

50376  
1988  
193



50376  
1988  
193

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE - FLANDRES ARTOIS

N° d'ordre 306

THESE

pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE - FLANDRES ARTOIS  
spécialité : chimie organique et macromoléculaire

présentée le 20 Décembre 1988 par  
Christine DUBEAUX

**ELABORATION D'IMMUNOGENES SYNTHETIQUES**  
**POUR LA VACCINATION:**  
étude des modèles du poliovirus et *Plasmodium*  
*falciparum*

Jury : Dr. D. BLANOT (rapporteur)  
Dr. H. GRAS-MASSE  
Dr. J. JOLIVET  
Pr. C. LOUCHEUX (rapporteur)  
Pr. H. SLIWA  
Pr. A. TARTAR

Ces travaux ont été réalisés dans le Service de Chimie des  
Bio-Molécules dirigé par le professeur A. TARTAR à l'Institut  
Pasteur de Lille

## INTRODUCTION

### I: INTERET DES IMMUNOGENES SYNTHETIQUES

### II: CRITERES DE SELECTION DES PEPTIDES

#### 1. Critères de choix

##### 1.1 Critères structuraux

1.1.1. Critères thermodynamiques

1.1.2. Critères statistiques

##### 1.2. Fréquence de mutations

#### 2. Virus de la poliomyélite

##### 2.1. Structure du poliovirus

##### 2.2. Propriétés immunologiques

##### 2.3. Choix des peptides

2.3.1. Critères structuraux

2.3.2. Localisation des peptides sélectionnés au niveau de la structure spatiale de la capsid

2.3.3. Recherche d'homologies

##### 2.4 Synthèses et purifications

2.4.1. Principe de la synthèse peptidique en phase solide

2.4.2. Techniques de purification

2.4.3. Contrôles

2.4.4. Obtention et caractérisation des peptides issus de la protéine VP2

##### 2.5. Résultats immunologiques

##### 2.6. Fiabilité des méthodes prédictives

### III : CONCEPTION ET ELABORATION D'IMMUNOGENES SYNTHETIQUES

#### 1. Principes d'élaboration d'immunogènes synthétiques

1.1. Choix des molécules porteuses

1.2. Choix des adjuvants

#### 2. *Plasmodium falciparum*

2.1. Cycle évolutif du *Plasmodium falciparum*

#### 3. Protéine CS (Circumsporozoïte)

3.1. Structure de la protéine du circumsporozoïte

3.2. Stratégies de synthèse

- 3.2.1. Synthèse en phase solide
- 3.2.2. Synthèse de NANP en phase homogène
- 3.2.3. Synthèse de (NANP)<sub>4</sub> par couplages de fragments en phase solide
- 3.3. Etudes de ciblage
- 3.4. Etudes conformationnelles
- 3.5. Influence de la structure secondaire sur l'antigénicité des peptides
- 3.6. Elaboration d'immunogènes synthétiques
  - 3.6.1. Construction d'un modèle de présentation au système immunitaire
  - 3.6.2. Synthèse des conjugués MDP
- 4. Antigène spécifique du stade hépatique (LSA)**
  - 4.1. Choix des peptides
  - 4.2. Synthèses et purifications des peptides
    - 4.2.1. Résines utilisées
    - 4.2.2. Synthèses
    - 4.2.3. Purifications
  - 4.3. Etudes de ciblage
  - 4.4. Etudes conformationnelles
  - 4.5. Etudes immunologiques
    - 4.5.1. Etude de l'antigénicité des peptides
    - 4.5.2. Rôle des mutants Glu et Gly
    - 4.5.3. Influence de l'organisation sur l'antigénicité des peptides
  - 4.6. Conclusion
- 5 Elaboration d'un vaccin hybride**
  - 5.1. Choix des séquences
  - 5.2. Synthèses et purifications
  - 5.3. Etudes conformationnelles
  - 5.4. Préparation des conjugués
- 6. Conclusion**

## **CONCLUSIONS GENERALES**

## **MATERIELS ET METHODES**

### **1. Méthodes générales**

- 1.1. Fixation sur une résine chlorométhylée

- 1.2. Détermination de la charge des peptidyl-résines
- 1.3. Elongation de la chaîne peptidique
- 1.4. Couplage de l'acide aminé
- 1.5. Contrôles après déprotection et couplage
- 1.6. Libération du peptide de la résine par le fluorure d'hydrogène
- 1.7. Analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale
- 1.8. Chromatographie sur couche mince
- 1.9. Couplages sur une molécule porteuse
- 1.10. Dosage du taux de protéine (Lowry)
- 1.11. Dosage des fonctions thiols (Ellman)

## **2. Synthèses des peptides**

- 2.1. peptides issus de la protéine VP2 du poliovirus
- 2.2. peptides issus de la protéine CS du sporozoïte
- 2.3. Peptides issus de la protéine du stade hépatique (LSA)

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## ABREVIATIONS

A	: alanine
acm	: acétamidométhyle
AcEt	: acétate d'éthyle
AcOAc	: anhydride acétique
Boc	: tertio-butyloxycarbonyle
BSA	: sérum albumine bovine
BtOH	: butanol
C	: cystéine
CCM	: chromatographie sur couche mince
c <sup>4</sup> -hex	: cyclo-hexyle
2,6 diClBzl	: 2,6 dichloro-benzyle
CM	: carboxyméthyle cellulose
D	: acide aspartique
DIEA	: diisopropyléthylamine
DCC	: dicyclohexylcarbodiimide
DCU	: dicyclohexylurée
DEAE	: diéthylaminoéthyle
DMF	: diméthylformamide
E	: acide glutamique
ELISA	: dosage immunoenzymatique "enzyme-linked-immunosorbent assay"
EtOH	: éthanol
F	: phenylalanine
FAB	: spectrométrie de masse "fast atom bombardment"
FCA	: adjuvant complet de Freund
FIA	: adjuvant incomplet de Freund

FMOC	: fluorénylméthylloxycarbonyle
G	: glycine
H	: histidine
HOBt	: hydroxybenzotriazole
HPLC	: chromatographie liquide haute performance
HSA	: sérum albumine humaine
I	: isoleucine
IPrOH	: isopropanol
K	: lysine
KLG	: hémocyanine de patelle
MDP	: muramyl-dipeptide
MeOH	: méthanol
4,4' MBH	: 4,4'-diméthoxybenzhydrol
L	: leucine
M	: méthionine
N	: asparagine
O-Bzl	: ester ou éther benzylique
-OSu	: ester hydroxysuccinimide
P	: proline
Pam	: phenylacétamidométhyle
Q	: glutamine
R	: arginine
S	: sérine
T	: thréonine
TG	: thyroglobuline bovine
tos.	: tosyle
TT	: anatoxine tétanique
V	: valine

W : tryptophane  
Y : tyrosine  
Z : benzyloxycarbonyl

# INTRODUCTION

Les vaccins "conventionnels" ont permis l'éradication ou le net recul d'un certain nombre de maladies (diphtérie, variole, tétanos), du moins dans les pays industrialisés.

Le principe de la vaccination consiste à injecter soit des agents pathogènes atténués ou inactivés, soit des protéines sécrétées par des bactéries pathogènes, telles la toxine tétanique ou la toxine diphtérique préalablement détoxifiées.

Ces vaccins "naturels" bien qu'efficaces présentent néanmoins certains inconvénients liés à

- la production comme le vaccin de l'hépatite B dont la source d'antigène HBs est le sang de porteurs sains.
- au retour à la virulence possible pour certains vaccins obtenus à partir d'agents pathogènes atténués

Pour résoudre ces problèmes, d'actives recherches sont consacrées actuellement à l'obtention de vaccins synthétiques purs, efficaces, bon marché et stables.

Tout au long de nos travaux, nous avons pour objectifs :

- la conception et l'élaboration d'immunogènes synthétiques utilisables en vaccination humaine,
- la caractérisation chimique d'immunogènes synthétiques afin de faciliter le contrôle et d'accroître la qualité.

Après avoir rappelé brièvement l'intérêt des immunogènes synthétiques, nous étudierons les différents critères de

sélection de séquences peptidiques dans le deuxième chapitre de notre thèse. Le modèle du poliovirus, dont la structure tridimensionnelle a été élucidée au cours de notre étude, nous permettra d'apprécier l'efficacité des méthodes prédictives.

Puis le troisième chapitre sera consacré à l'optimisation des méthodologies de synthèse et couplage pour obtenir des immunogènes synthétiques. Le parasite, *Plasmodium falciparum*, nous servira de modèle pour améliorer la présentation de l'antigène au système immunitaire.

**I : INTERET DES IMMUNOGENES  
SYNTHETIQUES**

Le développement de biotechnologies modernes (biologie moléculaire, génie génétique, séquençage de l'acide désoxyribonucléique et de protéines, synthèse peptidique, méthodes de purification...) a permis d'obtenir des peptides naturels ou synthétiques, copiant des domaines précis dans des protéines naturelles d'origine bactérienne, virale ou parasitaire.

