.

L'hydrolysate de caséine est formé à partir de 25 gr/l de caséine, hydrolysée à l'aide de NaOH 0,3M

B.1.3. Méthode :

1. Adsorption de l'Ag sur la plaque multipuits par l'antigène :

- diluer le VIP dans du PBS/Tween (Tw) afin d'obtenir une concentration finale de 10 µg/ml
- déposer 50 µl de solution par puits
- laisser incuber la plaque une nuit à 4°C.

2. Saturation :

- ajouter 100 µl/puits d'hydrolysate de caséine (HC) dilué dans le PBS (50:50).
- incuber 2 heures à température ambiante.

3. Lavages au PBS/Tw.

4. Incubation de l'anticorps:

- diluer de 3 fois en 3 fois l'anti-VIP (sérum positif) et le SN de lapin (sérum négatif) dans du PBS/Tw/HC
- déposer 50 µl/puits de chacune des dilutions
- incuber une heure à température ambiante.

5. Lavages au PBS/Tw.

6. Ajout de la protéine-G peroxydase :

- diluer la protéine-G peroxydase 1000 fois dans du PBS/Tw
- déposer 50 µl/puits
- incuber une heure à température ambiante.

7. Lavages au PBS/Tw.

8. Révélation à l'OPD :

- déposer 100 µl/puits de la solution révélatrice
- laisser réagir 20 minutes à l'abri de la lumière
- stopper la réaction par 25 µl/puits d'H₂SO₄ 2M.

9. Mesurer la D.O. aux λ de 490 et 630 nm à l'aide du lecteur de plaques (Microplate E-L 40, Biokinetics Reader, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA).

B2. Synthèse peptidique sur billes de polyacrylamide.

A titre indicatif, nous décrivons ci-après la méthode de synthèse en phase solide mise au point au laboratoire de Physiologie et Pharmacologie de l'Université de Sherbrook (Canada) et qui permet de synthétiser des peptides restant greffés sur les billes du support même après déprotection de leurs fonctions latérales (fig.7.). Un mode opératoire détaillé de ce protocole de

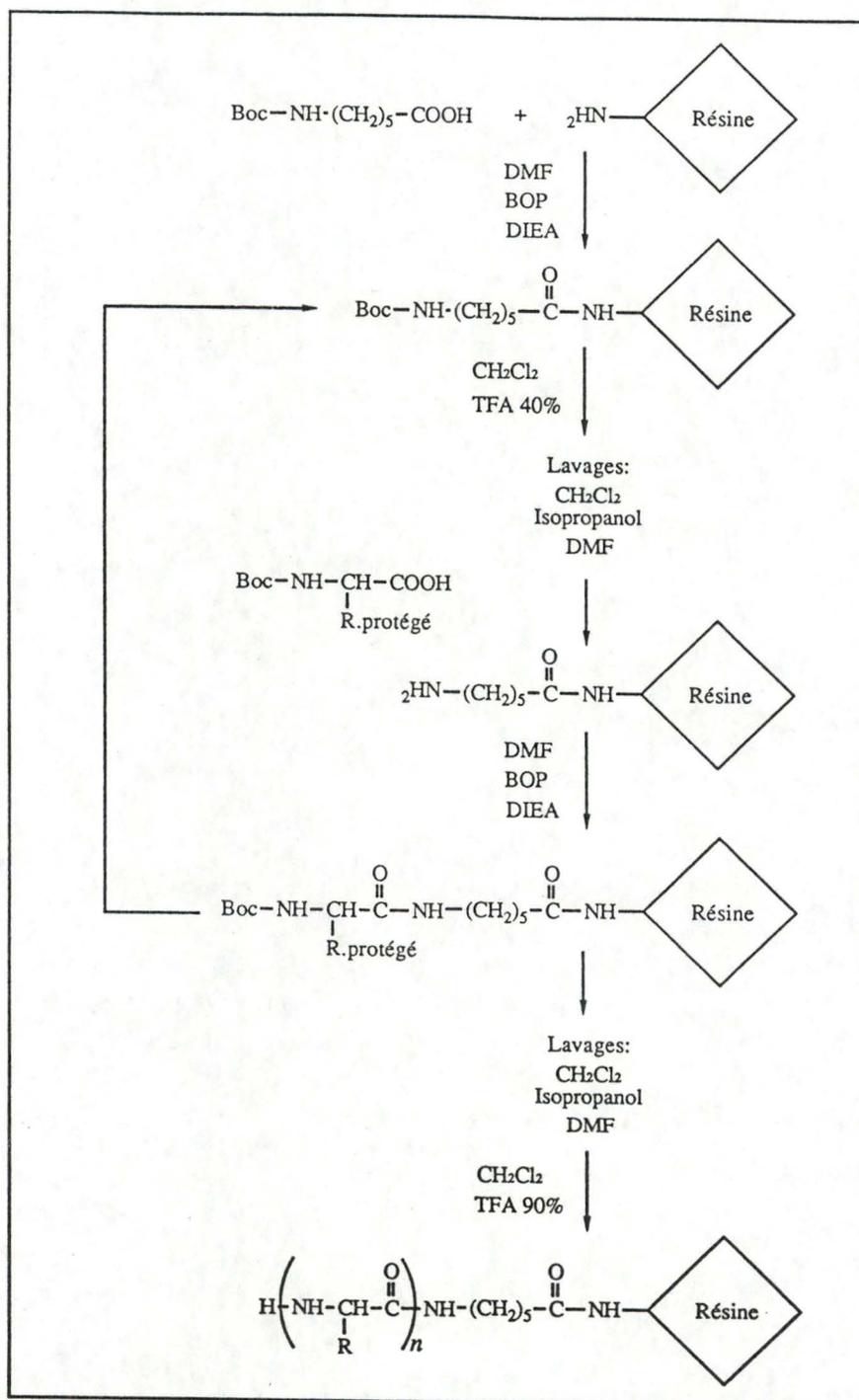


Fig.7 : Principe schématisé de la synthèse peptidique sur support solide de polyacrylamide. Celle-ci permet aux peptides de rester greffés sur le support après déprotection des chaînes latérales.

synthèse est actuellement soumis pour publication chez Biochemistry (Fournier *et al*, 1992).

B.2.1. Préparation de la résine en vue de la synthèse :

Le gel de polyacrylamide utilisé comme support solide pour la synthèse peptidique est activé avec au méthylester de sarcosine (0,3 mmol/g) et traité avec de l'éthylènediamine afin d'engendrer les amines primaires comme points d'ancrage de la synthèse peptidique. Un bras d'espacement de 6 carbones (Boc-e-acide aminocaproïque) est ensuite couplé à l'amine du support. Cette réaction s'effectue dans du DMF en présence du réactif BOP et de diisopropyléthylamine.

B.2.2. Fixation des acides aminés :

B.2.2.1. Clivage du groupement Boc :

Le gel est ensuite rééquilibré dans du dichlorométhane avant de réaliser le clivage du groupement protecteur Boc de l'acide aminocaproïque au TFA 40% (dans du dichlorométhane).

B.2.2.2. Couplage de l'acide aminé suivant :

Après plusieurs lavages au dichlorométhane, à l'isopropanol et au DMF, on ajoute, en présence de BOP et de DIEA le dérivé acide aminé Boc dont les chaînes latérales réactionnelles ont été protégées. Après réaction, la résine est à nouveau lavée plusieurs fois au DMF, à l'isopropanol et au dichlorométhane. Ce processus est ensuite recommencé pour les acides aminés suivants jusqu'à obtention de la chaîne peptidique souhaitée.

B.2.3. Clivage des groupes protecteurs des chaînes latérales :

Celui-ci se réalise grâce à une solution R (TFA 90%, thioanisole 5%, EDT 3%, anisole 2%) que l'on laisse incuber pendant 7 heures sous agitation. Après clivage, la résine est lavée par du TFA, de l'isopropanol puis enfin de l'eau distillée avant d'être séchée sous vide, à l'isopropanol.

B3 Révélation à la peroxydase sur billes de polyacrylamide :

B.3.1. Principe :

Le substrat de la peroxydase est ici du 3-amino 9-éthyl carbazole (AEC). Le produit de l'oxydation de ce chromogène est un composé coloré qui précipite sur les billes.

B.3.2. Solutions utilisées :

Les billes de résine ont été mises en solution dans du PBS, NaN₃ 0,1%, PMSF 1 mM.

La solution de révélation utilisée est composée de :

- 0,5 ml d'AEC (0,4% dans du diméthyl formamide)
- 9,5 ml de tampon AEC pH 5 : solution d'acétate de sodium, 50 mM dans H₂O, mise à pH à l'aide d'acide acétique.
- 3 µl d'H₂O₂.

La composition du PBS/Tw a déjà été explicitée précédemment.

B.3.3. Méthode :

1. Déposer 100 µl de billes par eppendorf.
2. Saturation :
 - déposer 200 µl/eppendorf de PBS/HC (50/50)
 - incuber 2 heures à température ambiante.
3. Les lavages se font directement dans les eppendorfs :
 - déposer 1 ml de PBS/TW dans chaque eppendorf
 - centrifuger quelques secondes
 - retirer le surnageant (le culot est constitué des billes)

Cette opération est effectuée à 5 reprises.

4. Ajout des sérums :

- déposer 100 μ l/eppendorf de chacun des sérums
- incuber 1 heure à température ambiante.

5. Laver au PBS/Tw.

6. Ajout de la protéine-G peroxydase :

- déposer 400 μ l/eppendorf de protéine-G peroxydase, diluée 1000 fois dans du PBS/Tw
- incuber 1 heure à température ambiante

7. Laver au PBS/Tw.

8. Révélation à l'AEC :

- déposer 500 μ l/eppendorf de solution révélatrice
- laisser réagir.

B4. Prélèvement d'une bille par micromanipulation :

Cette seconde étape a été rendue possible grâce au micromanipulateur (Leitz, Allemagne) généralement utilisé au laboratoire pour les microinjections cellulaires (Henin V., 1982; Michiels C., 1989)(fig.8).

Les billes sont étalées dans une boîte de Petri, sous microscope optique (grossissement 10 fois). A l'aide d'une micropipette d'un diamètre de 1 μ m (Clarck Electromedical Instruments, Grande-Bretagne) montée sur un bras mécanique, il est possible d'isoler une bille particulière de l'ensemble de la boîte, en exerçant sur celle-ci une aspiration à l'aide d'une seringue adaptée à la micropipette. Grâce à cette légère aspiration, la bille reste fixée sur la micropipette tout au long de la manipulation. On peut donc la prélever et la déposer sur un autre support.