Les premiers essais d'immunisation ont montré qu'il était possible, au moyen d'un peptide couplé à une protéine porteuse, d'obtenir des anticorps qui reconnaissent une protéine entière (Arnon 1971).

Puis Lerner a démontré la capacité d'obtenir des anticorps anti-peptides qui reconnaissent pratiquement toutes les zones accessibles de la protéine cible (Lerner, 1982).

Ensuite l'immunisation de lapins avec un fragment peptidique issu de coliphage MS2, et couplé à une molécule porteuse synthétique poly - DL - alanine - poly - L - lysine - (A-L), a suscité l'élaboration d'anticorps capables de neutraliser *in vitro* un virus bactérien (Langbeheim, 1976).

Enfin en 1981, un peptide synthétique associé à des protéines porteuses, naturelles ou synthétiques, et à un adjuvant d'immunisation permettait d'obtenir des anticorps neutralisant *in vivo* la toxine diphtérique (Audibert, 1981).

Depuis, de nombreux travaux ont révélé l'importance croissante des peptides dans l'élaboration de futurs vaccins contre des:

- virus: \* hépatite B (Audibert - 1984)  
\* syndrome d'immunodéficience acquise humaine (Kennedy, 1986)  
\* fièvre aphteuse (Bittle 1982)  
\* influenzae (Sutcliffe, 1983)
- bactéries: \* gonocoque (Rothbard, 1985)  
\* streptocoque (Jolivet - 1983)
- hormones: \* luteinising hormone releasing hormone (LHRH) (Carelli, 1982 - Drobecq, 1984)  
\* hormone gonadotrophine chorionique (Bellet, 1984)
- parasites: \* *Trypanosoma cruzi* , vecteur de la maladie de Chagas (Ouaissi, in press).

Ces résultats reflètent la capacité pour des peptides synthétiques de susciter la production d'anticorps de spécificité prédéterminée, qui non seulement se lient à la protéine intacte mais également neutralisent ou provoquent la destruction de leur cible. Les peptides utilisés peuvent représenter des sites antigéniques exprimés par la protéine naturelle, ou des zones présentes en surface, qui habituellement ne sont pas immunogènes lorsque la protéine intacte est utilisée comme antigène.

Outre l'intérêt thérapeutique, les peptides peuvent avoir également une application en immuno-diagnostique (Saile, 1988). Le dosage de protéines est assuré par des anticorps anti-peptides qui les reconnaissent.

Enfin, les peptides ont d'autres applications. L'obtention d'anticorps monoclonaux, ainsi que des lignées cellulaires ou des clones de cellules T ont permis l'étude plus fondamentale des bases moléculaires de phénomènes immunologiques, telles l'hypersensibilité retardée, la tolérance immunologique, la compétition antigénique, le contrôle génétique de la réponse immunitaire...

Au cours de nos travaux de recherche, nous nous sommes intéressées à l'élaboration d'immunogènes synthétiques qui comprend plusieurs étapes:

- choix des séquences peptidiques,
- synthèses et purifications,
- choix des molécules porteuses et adjuvants.

## **II : CRITERES DE SELECTION DES PEPTIDES**

Dans notre laboratoire, s'est largement développé et informatisé un ensemble de méthodes qui permettent d'orienter le choix des fragments protéiques susceptibles d'être exposés au milieu extérieur, en particulier aux anticorps.

Une séquence aura d'autant plus de chance d'être exposée à la surface de la protéine qu'elle sera hydrophile, mobile, et/ou adoptera une structure secondaire qui apparaîtra dans des parties exposées de la protéine.

La structure primaire de la protéine est le seul élément indispensable à connaître. La séquence en acides aminés peut être obtenue par :

- dégradation d'Edman de la protéine ou de fragments protéiques obtenus après clivages spécifiques de la protéine purifiée (bromure de cyanogène, trypsine, ...)
- déduction à partir de la structure du gène codant la protéine. Cette dernière méthode présente l'avantage théorique de s'affranchir des techniques d'isolement et de purification de la protéine.

Afin d'évaluer le pouvoir prévisionnel de nos méthodes de sélection, nous nous sommes intéressées à la protéine VP2 du virus de la poliomyélite type 1 qui s'est révélée capable de susciter la formation d'anticorps neutralisants (Van der Marel, 1983 - Dernick, 1983). Notre but était d'identifier des fragments peptidiques issus de la protéine VP2, susceptibles de susciter l'élaboration d'anticorps qui reconnaissent et neutralisent le

virion dans le cadre d'une vaccination humaine. Dès l'apparition dans la littérature de la séquence primaire de la protéine VP2 type 1 (Racaniello, 1981 - Kitamura 1981), nous avons sélectionné, au moyen de différents critères de choix, cinq peptides que nous avons synthétisés et purifiés.

Grâce à notre étroite collaboration avec le Docteur Chedid et son équipe, alors installés à l'Institut Pasteur de Paris et actuellement à Tampa (USA), l'antigénicité et l'immunogénicité de ces peptides ont pu être évaluées.

Ultérieurement la structure tridimensionnelle de la capsid du virus de la poliomyélite a été élucidée par radiocristallographie avec une résolution de 2,9 Å. (Hogle, 1985). Cette découverte nous a offert une chance inespérée de mieux apprécier les capacités ainsi que les limites de nos méthodes prédictives, que la protéine VP2 soit isolée ou replacée dans son contexte naturel de capsid.

## 1. CRITERES DE CHOIX

Il est possible d'obtenir au moyen d'immunogènes synthétiques des anticorps contre presque tous les peptides. Mais ces anticorps ne pourront reconnaître leur séquence-cible que si elle est en partie accessible dans son contexte naturel. Une séquence peptidique aura d'autant plus de chance d'être accessible au système immunitaire qu'elle sera exposée à la surface de la

protéine étudiée.

Nous avons distingué :

- les critères structuraux
- les critères biologiques

### 1.1. Critères structuraux

Ils s'appuient sur des propriétés physico-chimiques des macromolécules.

#### 1.1.1. Critères thermodynamiques

##### 1.1.1.1. Méthodes de Hopp et Wood (1981, 1983).

Hopp et Wood ont proposé une méthode de prédiction qui repose sur l'estimation de l'hydrophilie moyenne de courtes séquences peptidiques (six acides aminés).

L'hydrophilie moyenne d'un hexapeptide correspond à la moyenne des hydrophilies de ses chaînes latérales. La valeur moyenne est attribuée au premier acide aminé de l'hexapeptide. Le calcul est répété le long de la séquence protéique en décalant la fenêtre d'un incrément de un acide aminé. A tous les acides aminés d'une séquence protéique, correspond ainsi une valeur d'hydrophilie moyenne qu'il suffit de comparer entre elles.

Hopp et Wood ont utilisé les paramètres de Levitt (1976) dérivés

des mesures d'énergie libre de transfert (eau/méthanol) définies par Nozaki (1971). Afin d'obtenir une meilleure corrélation avec les expériences réalisées sur des protéines dont les épitopes dominants avaient été localisés, Hopp et Wood ont modifié certains paramètres. Les valeurs des acides aspartique et glutamique (2,5) ont été élevées à 3 et celle de la proline (-1,4) a été ajustée à 0, comme le montre le tableau 2.1.

Acide aminé	S, kcal/mole	Valeurs d'hydrophilie
Arg	3,0	3,0
Asp	2,5	3,0
Glu	2,5	3,0
Lys	3,0	3,0
Ser	0,3	0,3
Asn	0,2	0,2
Gln	0,2	0,2
Gly	0,0	0,0
Pro	- 1,4	0,0
Thr	- 0,4	- 0,4
Ala	- 0,5	- 0,5
His	- 0,5	- 0,5
Cys	- 1,0	- 1,0
Met	- 1,3	- 1,3
Val	- 1,5	- 1,5
Ile	- 1,8	- 1,8
Leu	- 1,8	- 1,8
Tyr	- 2,3	- 2,3
Phe	- 2,5	- 2,5
Trp	- 3,4	- 3,4

Tableau 2.1 : valeurs d'hydrophilie  
(Hopp et Wood)

Cette méthode privilégie nettement les chaînes latérales ionisables aux dépens des chaînes latérales polaires.

#### 1.1.1.2. Méthode de Fraga

Fraga (1982) a proposé de modifier la méthode de Hopp et Wood. Il

fait intervenir pour chaque acide aminé les facteurs d'hydrophilie définis par Hopp et Wood, ainsi que les facteurs de reconnaissance, qui représentent les interactions entre acides aminés.

Les facteurs de reconnaissance correspondent à la moyenne d'énergie d'interaction d'une chaîne latérale d'un acide aminé donné avec les vingt autres. Plus le facteur de reconnaissance d'un acide aminé sera élevé, plus il aura tendance à s'associer avec les autres résidus, il aura peu de chance par conséquent d'être présent en surface, et de pouvoir se lier aux anticorps.