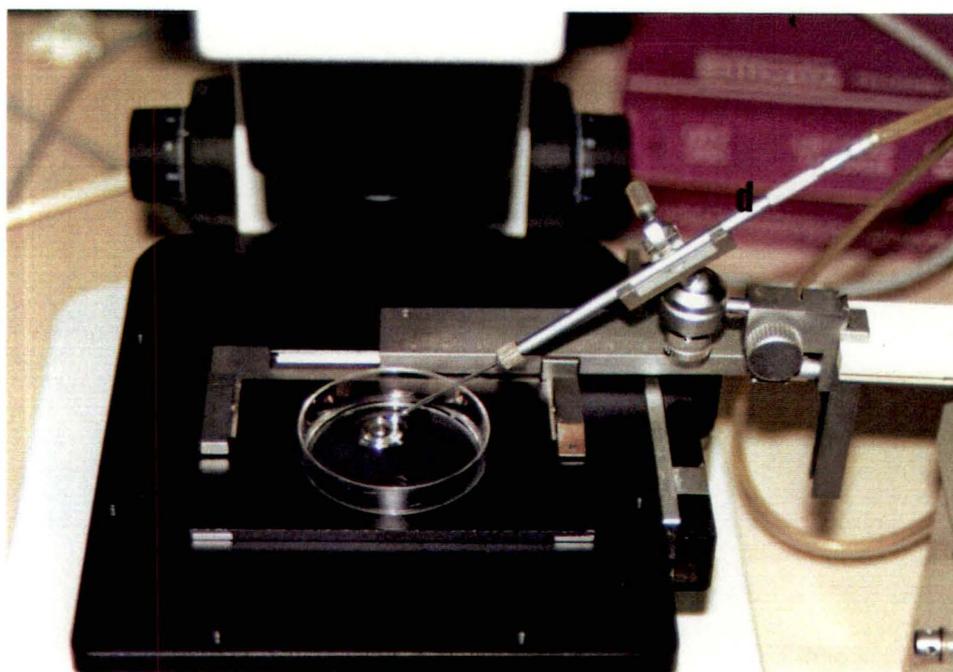
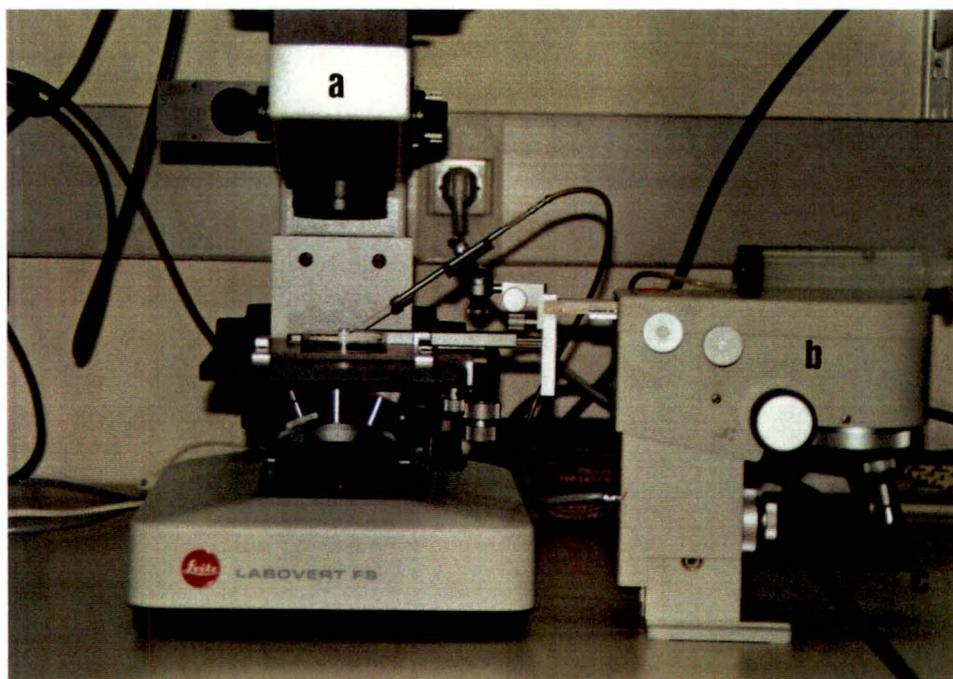


Fig.8. : Système de micromanipulation :

a : microscope Labovert FS Leitz

b : micromanipulateur Leitz

c : démultiplicateur de mouvements

d : bras mécanique relié au système d'aspiration.

B5. Lavage des billes :

B.5.1.Principe :

Cette étape permet d'éliminer toutes traces de protéines étrangères au peptide en vue de son microséquençage final . Quatre protocoles différents ont été ainsi testés :

B.5.2. Protocole à l'urée :

B.5.2.1. Solution utilisée :

La solution de lavage est constituée d'une solution de Tris-HCl 100 mM, urée 8 M, pH 7,5.

B.5.2.2. Méthode :

1. Déposer 1 ml de la solution de lavage dans l'eppendorf contenant les billes à laver.
2. Agiter régulièrement l'eppendorf, durant 10 minutes, de manière à bien imprégner les billes avec la solution.
3. Centrifuger quelques secondes.
4. Enlever le surnageant.
5. L'ensemble des opérations;1,2,3 et 4 est répétée 5 fois.
6. De même que ci-dessus, effectuer 2 lavages à l'eau distillée pour éliminer l'urée.

B.5.3.. Protocole à la guanidine-HCl :

B.5.3.1. Solution utilisée :

Le lavage est ici effectué avec une solution de Tris-HCl 100 mM, guanidine-HCl 8M, pH 7,5.

B.5.3.2. Méthode :

Le lavage se réalise de la même façon que pour le protocole urée.

B.5.4. Protocole de désorption par changement du pH :

B.5.4.1. Solution utilisée :

Les billes sont incubées successivement en présence de 3 solutions :

- une solution acide : Tris-glycine 0,1 M, pH 2,5.
- une solution basique : Tris 100 mM, pH 11
- une solution de neutralisation : Tris- HCl 1M, pH 8.

B.5.4.2. Méthode :

Suivant le même procédé que pour les lavages précédents, se succèdent ici 2 lavages en solution basique, 2 lavages en solution acide, 2 lavages en solution de neutralisation et 2 lavages à l'eau distillée.

B.5.5. Protocole Pepscan :

B.5.5.1. Solution utilisée :

La solution de recyclage, pH 7,2 est constituée de :

- NaH₂PO₄ 2H₂O (2,85 M)
- SDS 1%

Juste avant utilisation, on ajoute 10 µl de 2-Mercaptoéthanol pour 10 ml de solution.

B.5.5.2. Méthode :

1. Déposer 1 ml du tampon de recyclage (préalablement préchauffé à 40°C) dans l'eppendorf
2. Plonger ce dernier dans un bain de sonication (Bransson 2000, Vel, Leuven, Belgique) durant 45 min.

3. Laver deux fois à l'eau distillée, selon le même procédé que précédemment.
4. Déposer 1 ml de méthanol (à 25 °C) et laisser incubé 2 minutes.
5. Eliminer le méthanol et laver une dernière fois les billes à l'eau distillée.

B.6. Microséquençage du peptide sur la bille :

Les différents séquençages présentés dans ce travail ont été effectués par le Prof. Van Beeumen, Laboratoire de l'Université de Gand, sur un séquenceur de modèle 477 A (Applied Biosystem, USA).

Le procédé chimique utilisé par le séquenceur dérive de la technique mise au point par Pehr Edman dans les années ' 50 (Findlay J.B.C. *et al*, 1989). On la nomme "réaction de dégradation d'Edman".

Le principe est le suivant (fig.9) :

1. L'échantillon à analyser est maintenu durant toute la manipulation sur un filtre de papier de verre poreux de 12 mm de diamètre, placé dans une chambre de réaction chauffée et saturée à l'argon. Le filtre a été préalablement traité au polybrène.

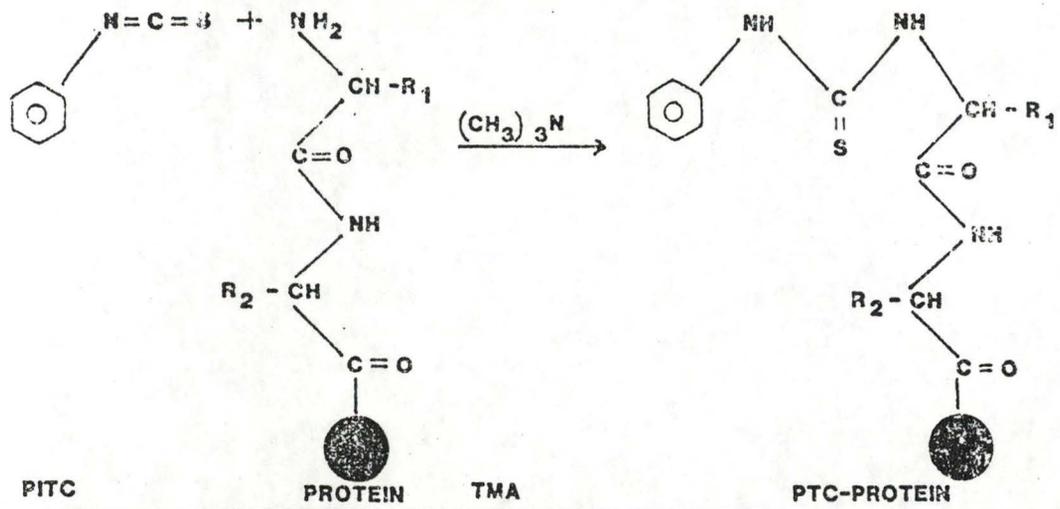
2. La première étape est une réaction de couplage, se déroulant dans des conditions alcalines au triméthylamine (TMA) et sous azote, au cours de laquelle le phénylthiocyanate (PITC) réagit avec la fonction amine de l'a.a. N-terminal du peptide de manière à former le N-phénylthiocarbamoyl (PTC), dérivé du peptide.

3. Un lavage permet d'éliminer l'excès de PITC et de tampon.

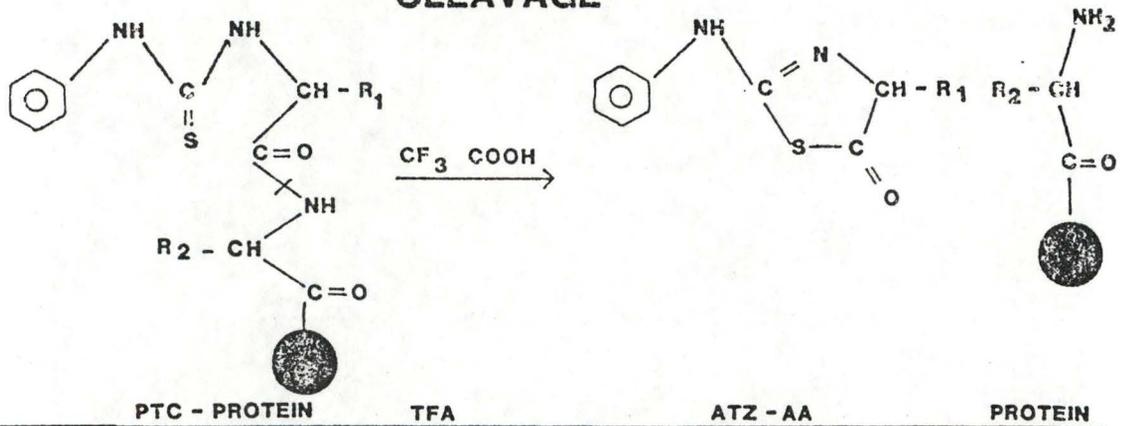
4. Une réaction de clivage en conditions acides (TFA anhydre), suite à la cyclisation du dérivé-PTC, provoque la libération d'un anilinothiazolinone (AZT), liée au premier résidu clivé.

5. Le dérivé AZT-AA du peptide est ensuite extrait au 1-chlorobutane (solvant hydrophobe).

COUPLING



CLEAVAGE



CONVERSION

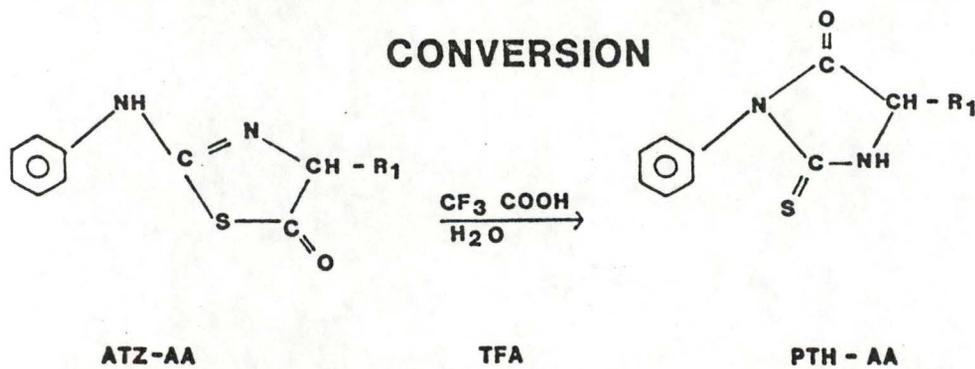


Fig.9. : Différentes étapes de la réaction de dégradation d'Edman.

6. La conversion de l'AZT-AA, peu stable en un composé plus stable, la phénylthiohydantoïne (PTH) se fait par un traitement à l'acide dilué (TFA 25%).

7. L'identification du résidu s'effectue par HPLC phase inverse C-18 avec détection à 290 nm.

On peut alors reprendre le même procédé pour l'acide aminé suivant. Actuellement, grâce aux méthodes de détection très sensibles dont on peut disposer, les dérivés-PTH peuvent être déterminés directement à partir d'une quantité de matériel de l'ordre de 1 à 10 picomoles et cela en 20 à 30 minutes.

B.7. Microscopie optique :

Les billes sont placées dans une nacelle de papier aluminium remplie de Tissue-Tek (OCT compound, Miles Laboratoires, Elkart, USA), milieu d'enrobage protecteur permettant la préparation de coupes à congélation. La nacelle est alors immédiatement déposée dans du méthanol refroidi au préalable par de la carboglace. Les blocs ainsi obtenus sont démoulés puis des coupes de 5 et 10 μm d'épaisseur sont réalisées dans un cryostat (Micron HM 500-OM, Heidelberg, Allemagne). Celles-ci sont recueillies par adhésion sur des lames porte-objet en verre non traitées. Les coupes sont stockées à -80°C .

RESULTATS ET DISCUSSION

A. MISE AU POINT DES ETAPES D'UTILISATION D'UNE BANQUE D'EPITOPES :

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la banque aléatoire de peptides peut présenter diverses potentialités, notamment en immunologie. C'est dans ce cadre que le laboratoire de Biochimie Cellulaire, connaissant bien la synthèse peptidique et le laboratoire d'Immunologie, intéressé par la recherche de mimotopes des LPS de *Brucella*, se sont associés. Comme expliqué dans l'introduction et après comparaison des différents supports de synthèse peptidique possibles, nous avons opté pour une résine hydrophile, qui a pu nous être procurée par le Prof. Fournier.

Le protocole de synthèse sur billes de polyacrylamide étant d'un type nouveau et assez coûteux en travail et en matériel, il était nécessaire avant d'entreprendre la création d'une banque de peptides conséquente, de tester la fiabilité du procédé de détection et de séquençage. Nous avons examiné successivement les 4 étapes suivantes :

- la mise en évidence des billes positives par une réaction avec un anticorps spécifique dirigé contre un peptide particulier et révélé à la protéine-G peroxydase.
- l'isolement de celles-ci de l'ensemble de la banque par micromanipulation
- le lavage des billes afin d'éliminer les anticorps du support, de même que les molécules révélatrices.
- le microséquençage du peptide sur la bille de polystyrène.

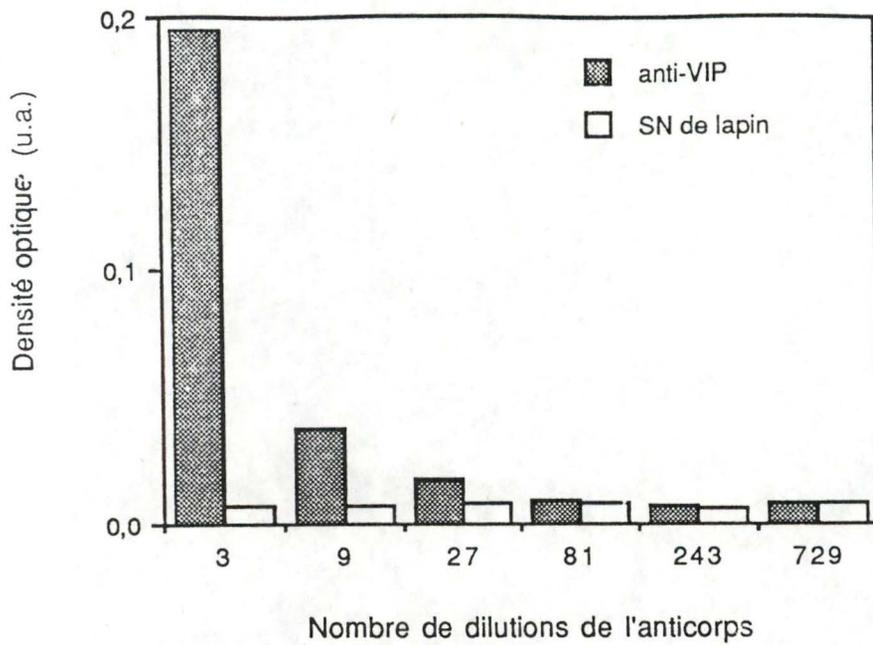


Fig.10a : Mesure de l'absorbance à 490 et 630 nm en fonction de dilutions successives de l'anticorps anti-VIP ou du sérum de lapin. Les sérums ont une concentration de départ de 0,575 mg/ml. Le substrat de la peroxydase utilisé est l'OPD.

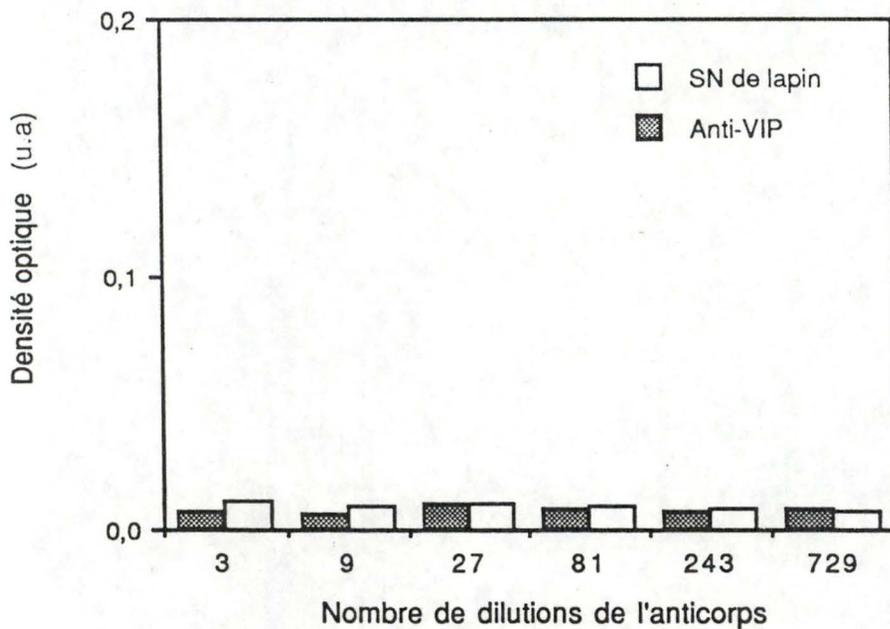


Fig.10b : Témoin négatif : mesure de l'adsorbance à 490 et 630 nm en fonction de dilutions successives de l'anticorps anti-VIP ou du sérum de lapin ajoutés dans les puits saturés avec l'HC. Les sérums ont une concentration de départ de 0,575 mg/ml. Le substrat de la peroxydase utilisé est l'OPD.

A.1. Détection des billes positives :

A.1.1. Etude préliminaire :

Préalablement à toute chose, nous avons vérifié que l'Ac anti-VIP qui nous avait été fourni, présentait bien une reconnaissance spécifique pour son Ag, le VIP. C'est pourquoi, nous avons commencé notre étude par un test ELISA.

Pour ce test, nous avons adsorbé du VIP au fond des puits de la plaque de polystyrène et deux sérums ont été testés :

- un sérum positif : l'anti-VIP
- un sérum négatif : un sérum normal (SN) de lapin.

La quantification de la fixation des deux sérums sur le peptide, a été obtenue par mesure de l'absorbance lors d'une révélation à la peroxydase. Comme nous le montre le graphe ci-joint (fig.10a), dans les conditions de saturation, de température et de temps d'incubation qui sont celles d'un test ELISA classique, le signal émis suite à l'addition du sérum positif est bien plus important que celui obtenu avec le SN de lapin.

Un témoin a également été effectué pour lequel les puits ont été uniquement saturés avec l'hydrolysate de caséine. Nous constatons que dans ces conditions, le signal mesuré reste très faible (fig.10b).

On peut donc conclure, suite à cette expérience que :

1. l'anticorps anti-VIP reconnaît spécifiquement son antigène. Alors que le sérum négatif, lui, ne réagit pas avec le VIP.
2. l'anti-VIP ne présente pas d'affinité particulière pour la protéine de saturation.