Pour chaque hexapeptide, un "profil global", est alors défini par multiplication des facteurs d'hydrophilie et de reconnaissance (tableau 2.2):

Acide Aminé	Facteur de Fraga
Ala	78
Arg	95
Asn	94
Asp	81
Cys	89
Glu	87
Gln	78
Gly	84
His	84
Ile	88
Leu	85
Lys	87
Phe	81
Pro	91
Ser	107
Thr	93
Trp	104
Tyr	84
Val	89

Tableau 2.2 : facteurs de Fraga

Seront recherchées de préférence les zones de forte hydrophilie qui auront un facteur de reconnaissance faible.

Ces méthodes présentent l'inconvénient majeur de ne pas tenir compte de la conformation protéique. La proline, par exemple, a de fortes chances d'être située dans un coude  $\beta$ , conformation fortement exposée, et donc susceptible d'interagir avec le système immunitaire.

#### 1.1.2. Critères statistiques

L'examen approfondi de protéines dont la structure tridimensionnelle est connue, permet de dégager, pour chaque acide aminé ou groupe d'acides aminés, des critères statistiques concernant leur accessibilité moyenne, ou la probabilité d'adopter tel type de conformation.

##### 1.1.2.1. Acrophilie

Parce que la méthode de Hopp et Wood, étudiée au paragraphe précédent, ne permettait pas de prédire la localisation de tous les sites antigéniques connus, Hopp (1984) a réajusté les valeurs et les a dénommées paramètres d'acrophilie. Ce terme, d'origine grec, traduit une meilleure exposition des séquences sélectionnées à l'aide de ces critères.

L'étude cristallographique de quarante-neuf structures protéiques

a permis à Hopp d'établir une nouvelle échelle de valeurs (tableau 2.3). Ces nouveaux paramètres mettent en valeur les acides aminés qui apparaissent fréquemment dans des zones fortement exposées d'une chaîne peptidique. (Gly, Pro, Asn, Asp et Ser).

Acide Aminé	Valeurs d'acrophilie	Acide Aminé	Valeurs d'acrophilie
Gly	3,0	His	-0,4
Pro	2,6	Ala	-0,5
Asn	2,3	Val	-0,7
Asp	2,1	Met	-1,8
Ser	1,8	Tyr	-2,0
Lys	1,4	Leu	-2,5
Glu	0,5	Ile	-2,5
Arg	0,3	Cys	-2,6
Thr	- 0,1	Phe	-2,7
Gln	- 0,2	Trp	-3,0

Tableau 2.3 : valeurs d'acrophilie  
(Hopp)

Les tableaux 2.1 et 2.3 mettent en évidence une similitude entre les valeurs, tout au moins dans la partie inférieure, les acides aminés hydrophobes étant également acrophobes. Par contre, c'est au sommet de l'échelle que la différence est la plus significative. Alors que les résidus chargés prédominent dans l'échelle d'hydrophilie, ce sont les petits acides aminés qui dominent l'échelle d'acrophilie.

#### 1.1.2.2. Hydropathie

L'hydropathie est un terme qui reflète à la fois l'hydrophilie, et la lipophilie du segment considéré. Kyte et Doolittle (1982)

ont élaboré une méthode comparable à celle de Hopp et Wood. Ils attribuent une valeur moyenne d'hydropathie sur groupe d'acides aminés et comparent en valeurs le long d'une chaîne protéique.

Kyte et Doolittle ont utilisé les paramètres de Chothia (1976). L'étude de douze protéines globulaires leur a permis de dégager pour chaque type d'acide aminé le nombre de résidus exposés en surface et le nombre de résidus enfouis. Ils considèrent deux types d'enfouissement : soit un enfouissement de 100%, soit un enfouissement de 95% de la chaîne (tableau 2.4).

Acide Aminé	Indice d'hydropathie	$\Delta G^\circ$ transfert eau/vapeur	Fraction des chaînes latérales enfouies	
			100%	95%
Ile	4,5	4,4	4,5	5,2
Val	4,2	4,2	4,3	4,2
Leu	3,8	4,5	3,2	2,8
Phe	2,8	2,5	2,5	3,5
Cys	2,5	1,9	6,0	3,2
Met	1,9	1,9	1,0	1,9
Ala	1,8	3,9	5,3	1,6
Gly	- 0,4	-	4,2	1,3
Thr	- 0,7	- 0,6	- 0,5	- 1,0
Trp	- 0,9	- 0,9	- 2,4	- 0,3
Ser	- 0,8	- 0,8	- 0,7	- 1,0
Tyr	- 1,3	- 1,1	- 3,3	- 2,2
Pro	- 1,6	-	- 2,4	- 1,8
His	- 3,2	- 4,2	- 3,6	- 1,9
Glu	- 3,5	- 3,9	- 2,8	- 1,7
Gln	- 3,5	- 3,5	- 4,0	- 3,6
Asp	- 3,5	- 4,5	- 2,5	- 2,3
Asn	- 3,5	- 3,8	- 3,1	- 2,7
Lys	- 3,9	- 3,2	-	- 4,2
Arg	- 4,5	-	-	-

Tableau 2.4 : échelle d'hydropathie (Chothia)

### 1.1.2.3. Surface accessible

Dans notre laboratoire, la méthode de Doolittle a pu être améliorée grâce aux observations de Janin (1979) concernant la surface accessible aux solvants de protéines globulaires.

L'accessibilité des protéines au milieu extérieur varie en fonction du poids moléculaire. En effet, si le volume (c'est à dire le nombre de résidus) augmente avec le cube du diamètre, la surface n'augmente que proportionnellement au carré du diamètre. Ceci se traduit par une relation de corrélation entre le nombre de résidus exposés et le nombre total de résidus de la chaîne polypeptidique. Autrement dit, plus la protéine est volumineuse, plus elle est exigeante quant à l'exposition de ses chaînes latérales.

Des études statistiques sur vingt-deux protéines globulaires ont permis à Janin de définir, pour chaque acide aminé, un paramètre d'enfouissement ( $f$ ), ainsi que l'énergie de transfert ( $\Delta G_t$ ) de l'intérieur vers la surface de la protéine (tableau 2.5).

Acide Aminé	Fraction molaire		Energie libre	
	Enfouie E	Accessible A	$f = \frac{E}{A}$	(Kcal/mole) $\Delta G_t = RT \log f_n$
Leu	11,7	4,8	2,4	0,5
Val	12,9	4,5	2,9	0,6
Ile	8,6	2,8	3,1	0,7
Phe	5,1	2,4	2,2	0,5
Cys	4,1	0,9	4,6	0,9
Met	1,9	1,0	1,9	0,4
Ala	11,2	6,6	1,7	0,3
Gly	11,8	6,7	1,8	0,3
Trp	2,2	1,4	1,6	0,3
Ser	8,0	9,4	0,8	- 0,1
Thr	4,9	7,0	0,7	- 0,2
His	2,0	2,5	0,8	- 0,1
Tyr	2,6	5,1	0,5	- 0,4
Pro	2,7	4,8	0,6	- 0,3
Asn	2,9	6,7	0,4	- 0,5
Asp	2,9	7,7	0,4	- 0,6
Gln	1,6	5,2	0,3	- 0,7
Glu	1,8	5,7	0,3	- 0,7
Arg	0,5	4,5	0,1	- 1,4
Lys	0,5	10,3	0,05	- 1,8

Tableau 2.5 : composition en acides aminés enfouis et accessibles d'une protéine globulaire (Janin)

Le principe du calcul, mis au point dans notre laboratoire, tient compte à la fois de la nature des acides aminés et de la proportion relative des résidus exposés en fonction du nombre total de résidus. Le programme permet alors de:

- dégager un profil global d'accessibilité de la protéine considérée. Une valeur moyenne d'exposition "calculée", établie pour six acides aminés consécutifs, est attribuée au premier acide aminé de l'hexapeptide considéré. Ce calcul simple est répété le long de la chaîne peptidique; ce qui permet de repérer les zones les plus accessibles et de calculer la surface exposée de la protéine.
- déterminer l'exposition moyenne "théorique" qui est

évaluée sur la base du nombre d'acides aminés de la protéine et dans l'hypothèse d'une structure globulaire,

Une bonne corrélation entre les valeurs "calculées" et "théoriques" accrédite la probabilité que possède la protéine d'adopter une structure globulaire.

#### 1.1.2.4. Mobilité segmentaire

Westhoff (1984) et Tainer (1984) ont démontré que les déterminants séquentiels correspondent très souvent à des zones mobiles.

#### **Facteurs de mobilité**

L'étude de protéines globulaires, assimilées à des sphères, a permis à Ponnuswamy et Bhaskaran (1984) d'attribuer à chaque acide aminé un facteur de déplacement moyen, déduit de facteurs de température (tableau 2.6).

Les résultats de ces études sont les suivants :

- dépendance du déplacement par fluctuation d'un résidu et de sa position radiale (par rapport au centroïde d'une protéine globulaire),
- déplacements importants des boucles, des résidus polaires, de la proline et la glycine,
- déplacements mineurs des résidus non polaires, des hélices  $\alpha$  et des feuillets plissés  $\beta$ ,

## **INTRODUCTION**

Les vaccins "conventionnels" ont permis l'éradication ou le net recul d'un certain nombre de maladies (diphtérie, variole, tétanos), du moins dans les pays industrialisés.

Le principe de la vaccination consiste à injecter soit des agents pathogènes atténués ou inactivés, soit des protéines sécrétées par des bactéries pathogènes, telles la toxine tétanique ou la toxine diphtérique préalablement détoxifiées.

Ces vaccins "naturels" bien qu'efficaces présentent néanmoins certains inconvénients liés à

- la production comme le vaccin de l'hépatite B dont la source d'antigène HBs est le sang de porteurs sains.
- au retour à la virulence possible pour certains vaccins obtenus à partir d'agents pathogènes atténués

Pour résoudre ces problèmes, d'actives recherches sont consacrées actuellement à l'obtention de vaccins synthétiques purs, efficaces, bon marché et stables.

Tout au long de nos travaux, nous avons pour objectifs :

- la conception et l'élaboration d'immunogènes synthétiques utilisables en vaccination humaine,
- la caractérisation chimique d'immunogènes synthétiques afin de faciliter le contrôle et d'accroître la qualité.

Après avoir rappelé brièvement l'intérêt des immunogènes synthétiques, nous étudierons les différents critères de

sélection de séquences peptidiques dans le deuxième chapitre de notre thèse. Le modèle du poliovirus, dont la structure tridimensionnelle a été élucidée au cours de notre étude, nous permettra d'apprécier l'efficacité des méthodes prédictives.

Puis le troisième chapitre sera consacré à l'optimisation des méthodologies de synthèse et couplage pour obtenir des immunogènes synthétiques. Le parasite, *Plasmodium falciparum*, nous servira de modèle pour améliorer la présentation de l'antigène au système immunitaire.

**I : INTERET DES IMMUNOGENES  
SYNTHETIQUES**

Le développement de biotechnologies modernes (biologie moléculaire, génie génétique, séquençage de l'acide désoxyribonucléique et de protéines, synthèse peptidique, méthodes de purification...) a permis d'obtenir des peptides naturels ou synthétiques, copiant des domaines précis dans des protéines naturelles d'origine bactérienne, virale ou parasitaire.

Les premiers essais d'immunisation ont montré qu'il était possible, au moyen d'un peptide couplé à une protéine porteuse, d'obtenir des anticorps qui reconnaissent une protéine entière (Arnon 1971).

Puis Lerner a démontré la capacité d'obtenir des anticorps anti-peptides qui reconnaissent pratiquement toutes les zones accessibles de la protéine cible (Lerner, 1982).

Ensuite l'immunisation de lapins avec un fragment peptidique issu de coliphage MS2, et couplé à une molécule porteuse synthétique poly - DL - alanine - poly - L - lysine - (A-L), a suscité l'élaboration d'anticorps capables de neutraliser *in vitro* un virus bactérien (Langbeheim, 1976).

Enfin en 1981, un peptide synthétique associé à des protéines porteuses, naturelles ou synthétiques, et à un adjuvant d'immunisation permettait d'obtenir des anticorps neutralisant *in vivo* la toxine diphtérique (Audibert, 1981).

Depuis, de nombreux travaux ont révélé l'importance croissante des peptides dans l'élaboration de futurs vaccins contre des:

- virus:
  - \* hépatite B (Audibert - 1984)
  - \* syndrome d'immunodéficience acquise humaine (Kennedy, 1986)
  - \* fièvre aphteuse (Bittle 1982)
  - \* influenzae (Sutcliffe, 1983)
- bactéries:
  - \* gonocoque (Rothbard, 1985)
  - \* streptocoque (Jolivet - 1983)
- hormones:
  - \* luteinising hormone releasing hormone (LHRH) (Carelli, 1982 - Drobecq, 1984)
  - \* hormone gonadotrophine chorionique (Bellet, 1984)
- parasites:
  - \* *Trypanosoma cruzi* , vecteur de la maladie de Chagas (Ouaissi, in press).

Ces résultats reflètent la capacité pour des peptides synthétiques de susciter la production d'anticorps de spécificité prédéterminée, qui non seulement se lient à la protéine intacte mais également neutralisent ou provoquent la destruction de leur cible. Les peptides utilisés peuvent représenter des sites antigéniques exprimés par la protéine naturelle, ou des zones présentes en surface, qui habituellement ne sont pas immunogènes lorsque la protéine intacte est utilisée comme antigène.

Outre l'intérêt thérapeutique, les peptides peuvent avoir également une application en immuno-diagnostique (Saile, 1988). Le dosage de protéines est assuré par des anticorps anti-peptides qui les reconnaissent.

Enfin, les peptides ont d'autres applications. L'obtention d'anticorps monoclonaux, ainsi que des lignées cellulaires ou des clones de cellules T ont permis l'étude plus fondamentale des bases moléculaires de phénomènes immunologiques, telles l'hypersensibilité retardée, la tolérance immunologique, la compétition antigénique, le contrôle génétique de la réponse immunitaire...

Au cours de nos travaux de recherche, nous nous sommes intéressées à l'élaboration d'immunogènes synthétiques qui comprend plusieurs étapes:

- choix des séquences peptidiques,
- synthèses et purifications,
- choix des molécules porteuses et adjuvants.

## **II : CRITERES DE SELECTION DES PEPTIDES**

Dans notre laboratoire, s'est largement développé et informatisé un ensemble de méthodes qui permettent d'orienter le choix des fragments protéiques susceptibles d'être exposés au milieu extérieur, en particulier aux anticorps.

Une séquence aura d'autant plus de chance d'être exposée à la surface de la protéine qu'elle sera hydrophile, mobile, et/ou adoptera une structure secondaire qui apparaîtra dans des parties exposées de la protéine.

La structure primaire de la protéine est le seul élément indispensable à connaître. La séquence en acides aminés peut être obtenue par :

- dégradation d'Edman de la protéine ou de fragments protéiques obtenus après clivages spécifiques de la protéine purifiée (bromure de cyanogène, trypsine, ...)
- déduction à partir de la structure du gène codant la protéine. Cette dernière méthode présente l'avantage théorique de s'affranchir des techniques d'isolement et de purification de la protéine.

Afin d'évaluer le pouvoir prévisionnel de nos méthodes de sélection, nous nous sommes intéressées à la protéine VP2 du virus de la poliomyélite type 1 qui s'est révélée capable de susciter la formation d'anticorps neutralisants (Van der Marel, 1983 - Dernick, 1983). Notre but était d'identifier des fragments peptidiques issus de la protéine VP2, susceptibles de susciter l'élaboration d'anticorps qui reconnaissent et neutralisent le

virion dans le cadre d'une vaccination humaine. Dès l'apparition dans la littérature de la séquence primaire de la protéine VP2 type 1 (Racaniello, 1981 - Kitamura 1981), nous avons sélectionné, au moyen de différents critères de choix, cinq peptides que nous avons synthétisés et purifiés.

Grâce à notre étroite collaboration avec le Docteur Chedid et son équipe, alors installés à l'Institut Pasteur de Paris et actuellement à Tampa (USA), l'antigénicité et l'immunogénicité de ces peptides ont pu être évaluées.

Ultérieurement la structure tridimensionnelle de la capsid du virus de la poliomyélite a été élucidée par radiocristallographie avec une résolution de 2,9 Å. (Hogle, 1985). Cette découverte nous a offert une chance inespérée de mieux apprécier les capacités ainsi que les limites de nos méthodes prédictives, que la protéine VP2 soit isolée ou replacée dans son contexte naturel de capsid.

## 1. CRITERES DE CHOIX

Il est possible d'obtenir au moyen d'immunogènes synthétiques des anticorps contre presque tous les peptides. Mais ces anticorps ne pourront reconnaître leur séquence-cible que si elle est en partie accessible dans son contexte naturel. Une séquence peptidique aura d'autant plus de chance d'être accessible au système immunitaire qu'elle sera exposée à la surface de la

protéine étudiée.

Nous avons distingué :

- les critères structuraux
- les critères biologiques

### 1.1. Critères structuraux

Ils s'appuient sur des propriétés physico-chimiques des macromolécules.

#### 1.1.1. Critères thermodynamiques

##### 1.1.1.1. Méthodes de Hopp et Wood (1981, 1983).

Hopp et Wood ont proposé une méthode de prédiction qui repose sur l'estimation de l'hydrophilie moyenne de courtes séquences peptidiques (six acides aminés).

L'hydrophilie moyenne d'un hexapeptide correspond à la moyenne des hydrophilies de ses chaînes latérales. La valeur moyenne est attribuée au premier acide aminé de l'hexapeptide. Le calcul est répété le long de la séquence protéique en décalant la fenêtre d'un incrément de un acide aminé. A tous les acides aminés d'une séquence protéique, correspond ainsi une valeur d'hydrophilie moyenne qu'il suffit de comparer entre elles.

Hopp et Wood ont utilisé les paramètres de Levitt (1976) dérivés

- excellente corrélation avec l'exposition à la surface des protéines,
- corrélation également avec les études de dynamique moléculaire.