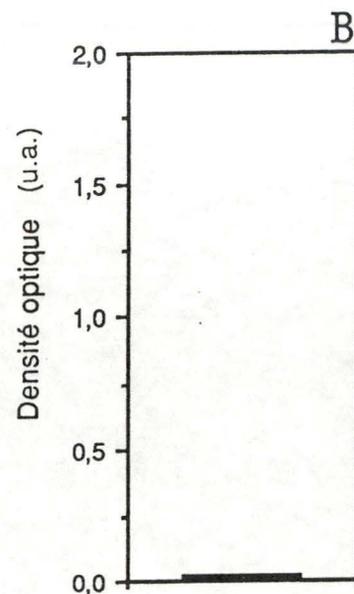
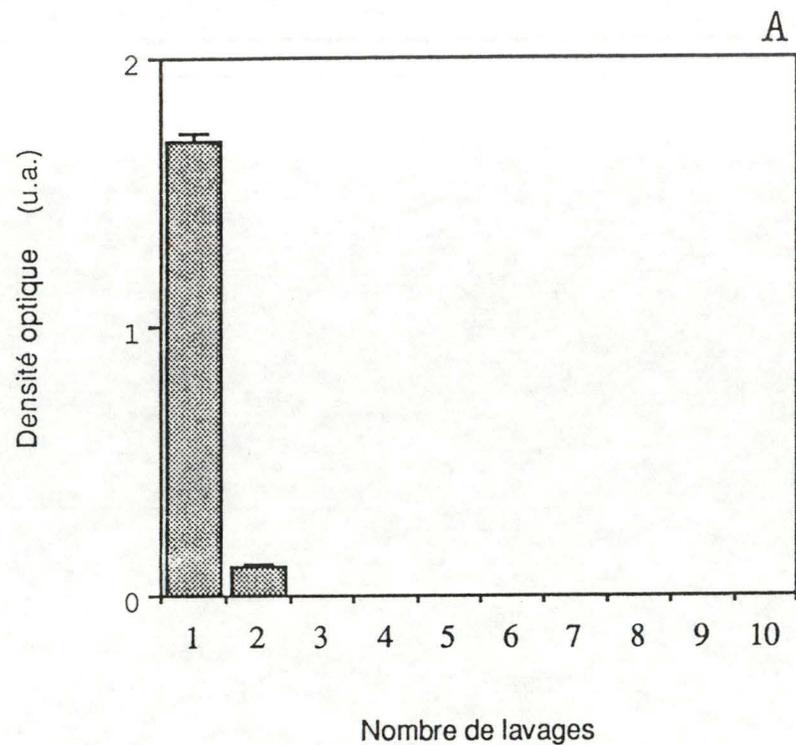


Fig.11 : A = Mesure de l'activité de la peroxydase présente dans les surnageants après lavages successifs des billes de polyacrylamide vierges incubées en présence de protéine-G peroxydase. La D.O. est donc indicatrice de la concentration en protéine-G peroxydase éliminée après chaque lavage.
 B = Mesure de la D.O. relevée sur les billes vierges après 10 lavages.

A.1.2. Détermination du nombre de lavages :

Avant de tenter la détection du VIP sur billes de polyacrylamide, nous avons voulu déterminer le nombre de lavages à effectuer pour éliminer l'excès d'Ag et de protéine-G peroxydase fixé de manière non spécifique à la surface des billes-VIP. En effet, n'ayant jamais préalablement travaillé avec ce type de support, nous ne pouvions savoir s'il présentait ou non une affinité quelconque pour la protéine-G peroxydase, voir même pour l'un des deux sérums dont nous disposions.

Nous avons incubé durant une heure, 400 μ l de protéine-G peroxydase (diluée 1000 fois) en présence de billes de polyacrylamide vierges. Après l'incubation, les billes ont été soumises à 10 lavages suivant le procédé précédemment décrit dans "matériels et méthodes".

Les surnageants extraits après chacun des lavages ont été recueillis, déposés dans des puits de plaque ELISA et l'absorbance émise, suite à la mesure de l'activité peroxydase en présence d'OPD à été mesurée (fig.11A). Cette D.O. est donc indicatrice de la quantité de protéine-G peroxydase qui a pu être éliminée lors de chaque lavage.

On peut ainsi constater qu'après 3 lavages, la quantité de protéine-G peroxydase enlevée devient très faible. A titre de comparaison, le second graphe (fig.11B) nous montre la D.O. mesurée sur les billes après les 10 lavages, indiquant de ce fait la quantité de protéine-G peroxydase restante.

On peut donc noter que la grande majorité de la protéine-G peroxydase est éliminée au bout de trois lavages. Afin d'éviter une reconnaissance non spécifique vis-à-vis du support lors de la détection des billes positives, nous réaliserons une saturation préalable du support avant sa reconnaissance par l'anticorps. Pour ces raisons, il nous est apparu qu'un nombre de cinq lavages devrait être suffisant pour éliminer l'excès de protéine-G peroxydase du support.

A.1.3. Essai de détection des Ac sur les billes :

La question posée était de savoir si le support lui-même ne pourrait pas interférer avec la reconnaissance Ac-Ag. Nous avons donc tenté d'appliquer un protocole similaire à celui du test ELISA, réalisé précédemment sur les billes-VIP. Les différentes étapes du principe ont été effectuées, en changeant néanmoins la méthode de révélation. Nous avons, en effet, décidé d'utiliser ici un autre substrat de la peroxydase : l'AEC. Celui-ci, après réaction enzymatique, produit un chromophore qui précipite, contrairement au produit d'une révélation à l'OPD, soluble après réaction.

Nous espérons ainsi pouvoir distinguer les billes positives (qui devraient apparaître rouges) des billes négatives (qui devraient rester blanches).

L'expérience a été conçue comme suit :

- un test positif : des billes-VIP + le sérum positif (anti-VIP)
- un 1^e test négatif : des billes-VIP + le sérum négatif (SN de lapin)
- un 2^e test négatif : des billes vierges + le sérum positif
- un 3^e test négatif : des billes vierges + le sérum négatif

Sur les photos ci-jointes (fig. 12) , on peut constater que les billes-VIP en présence de sérum positif apparaissent rouges tandis que les 3 contrôles présentent des billes blanches.

Nous pouvons donc conclure que :

1. Grâce au protocole suivi, il est possible de détecter les billes portant un déterminant antigénique particulier, parmi un ensemble de billes négatives.

2. Le passage au crible des billes peut se faire sous microscope optique, voir même sous binoculaire étant donné la taille assez importante de nos billes (voir point B. des résultats).

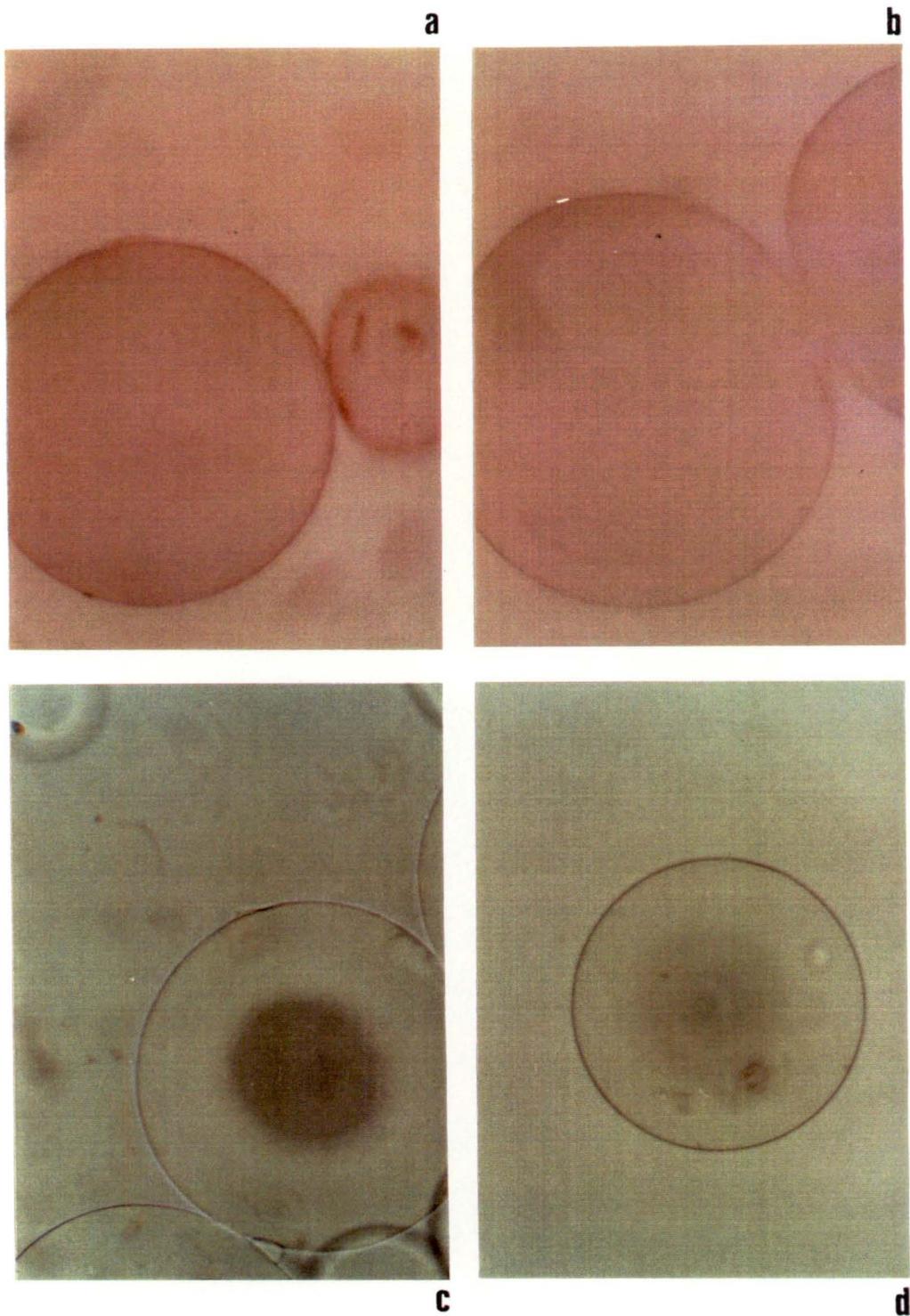


Fig.12. : Détection du déterminant antigénique VIP sur billes de polyacrylamide :

- a : billes-VIP + sérum positif
- b : billes-VIP + sérum négatif
- c : billes vierges + sérum positif
- d : billes vierges + sérum négatif.

3. Les cinq lavages effectués pour éliminer l'excès d'anti-VIP suffisent.

A.1.4. Quantification de la réaction Ac/peptide :

L'un des problèmes rencontrés avec l'utilisation des billes est la quantification des résultats obtenus suite à la réaction entre l'Ac et le peptide. Ceci est dû à l'hétérogénéité de la taille des billes (voir plus loin) et à leur tendance à coller à toute paroi. Il est, par conséquent, très difficile de pouvoir déposer un même nombre de billes dans chacun des eppendorfs.

Nous avons donc procédé comme suit : les billes lyophilysées ont été pesées et placées dans des eppendorfs. Le protocole de reconnaissance qui a été précédemment appliqué sur les billes a ensuite été effectué. Les résultats se trouvent présentés à la fig. 13.

On peut constater que le VIP incubé avec le sérum positif présente un signal d'une D.O. moyenne de 0,087 par mg de bille, alors que les trois contrôles négatifs n'émettent pas de densité optique plus élevée que 0,008 par mg de billes.