Acides Aminés non polaires	Déplacement (Å)	Acides Aminés polaires	Déplacement (Å)
Phe	0,605	His	0,849
Leu	0,679	Asn	0,861
Tyr	0,798	Thr	0,907
Cys	0,844	Arg	1,023
Met	0,871	Gln	1,109
Trp	0,876	Glu	1,126
Ile	0,940	Lys	1,233
Val	1,043	Ser	1,262
Ala	1,159	Asp	1,315
Acides Aminés	Déplacement (Å)		
Pro	0,963		
Gly	1,224		

Tableau 2.6 : déplacement moyen des acides aminés  
(Ponnuswamy et Bhaskaran)

Les valeurs de cette table permettent de définir, grâce à un algorithme simple (moyenne sur chaque hexapeptide), un profil global de mobilité.

### ***Facteurs de flexibilité***

Karplus et Schulz (1985) ont défini un facteur de flexibilité, également à partir de facteurs de température. Mais la différence

majeure entre leurs critères et ceux de Ponnuswamy tient à l'origine de leurs données. En effet, Karplus et ses collaborateurs ont étudié des protéines de courte séquence (environ 30 acides aminés), qui n'ont aucune relation avec les protéines globulaires étudiées par Ponnuswamy.

Pour chaque acide aminé, Karplus a défini un paramètre de flexibilité. Leur programme tient compte de l'effet de proche voisinage. C'est à dire que les valeurs de flexibilité d'un acide aminé donné sont modulées par la présence de 0, ou 1, ou 2 voisins rigides (tableau 2.7).

		Paramètres de flexibilité pour:		
AA		0 voisin rigide	1 voisin rigide	2 voisins rigides
	Lys	1,093	1,082	1,057
	Ser	1,169	1,048	0,923
	Gly	1,142	1,042	0,923
	Pro	1,055	1,085	0,932
	Asp	1,033	1,089	0,932
	Glu	1,094	1,036	0,933
	Gln	1,165	1,028	0,885
	Thr	1,073	1,051	0,934
	Asn	1,117	1,006	0,930
	Arg	1,038	1,028	0,901
	[Ala	1,041	0,946	0,892
	[Leu	0,967	0,961	0,921
	[His	0,982	0,952	0,894
	[Val	0,982	0,927	0,913
résidus	[Tyr	0,961	0,930	0,837
rigides	[Ile	1,002	0,892	0,872
	[Phe	0,930	0,913	0,914
	[Cys	0,960	0,878	0,925
	[Trp	0,925	0,917	0,803
	[Met	0,947	0,862	0,804

Tableau 2.7 : paramètres de flexibilité  
(Karplus)

La flexibilité relative prédite pour un résidu en position n

d'une séquence de sept acides aminés correspond à la somme des valeurs de flexibilité des acides aminés aux positions  $n-3$ ,  $n-2$ ,  $n-1$ ,  $n$ ,  $n+1$ ,  $n+2$  et  $n+3$ . Les valeurs de flexibilité sont affectées respectivement des constantes 0,25 ; 0,50 ; 0,75 ; 1 ; 0,75 ; 0,50 ; 0,25.

#### 1.1.2.5 Prévisions conformationnelles

Toujours dans le but de rechercher les zones exposées d'une protéine, nous avons privilégié les zones qui semblaient ne pas adopter de conformation définie ou qui contenaient des coudes  $\beta$ , correspondant fréquemment à des séquences exposées à la surface de la protéine. Ces zones seront facilement reproduites par des peptides de taille relativement courte. Différentes méthodes statistiques (Chou et Fasman, Garnier) permettent de prédire la structure secondaire d'une protéine à partir de sa séquence en acides aminés.

#### **Critères de Chou et Fasman**

La méthode de Chou et Fasman, (Chou, 1974) permet de localiser les coudes  $\beta$ , les hélices  $\alpha$  ainsi que les feuillets plissés  $\beta$ . Cependant, il faut garder à l'esprit, qu'une séquence peut très bien être organisée sous une autre forme de structure que celles mentionnées ci-dessus.

Sans entrer dans le détail des règles énoncées par Chou et

Fasman, rappelons-en simplement les principes. Les paramètres ont été établis à partir de quinze protéines dont la structure primaire ainsi que la conformation tridimensionnelle étaient connues. Une étude statistique permet alors de déterminer l'aptitude, que présente chacun des vingt acides aminés naturels, à être présent dans un type de conformation donnée. Les paramètres structuraux  $P\alpha$  et  $P\beta$ , correspondant aux structures d'hélice  $\alpha$  et feuillet plissé  $\beta$ , sont définis pour un acide aminé donné.

$$P\alpha = \frac{f\alpha}{\langle f\alpha \rangle} \qquad P\beta = \frac{f\beta}{\langle f\beta \rangle}$$

$f\alpha$  : fréquence d'apparition dans une structure hélicoïdale  $\alpha$   
 $f\beta$  : fréquence d'apparition dans une structure  $\beta$   
 $\langle f\alpha \rangle$  : nombre moyen d'acides aminés constituant la structure  $\alpha$   
 $\langle f\beta \rangle$  : nombre moyen d'acides aminés constituant la structure  $\beta$

Un segment de six résidus, au sein d'une protéine, adoptera probablement une structure d'hélice  $\alpha$  si:

- $P\langle\alpha\rangle$  est supérieur à  $P\langle\beta\rangle$
- $P\langle\alpha\rangle$  est supérieur à 1,03

La structure hélicoïdale sera privilégiée si les acides aminés qui la constituent induisent fortement cette structure. Par contre les résidus qui rompent la structure hélicoïdale ne doivent pas figurer dans la séquence. En particulier, la proline ne peut être intégrée au sein de l'hélice car elle la déstabilise.

Les segments de cinq résidus auront une forte probabilité d'adopter une structure de feuillet plissé  $\beta$  si:

- $\langle P\beta \rangle$  est supérieur à  $\langle P\alpha \rangle$
- $\langle P\beta \rangle$  est supérieur à 1,05

Le pentapeptide aura une forte probabilité d'adopter une structure de feuillet plissé  $\beta$  si le segment contient des résidus inducteurs de cette structure et ne comprend aucun élément qui défavorisent la structure  $\beta$ .

Dans le cas des prédictions de coudes  $\beta$ , la position du résidu considéré sur le coude est importante. A chaque acide aminé est attribué un paramètre différent selon la position qu'il occupe. Pour cette raison, le paramètre conformationnel  $P_t$ , défini pour un tétrapeptide, tient compte des probabilités:

$$P_t = f_i \times f_{i+1} \times f_{i+2} \times f_{i+3}$$

dans laquelle  $f_i$ ,  $f_{i+1}$ ,  $f_{i+2}$  et  $f_{i+3}$  représentent respectivement les fréquences d'existence des différents résidus en position du coude  $i$ ,  $i+1$ ,  $i+2$ ,  $i+3$ . Un coude  $\beta$  en position  $i$  sera prédit si  $P_t$  est supérieur à  $0,5 \times 10^{-4}$ .

### **Critères de Garnier**

Garnier et al. (1978) ont élaboré un algorithme qui permet de prédire quatre états conformationnels. A chaque résidu est attribué un état conformationnel d'hélice  $\alpha$ , coude  $\beta$ , chaîne étendue et structure aléatoire. L'analyse statistique de trente protéines différentes, dont la structure tridimensionnelle est

connue, a permis d'attribuer à chaque acide aminé, et pour chacun des quatre états conformationnels cités auparavant, un paramètre  $I(S_j, R_j)$ .

- $S_j$  représente l'état conformationnel du résidu  $j$
- $R_j$  représente le type de résidu

Des études antérieures avaient déjà souligné l'importance de l'environnement sur l'état conformationnel d'un résidu considéré. L'analyse conformationnelle est pondérée en moyennant les paramètres d'une séquence de dix-sept acides aminés. Le résidu central du fragment portant l'information conformationnelle, obéit à la relation suivante qui intègre la nature et l'état conformationnel de l'acide aminé:

$$I(S_j; R_1, R_2, \dots, R_n) \approx \sum_{m=-8}^{m=+8} I(S_j, R_{j+m})$$

Cette méthode tient compte de la position de chaque acide aminé, elle prend en considération les vingt types d'acides aminés et les quatre états conformationnels. Le nombre de paramètres définis est donc de:  $20 \times 4 \times 17 = 1360$ .

### 1.2. Fréquence de mutations

Nous nous sommes intéressées à la fréquence des mutations qui sont localisées au niveau de régions les plus variables, et qui sont impliquées dans les processus de neutralisation. L'inconvénient principal dans ces conditions est de contraindre à

synthétiser plusieurs peptides analogues afin de couvrir au maximum toutes les possibilités.

Afin de tester la fiabilité de ces méthodes de choix, nous avons étudié une des protéines de la capside du poliovirus type 1 : VP2.

## 2. VIRUS DE LA POLIOMYELITE

En dépit des vaccins actuels, qu'il s'agisse du vaccin oral à virus atténué ou du vaccin injectable à virus inactivé, la poliomyélite sévit toujours dans le monde, plus particulièrement dans les pays en voie de développement. Il est urgent de résoudre les problèmes inhérents au traitement préventif, à savoir :

- un accident dans la chaîne de fabrication des vaccins est toujours à craindre (comme celui apparu aux USA après l'obtention du visa de commercialisation),
- les vaccins actuels doivent être conservés à +4°C, ce qui pose également des problèmes techniques et financiers, notamment dans les pays en voie de développement,
- enfin, il est toujours à redouter le retour possible à la virulence du virus vaccinal excrété (forme atténuée).

Afin d'y remédier, le virus responsable est étudié depuis quelques années, dans le but de découvrir les zones généralement impliquées dans la neutralisation par le système immunitaire.

## 2.1. Structure du poliovirus

Le poliovirus appartient à la famille des *Picornaviridae* qui inclut également les rhinovirus, les coxsackievirus, les échovirus. Il existe trois variétés antigéniques distinctes 1, 2 et 3, chacune capable de déclencher des paralysies qui peuvent entraîner la mort. Le type 1 est la variété la plus fréquemment rencontrée.

En commun avec les autres membres de la famille des *Picornaviridae*, le virus possède les caractères structuraux suivants :

- un diamètre de 20 à 30 nm,
- un génôme constitué par l'acide ribonucléique (ARN) monocaténaire de  $2,5 \times 10^6$  daltons,
- une capside à symétrie cubique, constituée de 32 capsomères,
- une absence d'enveloppe.

La capside est composée de soixante copies de quatre protéines VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> et VP<sub>4</sub>. Les protéines VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub> et VP<sub>3</sub>, isolées et purifiées sous des conditions non dénaturantes se sont révélées capables de susciter la formation d'anticorps neutralisants (Van der Marel, 1983 - Dernick, 1983).

Des études topographiques (Wetz et Habermehl, 1979) ont permis d'établir que la protéine VP<sub>1</sub> est la plus exposée à la surface de la capside virale. Les protéines VP<sub>2</sub> et VP<sub>3</sub>, sont également

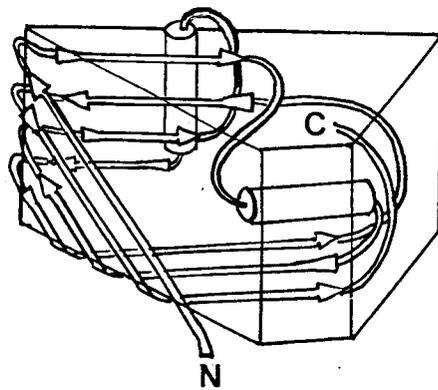


Figure 2.1: motif structural commun aux protéines de la capsid

exposées, mais à un moindre degré que VP1. Enfin la protéine VP4 apparaît complètement enfouie. Cette structure a été confirmée cinq ans plus tard par Hogle, Chow et Filman (1985)

Le virus, cristallisé par microdialyse à pH neutre, a été étudié par diffraction aux rayons X (Hogle, 1982). En 1985, Hogle, Chow et Filman ont déterminé la structure spatiale du poliovirus de type 1. Chacune des trois protéines VP1, VP2 et VP3 contiennent un motif structural commun qui comprend deux hélices et huit faisceaux antiparallèles réunis par des boucles (fig. 2.1). Cet arrangement structural se retrouve également chez d'autres membres de la famille des *Picornaviridae* : le Mengovirus (Luo, 1987), le rhinovirus (Rossman, 1985). A l'inverse des trois protéines VP1, VP2 et VP3 qui adoptent le même schéma de structure, le VP4 présente une conformation plus étendue et désordonnée. L'examen approfondi de ces structures permet de repérer, sur chacune des protéines, les boucles les plus exposées qui correspondent aux séquences suivantes :

- VP1 : 96-104, 142-152 et 245-251
- VP2 : 72-75 et 240-244
- VP3 : 75-81 et 196-206.

Les boucles exposées des trois protéines sont toutes localisées sur la même région topographique de la structure spatiale.

La structure tridimensionnelle de la capside présente de grandes protubérances qui semblent former un canyon. Rossman (Nature, 1985) a émis l'hypothèse que cette structure permettrait au virus

d'échapper à la surveillance immunitaire. Les dimensions (profondeur 25 Å, diamètre 12-30 Å) empêcheraient la pénétration des anticorps (diamètres 35 Å) et la reconnaissance par ces derniers des résidus situés à sa base. Par contre, un récepteur cellulaire de taille plus petite pourrait y pénétrer et s'y fixer au fond. Ce phénomène permettrait, d'une part une spécificité du récepteur, et d'autre part l'évolution de nouveaux sérotypes par mutation des résidus à la périphérie du canyon.

## 2.2. Propriétés immunologiques

La séquence polypeptidique de la souche Mahoney (type 1), a été déduite de la séquence nucléotidique (Racaniello et Baltimore, 1981 - Kitamura, 1981).

La protéine VP1 a fait l'objet de nombreuses études. Les anticorps monoclonaux dirigés contre le virus ont permis à Minor (1983) et Evans (1983) de localiser un site antigénique de neutralisation sur la protéine VP1 du poliovirus type 3. Emini (1983 - 1984) a utilisé des anticorps anti-peptides pour identifier plusieurs sites de neutralisation du poliovirus type 1. Un des épitopes de la protéine VP1 type 1 a aussi été identifié de manière originale par Van der Werf (1983), qui put générer des délétions de longueur variable à l'intérieur de la protéine VP1 et observer la réactivité de cette protéine transformée vis à vis d'un anticorps monoclonal.

Lorsque nous avons entrepris l'étude du virus de la poliomyélite, aucun site antigénique de la protéine VP2 n'était découvert. Pourtant, l'immunogénicité de la protéine isolée VP2 avait été démontrée.

### 2.3. Choix des peptides

Nous avons utilisé les différentes méthodes de choix, décrites précédemment, pour sélectionner les séquences exposées susceptibles d'être impliquées au cours d'une réponse immunitaire.

#### 2.3.1. Critères structuraux

La protéine VP2 du poliovirus type 1 a été étudiée au travers de nos critères de sélection, à savoir :

- hydrophilie,
- acrophilie,
- exposition à la surface (paramètres de Chothia et ceux de Janin),
- mobilité (paramètres de Ponnuswamy et ceux de Karplus),
- prédiction de coudes  $\beta$  (paramètres de Chou et Fasman et ceux de Garnier),
- faible interaction moléculaire (dédit des paramètres de Fraga).

Afin de mieux visualiser les zones détectées, les résultats des différents programmes ont été représentés sous forme de graphiques (fig 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 et 2.9). Les pics intéressants sont repérés beaucoup plus facilement.

Les résultats ont été rassemblés dans le tableau 2.8. Bien que le programme informatique permette de faire visualiser les dix meilleurs pics, nous avons limité notre étude aux cinq meilleurs pics étant donnée la relative petite taille de la protéine (271 acides aminés).

Pic	hydrophilie	acrophilie	Chothia	Janin	mobilité	flexibilité	Fraga
1	43-48	150-156	162-167	162-167	150-155	167-172	212-217
2	72-77	134-139	71-76	71-76	240-245	243-249	60-65
3	240-245	162-167	51-56	51-56	51-56	137-143	191-196
4	83-88	240-245	43-48	43-48	169-174	54-60	54-59
5	149-154	44-49	240-245	39-44	72-77	21-27	153-158

Tableau 2.8 : sélection d'hexapeptides

Janin : exposition moyenne théorique : 0,5787  
 exposition moyenne calculée : 0,5793

L'étude détaillée de ces résultats permet de tirer les observations suivantes :

- Les programmes "Chothia" et "Janin" présentent une similitude frappante : les quatre premières zones détectées sont identiques,
- la corrélation entre surface exposée théorique et calculée