Dans le cadre qui est le nôtre, cette méthode de quantification a été réalisée à titre indicatif mais elle peut s'avérer intéressante lors d'une étude ultérieure. Par exemple, il pourrait être utile de tenter d'améliorer cette détection en étudiant différents types de lavages, de temps d'incubation, etc,... La quantification constituerait dans ce but un moyen utile de comparaison.

A.2. Isolement d'une bille positive de la banque :

La difficulté réside ici dans la petite taille des billes à récupérer mais aussi dans leur constitution, le polyacrylamide, qui présente un aspect gélatineux en solution.

Après avoir pu mettre en évidence les billes positives à l'aide d'une révélation à la peroxydase, il s'agit donc de parvenir à isoler ces quelques billes particulières d'un ensemble, en vue de les laver et plus tard de les microséquencer.

	Poids (mg)	DO	D.O./mg	Moyenne
Billes VIP + sérum positif	1,80	0,204	0,112	0,087 ±0,022
	3,15	0,228	0,072	
	2,13	0,196	0,092	
Billes VIP + sérum négatif	2,00	0,020	0,010	0,008 ±0,002
	2,88	0,020	0,007	
	2,11	0,015	0,007	
Billes vierges + sérum positif	2,64	0,015	0,005	0,006 ±0,001
	2,24	0,019	0,008	
	2,31	0,016	0,006	
Billes vierges + sérum négatif	2,95	0,016	0,005	0,0045 ±0,001
	2,61	0,012	0,004	
	2,56	0,014	0,005	

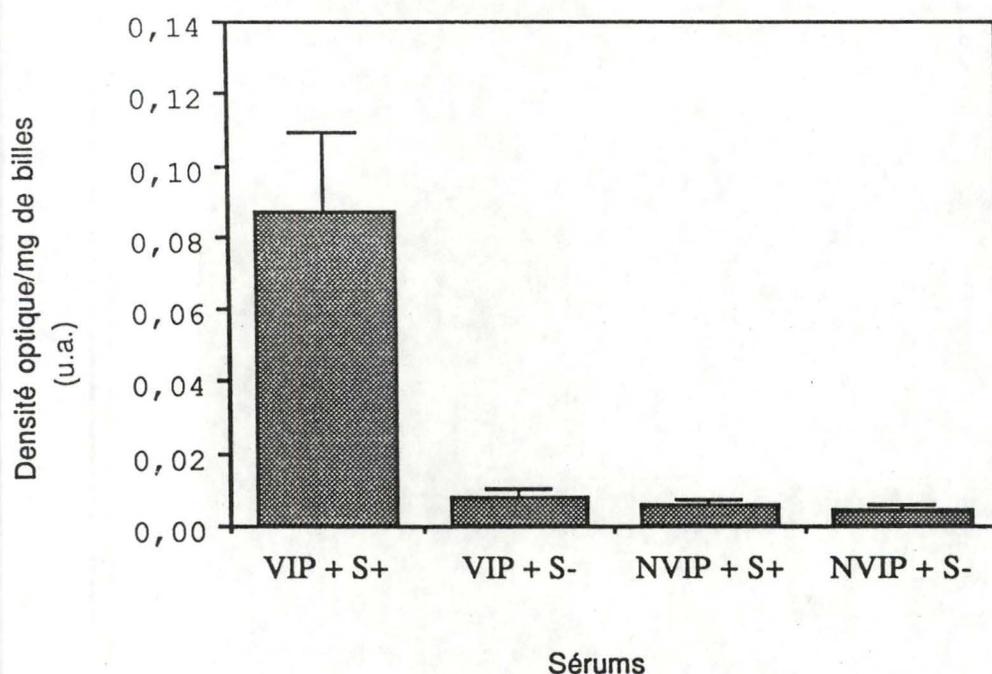


Fig.13 : Mesure de la D.O. à 490 et 630 nm. Les sérums ont une concentration de 0,575 mg/ml. L'expérience a été réalisée 3 fois.

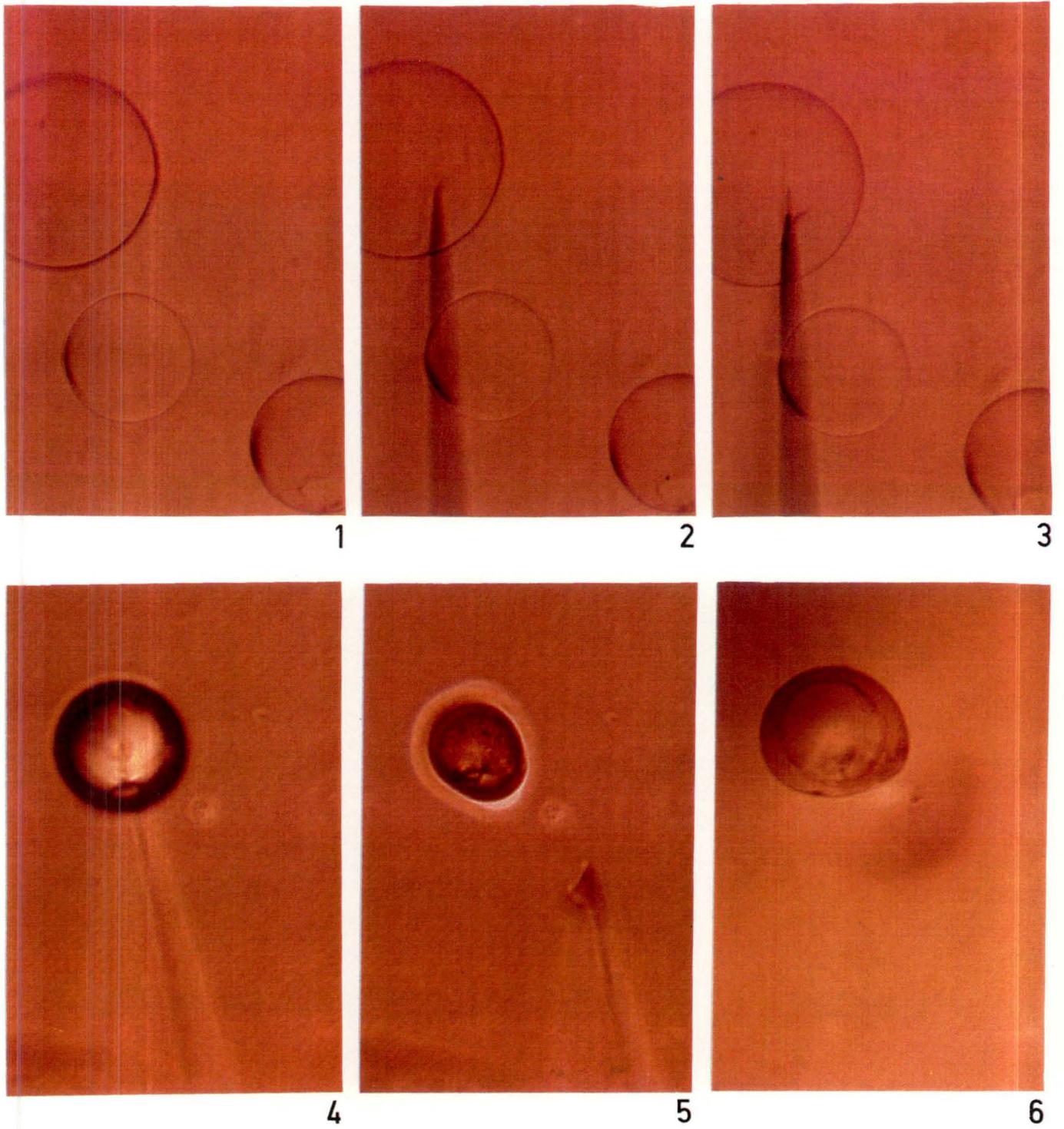


Fig.14. : Etapes successives de l'isolement d'une bille particulière par micromanipulation.

Nous avons pour cela décidé de nous aider de l'appareillage de micromanipulation utilisé au laboratoire pour les microinjections cellulaires. Nous avons donc isolé les billes individuellement à l'aide d'une micropipette à la pointe éfilée (fig.14).

De par la nature extrêmement lâche du polyacrylamide, nous avons été obligé d'apporter une innovation sur l'appareil : il s'agit de la mise en place d'un système d'aspiration permettant de maintenir la bille fixée sur la pointe de la micropipette tout au long de la manipulation. Les billes positives peuvent être ainsi prélevées et déposées dans des eppendorfs vides, en vue de réaliser leur lavage dans une étape ultérieure.

A.3. Lavages des billes :

Cette étape va permettre d'éliminer des billes sélectionnées l'ensemble des protéines intervenant lors de la révélation à la peroxydase. Il faut, en effet, éviter au maximum la présence de molécules contaminantes lors du microséquençage qui suivra. Il s'agit d'une étape importante étant donné la faible quantité de peptide présente sur chaque bille. Le moindre contaminant pourrait interférer avec la méthode de séquençage du peptide et fausser l'interprétation des résultats.

Pour ce faire, nous avons testé quatre types de protocoles différents:

-protocole à l'urée et protocole à la guanidine-HCl : il s'agit là de deux substances connues pour leurs propriétés dénaturantes.

-protocole de désorption en fonction du pH : il s'agit d'une méthode généralement utilisée pour désorber les Ac des colonnes de chromatographie. Il existe deux types de protocoles : l'un utilisant un milieu acide et l'autre un milieu basique. Nous avons choisi d'alterner les deux solutions de manière à placer les molécules dans les conditions les plus dénaturantes possibles. Il est, en effet, connu dans la littérature (Kondo *et al*, 1991) que lorsque l'on se