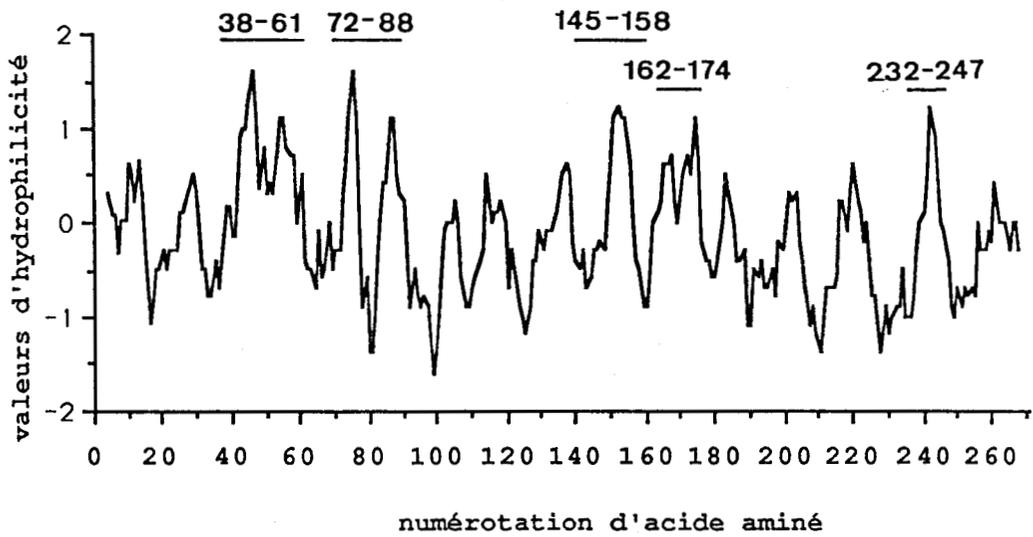


Figure 2.2: profil d'hydrophilie selon les paramètres de Hopp et Wood

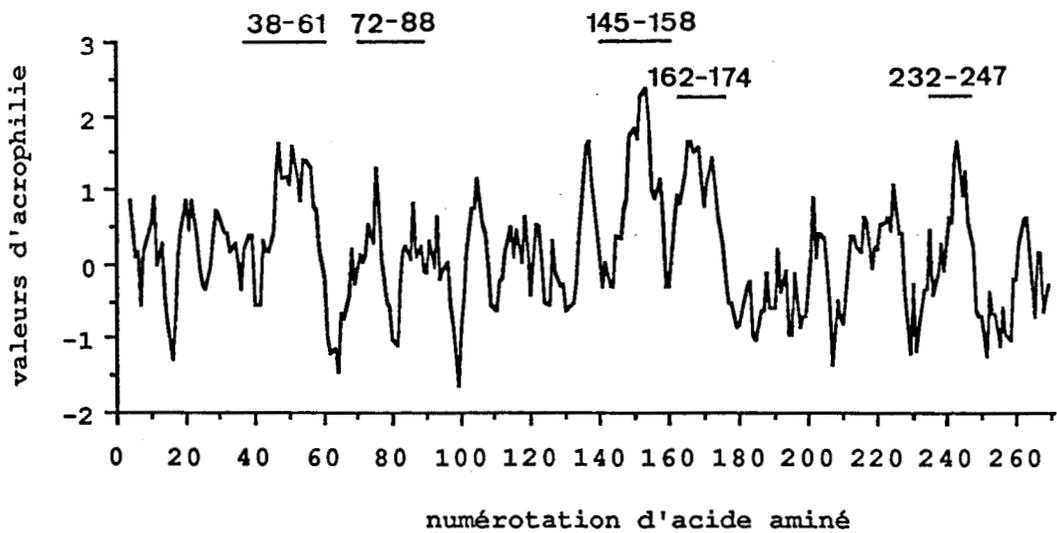


Figure 2.3: profil d'acrophilie selon les paramètres de Hopp

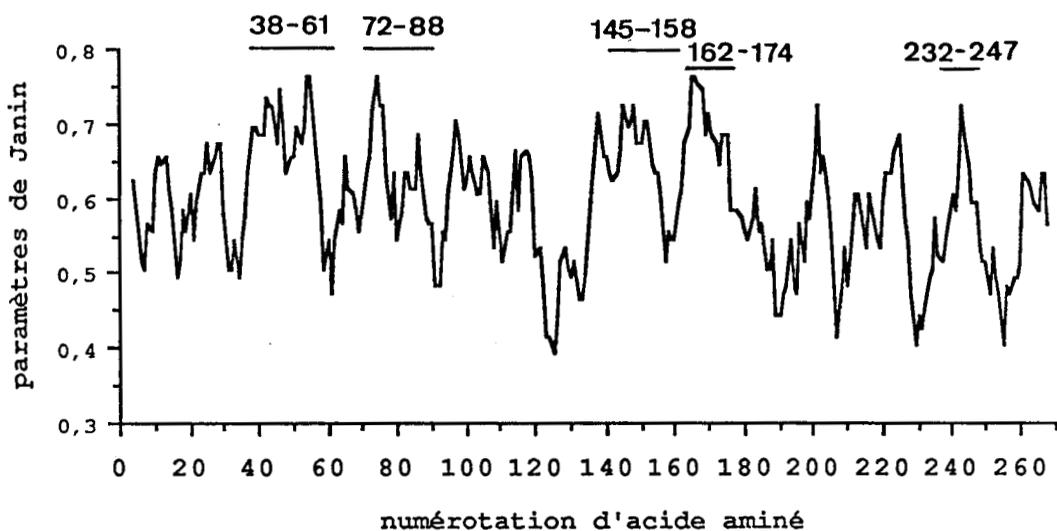


Figure 2.4: profil d'exposition à la surface selon les paramètres de Janin

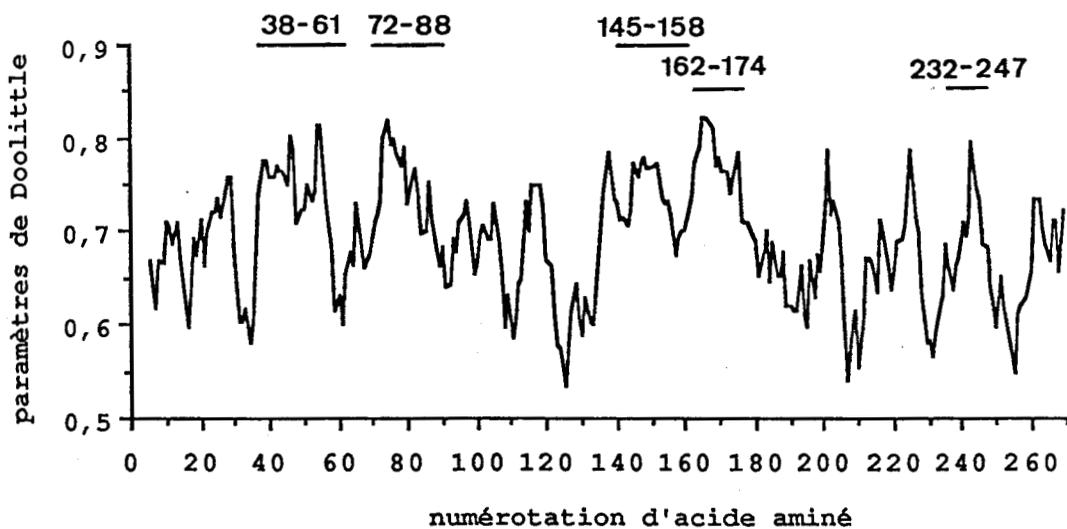


Figure 2.5: profil d'exposition à la surface selon les paramètres de Chothia

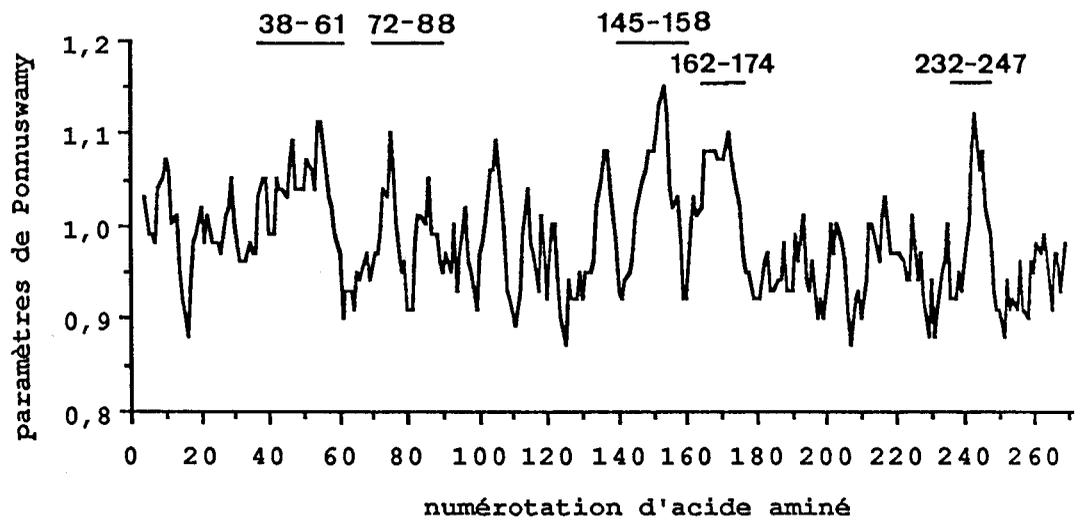


Figure 2.6: profil de mobilité selon les paramètres de Ponnuswamy

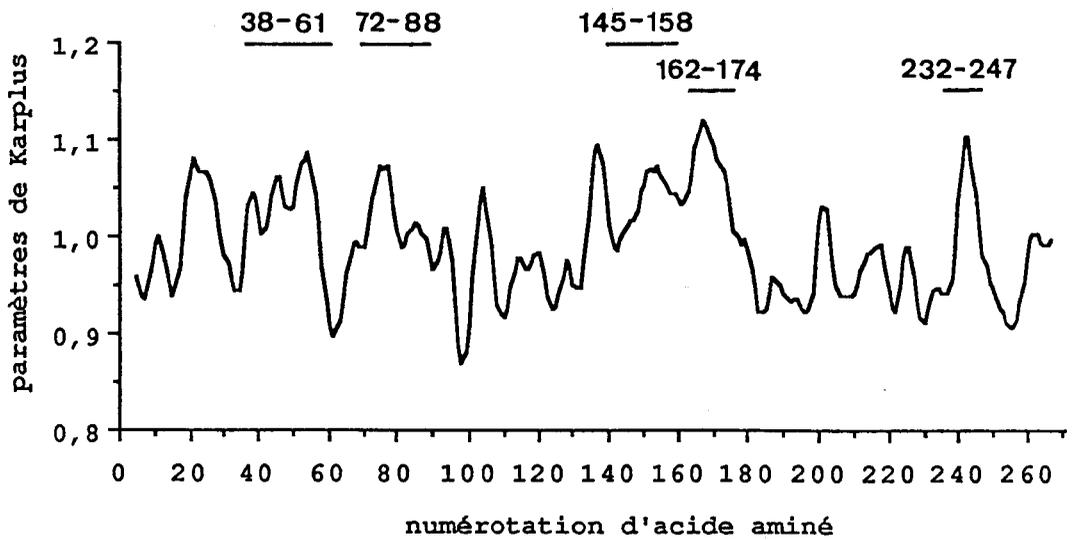


Figure 2.7: profil de mobilité selon les paramètres de Karplus

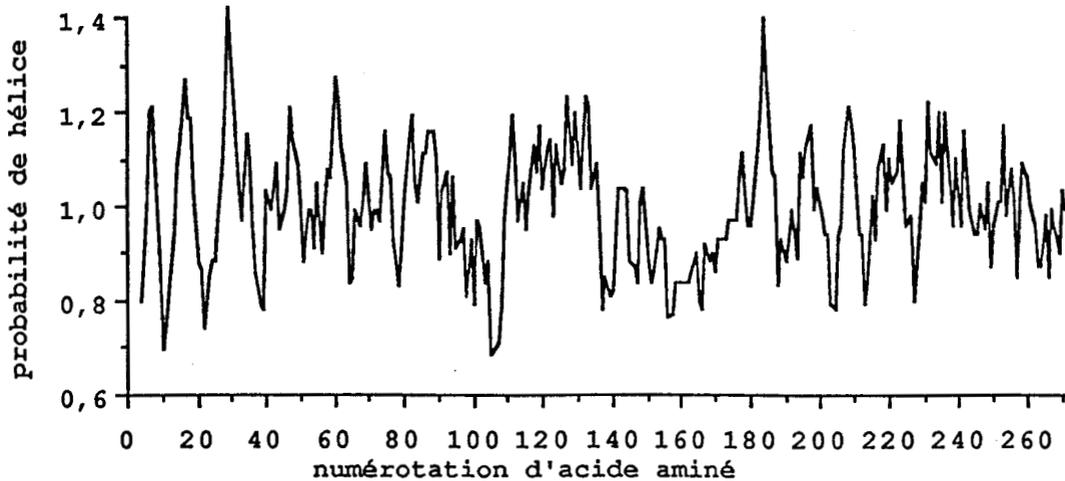
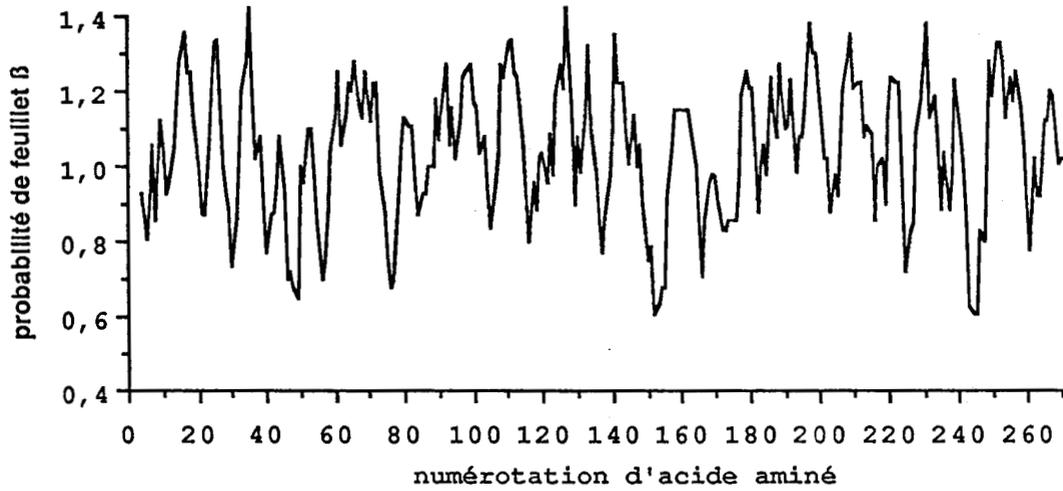
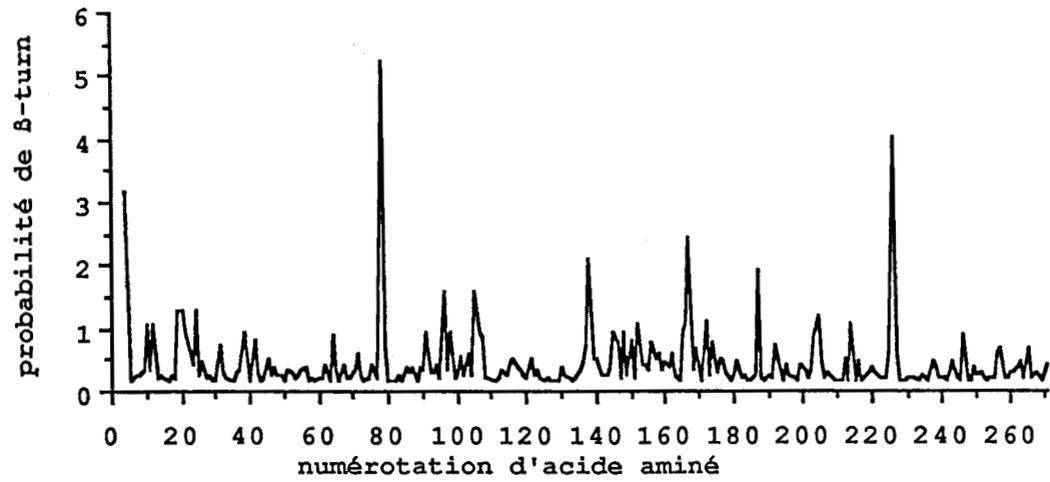