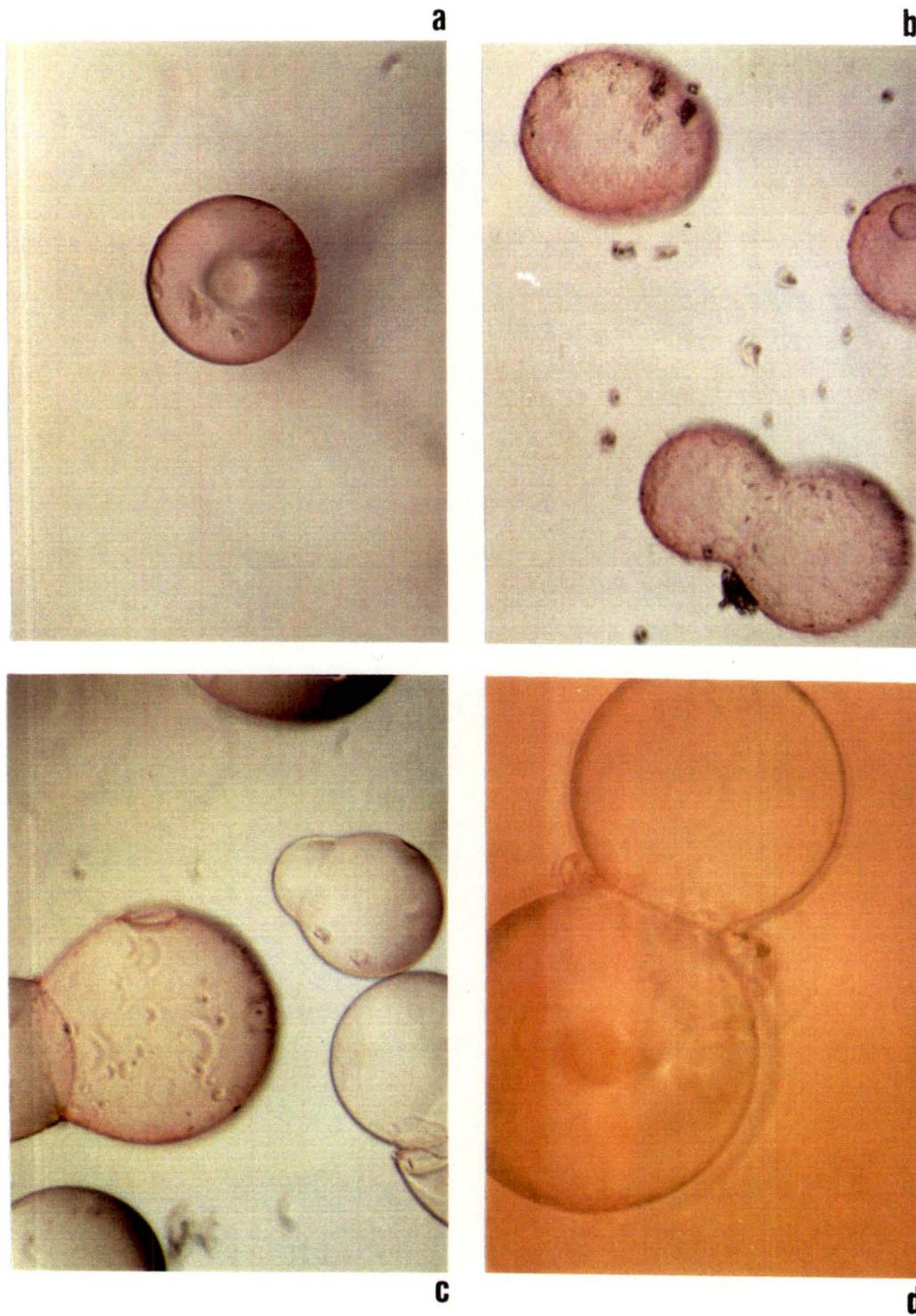


Fig.15. : Billes de polyacrylamide lavées par quatre protocoles différents :
a : protocole à l'urée
b : protocole à la guanidine-HCl
c : protocole de désorption en fonction du pH
d : protocole de lavage Pepscan.

place dans des pH extrêmes, la capacité de liaison entre un Ac et son Ag diminue. Ceci s'explique par l'apparition de charges positives (en milieu acide) ou négatives (en milieu basique) sur les protéines. Suite à la répulsion des charges de même signe au sein de la molécule, la structure tertiaire de la protéine se désorganise et l'Ac perd ainsi son affinité pour l'Ag qui lui correspond.

-protocole de lavage Pepscan : il s'agit d'un procédé de lavage utilisé pour le recyclage des pin's (petites tiges sur lesquelles s'effectuent la synthèse peptidique) lors de la méthode de synthèse Pepscan (Geysen *et al*, 1997). Les protéines subissent à la fois un traitement mécanique (sonication) et chimique (solution de recyclage, méthanol).

Après avoir testé les quatre types de lavages, nous avons procédé à l'observation de nos billes sous microscope optique. Comme on peut le constater sur les photos ci-jointes (fig.15), les trois premiers types de lavages ne conviennent pas : en effet, les billes présentent toujours une coloration rougeâtre, signe de la présence de molécules intervenant lors de la révélation. Dans le cas du "protocole guanidine-HCl", on peut même observer une modification morphologique légère de la résine qui semble prendre un aspect granuleux.

Par contre, lorsque les billes sont soumises au protocole de lavage Pepscan, elles apparaissent à nouveau blanches. Cette observation ne suffit cependant pas à prouver l'efficacité de notre technique de lavage. En effet, si la présence de couleur sur la bille est indicatrice de la présence du complexe de reconnaissance, la disparition de la couleur rouge après les lavages ne prouve pas pour autant qu'il ne subsiste plus *aucun* contaminant à la surface de la bille. Le chromophore peut, en effet avoir été solubilisé dans le méthanol sans que ce ne soit pour autant le cas de l'anti-VIP ou de la protéine de saturation. C'est pourquoi, nous avons décidé de vérifier l'efficacité du lavage par microséquençage du peptide.

A.4. Microséquençage du peptide :

A.4.1. Séquençage proprement dit :

Ne possédant pas le matériel adéquat aux Facultés, nous nous avons collaboré avec le laboratoire du Prof. Van Beeumen de l'Université de Gand afin d'essayer de réaliser l'étape du microséquençage.

Plusieurs éléments pouvaient *a priori* poser des problèmes lors de la réalisation pratique du séquençage du VIP :

1. Le microséquençage s'effectue habituellement sur un échantillon de peptide soluble. Or dans ce cas-ci, le peptide est greffé sur la bille de polyacrylamide qui lui sert de support. Est-ce compatible avec le séquençage correct du peptide?

2. Les billes ayant une taille de l'ordre de 900 μm (voir plus loin), elles pourraient éventuellement venir boucher les tubes de plastique du microséquenceur. De plus, de par sa nature, le polyacrylamide mis en présence des différents solvants (TFA, chlorobutane, acétate d'éthyl,...) peut voir sa structure se détériorer et entraîner des dégats au niveau de la colonne de chromatographie.

3. Enfin, on peut aussi se demander si la quantité de peptide présente sur une seule bille est suffisante pour permettre le microséquençage efficace du peptide (sensibilité de la méthode).

Tout d'abord, l'expérience a été tentée sur une centaine de billes en même temps. Ceci nous permettait, dans un premier temps, de ne pas être limité par une quantité de peptide éventuellement trop faible. Les résultats à la figure 16 représentent les quantités (en picomoles) d'acides aminés obtenues pour chacun des cycles effectués, un cycle représentant une "réaction de dégradation d'Edman". On peut constater que les valeurs pour chaque acide aminé commencent à se stabiliser après deux cycles.

	cycle 1	cycle 2	cycle 3	cycle 4	cycle 5	cycle 6	cycle 7
Asp	158,11	628,7	2335	-2376	-484	-128,9	110,58
Asn	142,79	230,94	198,24	-382,1	-93,24	-23,34	-9,84
Ser	212,3	511,4	-483,4	-197,8	-36,72	-0,96	-4,14
Gln	42,87	64,07	-63,15	-29,03	-6,3	7,23	-4,54
Thr	462,47	-139,8	-64,44	-6,76	84,34	-16,31	961
Gly	26,23	20,34	-12,74	-14,36	-6,62	2,36	2,23
Glu	16,49	45,42	-21,62	-23,59	-8,98	3,38	-3,17
Ala	464,49	-227	59,49	1097	-1139	-192,7	-23,81
His	875,8	-656,8	-148	-55,87	-10,53	-4,7	0
Tyr	344,82	-11,31	-54,29	85,28	-160,6	-40,12	7,13
Arg	0	0,68	-0,68	0	0	0	5,92
Pro	58,52	-49,89	-0,29	-3,18	-1,82	0,08	0,28
Met	76,6	-16,7	46,85	-83,5	-9,34	-0,94	8,26
Val	234,43	-49,89	-111,6	63,34	1130	-1069	-178,4
Trp	25,01	-3,4	-3,23	-7,97	-0,91	0,73	0,68
Phe	82,01	-3,92	-11,89	-42,83	115,43	1053	-648,6
Ile	359,84	-157,6	-134,8	-8,21	-30,96	-1,32	-7,13
Lys	128,96	147,29	-87,14	-118,1	-26,7	14,37	3,75
Leu	429,98	8,46	-142,6	-184,3	-32,05	7,77	122,32

Fig.16 : Séquençage des 7 premiers acides aminés du VIP. Les résultats exposés ci-joint représentent les quantités en picomoles d'acides aminés retrouvées pour chaque cycle complet. Un cycle représentant une "réaction de dégradation d'Edman".

	cycle 1	cycle 2	cycle 3	cycle 4	cycle 5	cycle 6	cycle 7
Asp	21,02	7,25	14,53	-12,56	-4,04	-0,4	-4,56
Asn	3,38	1,86	0,06	-0,91	-0,06	1,25	0,99
Ser	21,29	42,87	-31,7	-20,35	-4,94	1,39	-1,61
Gln	11,39	-7,1	-1,4	-0,19	-0,18	0,26	-0,59
Thr	15,62	6,72	1,44	-6,57	0,5	-1,74	9,2
Gly	16,28	24,09	2,6	-7,45	0,91	5,14	-2,54
Glu	5,54	7,59	-0,11	-3,03	-1,06	0,69	-1,52
Ala	7,72	19,43	-12,11	4,34	-7,7	1,98	-3,56
His	0	0	3,57	-1,39	-0,92	-0,99	0,03
Tyr	3,17	9,85	-4,78	-2,42	-0,88	0,94	0,27
Arg	1,35	-1,35	6,94	-1,03	-1,82	-4,06	2,73
Pro	4,44	4,78	-1,52	-1,59	-1,45	-0,95	-0,02
Met	1,5	0,89	-0,75	-0,18	0,04	-0,01	-0,12
Val	3,2	6,88	-2,59	0,68	9,04	-5,039	-1,01
Trp	54,28	-26,4	-9,67	-1,65	-1,43	1,15	0,15
Phe	0,49	4,06	-0,37	-0,1	0,19	9,24	-7,06
Ile	0,55	4,23	0,09	0,17	0,07	0,38	-0,55
Lys	0,67	3,55	-0,98	-1,11	0,51	-0,76	0,2
Leu	3,31	4,12	1,52	-0,71	-0,1	0,07	-0,01

Fig.17 : Séquençage des 7 premiers résidus du VIP greffé sur une seule bille.

On observe :

1. que la séquence retrouvée (H-S-D-A-V-F-T) correspond bien aux 7 premiers résidus du VIP. Il suffit, en effet, pour cela de prendre la valeur la plus élevée de chacune des colonnes.

2. que dès le 4^e cycle, l'acide aminé sortant majoritairement, se stabilise à une valeur de 1000 picomoles.

3. que l'histidine et la sérine, quant à elles, présentent une valeur plus faible que les a.a. suivants. Ceci est dû au fait qu'après la conversion de l'AZT-sérine et -histidine, on obtient un produit labile se dégradant plus rapidement. Ce phénomène se produit également avec la thréonine. C'est pourquoi, même quand ces résidus sont présents en plus faible quantité, ils prévalent sur les autres.

Suite à cette première expérience, il nous est maintenant possible de répondre à deux de nos questions :

1. Le microséquençage du peptide resté greffé sur son support de polyacrylamide est entièrement réalisable suivant le procédé habituel de microséquençage.

2. La nature de la résine ne semble pas provoquer de détériorations au niveau des tuyaux de plastique ou encore au niveau de la colonne HPLC phase inverse servant à la séparation des acides aminés.

Afin de pouvoir répondre à notre dernière interrogation, nous avons placé sur le filtre de papier de verre poreux une seule bille prélevée à l'aide du micromanipulateur. Les résultats présentés ci-joint (fig. 17) nous indiquent que, excepté pour le premier résidu, le début de la séquence du VIP est effectivement retrouvé.

Le microséquençage d'un peptide sur une seule bille, étape finale de l'utilisation d'une banque d'épitopes est donc techniquement réalisable et suffisamment sensible pour une détermination correcte de la séquence peptidique. On peut néanmoins constater que l'identification du premier

résidu pose un problème puisque l'histidine n'est pas le résidu qui obtient le plus haut score lors du premier cycle de l'analyse. Ce phénomène est, semble-t-il, bien connu dans la mesure où il n'est pas rare lorsqu'on travaille sur des quantités de matériel relativement faibles, que des contaminants adsorbés sur le filtre ou sur l'échantillon lui-même puissent interférer lors des premières étapes du microséquençage.

A.4.2. Séquençage des billes lavées :

Comme nous l'avons déjà signalé au point précédent, cette expérience va nous permettre de déterminer l'efficacité de notre protocole de lavage. Les résultats obtenus par le séquençage (fig. 18) font apparaître la séquence X-S-D-A-V qui, excepté pour le premier a.a., correspond bien, en effet, aux premiers résidus du VIP.

Il apparaît donc que la méthode de lavage nommée protocole de lavage Pepscan élimine le complexe protéinique de façon suffisante ce qui évite toute interférence lors du microséquençage. En effet, la séquence correcte du peptide est retrouvée, sans que le moindre contaminant résiduel n'aie pu interférer.

B. CARACTERISATION DES BILLES DE POLYACRYLAMIDE :

Après avoir pu tester et mettre au point les différentes étapes d'utilisation d'une banque d'épitopes, il nous a semblé intéressant d'essayer de caractériser brièvement ce nouveau support de synthèse peptidique que constitue les billes de polyacrylamide.

	cycle 1	cycle 2	cycle 3	cycle 4	cycle 5
Asp	47,59	-5,4	2,05	-16,99	-9,03
Asn	20,64	-4,55	-6,18	-0,94	-3,42
Ser	26,79	6,61	-24,3	-4,85	-3,51
Gln	10,36	-5,64	-2,53	0,14	-1,22
Thr	110,86	-53,26	-45,37	-5,25	-0,12
Gly	13,19	3,66	-2,27	0,71	1,42
Glu	4,98	-4,98	-2,89	0,6	-3,49
Ala	95,61	-69,01	-14,25	4,38	-7,72
His	18,35	-13,98	-4,37	0	0
Tyr	113,95	-69,28	-34,53	-2	0,38
Arg	0	0	0	0	0
Pro	6,56	-2,32	-0,99	1,05	-0,42
Met	50,05	-37,23	-8,17	-2,91	-0,76
Val	121,79	-89,32	-22,7	-0,21	6,63
Trp	19,82	-7,31	-4,53	-0,8	-1,27
Phe	64,04	-53,96	-5,02	-2,68	-0,17
Ile	33,46	-19,17	-9,04	-1,37	-1,49
Lys	73,98	-42,11	-13,52	-8,66	-5,6
Leu	93,04	-68,68	-9,84	-6,73	-3,39

Fig.18 : Séquençage des 5 premiers résidus du VIP sur billes ayant subi un lavage Pepscan, après réaction avec l'anti-VIP et la protéine-G peroxydase.

B.1. Estimation de la taille :

Celle-ci a été réalisée à partir de photos prises sous microscope optique (grossissement 10 fois). Le diamètre de 40 billes différentes a été mesuré. Les résultats rassemblés sur le graphe ci-joint (fig. 19) ont été calculés en tenant compte du grossissement total du microscope .

D'après le graphe, nous pouvons constater que :

-les billes présentent une hétérogénéité de tailles relativement importante puisque leur diamètre varie de 594 à 1625 μm .

-le diamètre moyen des billes est de $897 \pm 181,24 \mu\text{m}$.

Ce résultat n'est pas étonnant quand on sait qu'il est assez aisé de détecter une seule bille à l'oeil nu et qu'un grossissement 10 fois suffit pour une observation au microscope. Néanmoins, il représente une différence importante par rapport aux autres types de billes de résine plus généralement utilisés. En effet, Lam *et al* (1991) utilisent une résine dont les billes ont une taille de l'ordre de 100 à 200 mesh (75 à 150 μm). Quant à la résine de polystyrène divinylbenzène activée au MBHA habituellement utilisée au laboratoire, la taille de ces billes a été estimée de l'ordre de 60 à 125 μm .

B.2. Coupes microscopiques :

Nous avons voulu savoir si le complexe protéinique (Ac-protéine-G peroxydase), permettant la détection du déterminant antigénique, réagissait avec celui-ci uniquement en surface des billes de polyacrylamide ou bien s'il avait également accès aux peptides enfouis plus profondément à l'intérieur du support.

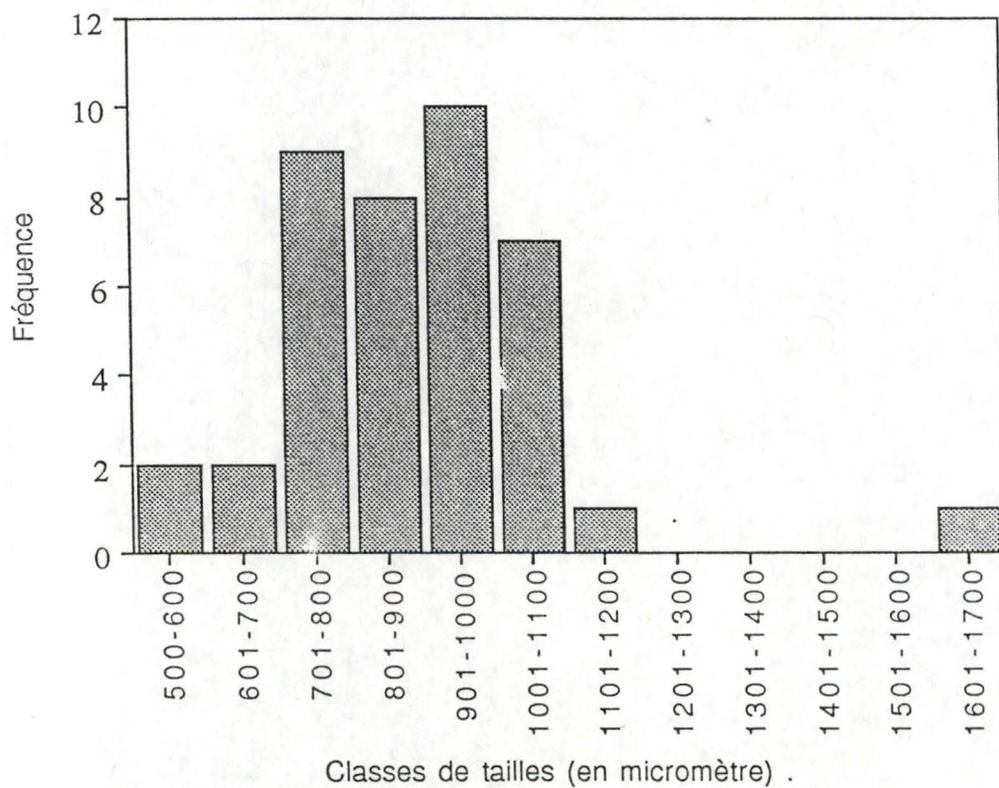


Fig.19 : Mesure sur photos du diamètre des billes de polyacrylamide (n=40). La moyenne obtenue est de $897,05 \mu\text{m} \pm 181,42 \mu\text{m}$.

Afin de pouvoir observer plus précisément ce qui se déroule à l'intérieur même des billes, nous avons réalisé une série de coupes à congélation de plusieurs échantillons de billes. Deux types de tests ont été effectués :

- un test positif : coupes de billes-VIP ayant réagi avec l'anti-VIP et révélées à la protéine-G peroxydase (coloration rouge).
- un test négatif : coupes de billes-VIP incubées en présence du SN de lapin (pas de coloration).

Les résultats obtenus (microscope optique, grossissement 10 fois) sont présentés sur les photos ci-jointes (fig.20) et permettent de constater que :

1. Le test positif présente des traces de colorations rougeâtres en surface du gel mais aussi à l'intérieur, de manière plus dispersée.
2. Le test négatif ne présente aucune coloration.

Sur base de ces observations, il apparaît clairement que la réaction de reconnaissance entre l'anticorps anti-VIP et son peptide se déroule non seulement à la surface de la bille mais également à l'intérieur du réseau de polyacrylamide. Ceci s'explique probablement par le caractère hydrophile du support, et par la taille relativement importante des mailles de gel, qui permet une pénétration facile du solvant aqueux à l'intérieur de la bille. Ce type de support, utilisé ici dans le cadre de nos expériences, cumule donc le double avantage d'être (contrairement aux types de support classique sur polystyrène) particulièrement bien compatible avec une reconnaissance antigénique en milieu aqueux, et d'offrir aux réactifs de révélation une surface accessible supérieure à celle de supports classiques.

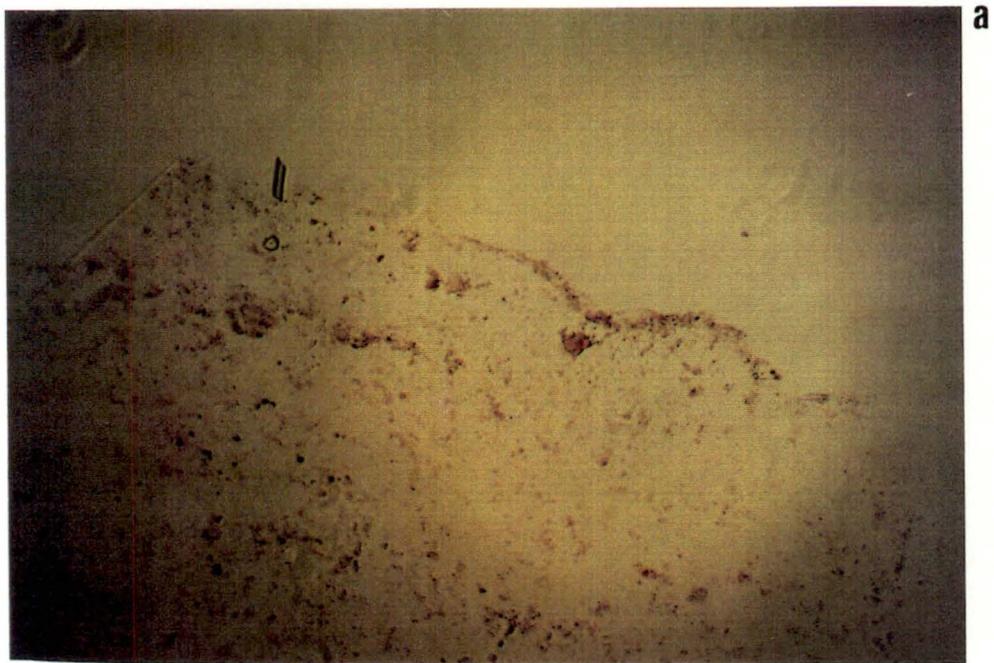


Fig. 20. : Coupes à congélation (5 μm) d'un échantillon de billes.
a : billes positives
b : billes négatives.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A. CONCLUSIONS :

Comme nous l'avons décrit dans la partie introductive de ce travail, notre mémoire s'est intéressé à mettre au point toutes les étapes indispensables à l'utilisation d'une *banque de peptides aléatoires* synthétisée par voie chimique. Cette technique nouvelle permet l'identification de séquence(s) peptidique(s) spécifiquement reconnue(s) par un ligand particulier, et s'est déjà montrée de grande utilité dans la recherche d'épitopes, dans la compréhension des interactions Ag-Ac, ou encore dans la mise au point de vaccins synthétiques.

Dans le cadre de notre mémoire, nous avons, dans un premier temps, mis au point un protocole permettant de distinguer des billes de polyacrylamide portant le déterminant antigénique VIP d'un ensemble de billes négatives. En effet, l'oxydation de l'AEC (substrat de la peroxydase) conduit à la formation d'un produit coloré qui précipite sur les billes positives et les fait ainsi apparaître rouges. Seule les billes portant la séquence reconnue par l'AC présentent cette couleur.

A l'aide de l'appareil de micromanipulation auquel nous avons adapté un système d'aspiration, il nous a ensuite été possible d'isoler ces billes positives. Et cela malgré leur petite taille et la structure assez lâche du gel de polyacrylamide.

Nous avons également testé différents types de protocoles de lavages afin de permettre l'élimination du complexe protéinique et des colorants

adsorbés après la reconnaissance spécifique avec le peptide. C'est finalement le protocole de lavage Pepscan qui, sur base d'observations microscopiques des billes, a fourni les meilleurs résultats. L'efficacité de la technique de lavage a de plus été vérifiée par microséquençage du peptide des billes lavées. La séquence correspondant aux 5 premiers a.a. du VIP a pu être ainsi identifiée sans qu'aucune molécules contaminantes n'interfèrent avec la méthode de séquençage.

Cette dernière étape, réalisée grâce à la collaboration du laboratoire du Prof. Van Beeumen a de plus permis de montrer que le support de polyacrylamide était compatible avec l'appareillage du microséquençage, que ce même support ne se détériore pas au cours des différentes étapes du séquençage et surtout que le microséquençage du peptide sur une bille unique est techniquement réalisable et reproductible.

B. PERSPECTIVES :

Avant de nous lancer dans la synthèse complète d'une banque de peptides aléatoires, nous devons préalablement nous assurer que cette banque puisse être techniquement utilisable. C'est pourquoi notre mémoire s'est attaché à mettre au point toutes les étapes de reconnaissance des billes, d'isolement hors de la banque, de lavage des billes et de microséquençage du peptide, nécessaires à l'identification de l'épitope spécifiquement reconnu par l'Ag.

Nous avons, pour ces mises au point, choisi de travailler avec le peptide vasoactif intestinal de porc (VIP) qui est un peptide relativement long (28 a.a.) par rapport à la longueur généralement admise pour un épitope (6 à 8 a.a.).

Il serait par conséquent intéressant, afin de poursuivre cette étude, de vérifier l'efficacité de notre protocole de reconnaissance sur un peptide plus

court. Pour ce faire, on pourrait, par exemple, synthétiser un peptide de séquence connue sur une résine de polyacrylamide et tester contre lui l'Ac monoclonal. Si cette dernière expérience s'avérait positive, on pourrait dès lors envisager favorablement un investissement dans une banque d'épitope complète. Une telle réalisation ouvrirait dès lors de nombreuses perspectives d'applications tant pratique que fondamentale pour la recherche dans des domaines aussi variés que l'immunologie, la biochimie et la chimie structurale.

BIBLIOGRAPHIE

CWIRLA, S.E., PETERS, E.A, BARRET, R.W., DOWER, W.J. (1990)

"Peptides on phages : a vast library of peptides for identifying ligands".
Proc. Natl. Acad. Sc. USA, **87**, 6378-6382.

DEVLIN, J.J., PANGANIBAN, L.C., DEVLIN, P.E. (1990)

"Random peptides libraries : a source of specific protein binding molecules".
Science, **249**, 404-406 .

FELICI, F., CASTAGNOLI, L, MUSACCHIO, A., JAPPELI, R., CESARENTI, G. (1991)

"Selection of antibodies ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector".
J. Mol. Biol., **222**, 301-310 .

FINDLAY, J.B.C., PAPPIN, D.J.C., KEEN, J.N. (1989)

"Automated solid-phase microsequencing" in "Protein sequencing : a practical approach".
IRL Press, Oxford University Press, Oxford, pp 69-84.

FOURNIER, A., SAUNDERS, J.K., ST-PIERRE, S. (1984)

"Synthesis, conformational studies and biological activities of VIP and related fragments ".
Peptides, **5**, 169-177.

FOURNIER *et al*, 1992 :

Biochemistry, *soumis pour publication.*

FODOR, S., READ, J.L., PIRRUNG, M.C., STYER, L., TSAILU, A., SOLAS, D. (1991)

"Light-directed, spacially addressable parallel chemical synthesis".

Science, **251**, 767-773.

FRY, D.C., MADISON, V.S., BOLIN, D.R., GREELEY, D.N., TOOME, V., WEGRZYNSKI, B.B. (1989)

"Solution structure of an analogue of VIP as determined by two-dimensional NMR and circular dichroism spectroscopies and constrained molecular dynamics".

Biochemistry, **28**, 2399-2409.

GETZOOF, E.D., GEYSEN, H.M., RODDA, S.J., ALEXANDER, H., TAINER, J.A., LERNER, R.A. (1987)

"mechanisms of antibody binding to a protein".

Science, **235**, 1191-1196.

GEYSEN, H.M., RODDA, S.J., MASON, T.J., TRIBBICK, G., SCHOOF, P.G. (1987)

"Strategies for epitope analysis using peptide synthesis".

J. Immunol. Methods, **102**, 259-274.

HENIN, V. (1982)

"Microinjection du cytochrome b5 dans les fibroblastes WI-38 et étude de sa distribution sur les membranes subcellulaires"

Mémoire de licence, Laboratoire de Biochimie Cellulaire, FUNDP Namur.

HOUGHTEN R.A. (1988)

"Methods for the rapid synthesis of large numbers of discrete peptides" *in*

"Macromolecular sequencing and synthesis. Selected methods and applications", Schlesinger D.H. Ed., Alan R. Liss Inc., New York, pp 185-194.

HOUGHTEN, R.A., PINILLA, C., BLONDELLE, S.E., APPEL, J.R., DOOLEY, C., CUERVO, J. (1991)

"Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery".

Nature, **354**, 84-86.

HURVELL, B., LINDBERG, A.A. (1973)

"Serological cross-reaction between different *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica*. Biological and chemical investigations of lipopolysaccharides from *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* type IX".

Acta Pathol. Microbiol. Scand. B, **81**, 105-112.

ITO, O., TACHIBANA, S. (1990)

"VIP precursors have highly potent bronchodilator activity".

Peptides, **12**, 131-137.

KLOECKAERT A. (1992)

"Identification, à l'aide d'AcM, d'Ag de la membrane externe de *Brucella*, utilisable pour le développement d'un vaccin ou d'un test de diagnostic".

Thèse de doctorat.

KONDO, A., FURUKAWA, S., TAIRA, M., HIGASHITANI, K. (1991)

"Effects of peptide antigenic determinant properties on adsorption equilibrium of anti-peptide antibodies".

Journal of fermentation and bioengineering, **72**, 409-412.

LAM, K.S., SALMON, S.E., MERSH, E.M., HRUBY, V.J., KAZMIERSKY, W.M., KNAPP, R.J. (1991)

"A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity".

Nature, **354**, 82-84.

MADAULE, P., GAIRIN, J.E., BENICHO, S., ROSSIER, J. (1991)

"A peptide library expressed in yeast reveals new major epitopes from HIV-1".

Microbiol. immunol. , **76**, 99-108.

MAGISTRETTI, P.J. (1986)

"Régulation du métabolisme énergétique dans le cortex cérébral par les neurones à VIP : un exemple de neurotransmission peptidique".

Neurochirurgie, **32**, 324-331.

**MELOEN, R.H., PUYK, W.C., MEIJER, D.J.A., LANKHOF, H.,
POSTHUMUS, W.P.A., SCHAAPER, W.M.M. (1987)**

"Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides of FMDV".
J. Gen. Virol., **68**, 305-314.

MERRIFIELD, R.B. (1963)

"Solid-phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide".
J. Am. Chem. Soc., **85**, 2149-2154.

MERRIFIELD R.B. (1969)

"Solid-phase synthesis"
Adv. Enzymol., **32**, 221-296.

MICHIELS, C. (1989)

"La dégenescence cellulaire : importance des systèmes de défense
contre les radicaux libres".
Thèse de doctorat, Laboratoire de Biochimie Cellulaire, FUNDP, Namur.

**O'DONNELL, M., GARIPPA, R.J., O'NEILL, N.C., BOLIN, D.R.,
COTTRELL, J.M. (1991)**

"Structure-activity studies of VIP".
J. Biol. Chem., **266**, 6389-6392.

PARMLEY, S.F. and SMITH, G.P. (1988)

"Antibodies-selectable filamentous fd phage vectors : affinity purification
of target genes".
Gene, **73**, 305-318.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (1988)

"Immunologie fondamentale et appliquée", 2^e édition,
Medsi/McGraw-Hill, Paris.

SCOTT, J.K. and SMITH, G.P. (1990)

"Searching for peptide ligands with an epitope library".
Science, **249**, 386-390.

MERCK INDEX (1983)

An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 10th edition, p 1431.

YOUNG, R.A. and DAVIS, R.W. (1983)

"Efficient isolation of genes by using antibody probes".

Proc. Natl. Acad. Sc. USA, **80**, 1194-1198.

**WILSON, I.A., NIMAN, H.L., HOUGHTEN, R.A., CHERENSON, A.R.,
CONNOLY, M.L., LERNER, R.A. (1984)**

"The structure of an antigenic determinant in a protein".

Cell, **37**, 767-778.