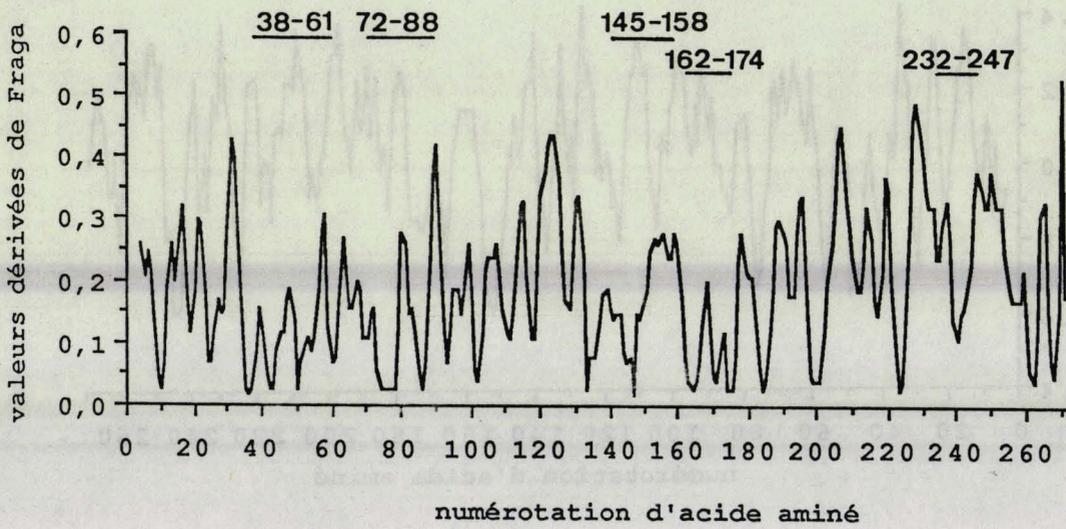


Figure 2.8: prédictions conformationnelles selon les paramètres de Chou et Fasman



**Figure 2.9: profil d'hydrophilie selon les paramètres de Fraga**

est très étroite. Cette bonne concordance témoigne d'une organisation globulaire et accrédite alors les programmes établis selon les paramètres de Chothia et Janin (définis à partir de protéines globulaires),

- le programme "acrophilie" se différencie de celui de Hopp et Wood. Sur cinq peptides reconnus par Hopp et Wood, trois sont acrophiles,
- cinq zones identiques sont repérées par les différents programmes, mais dans un ordre différent, à l'exception du peptide 134-139 qui est reconnu uniquement par le programme "acrophilie",
- le programme "Fraga" donne des résultats, nettement différents des autres. Aussi nous avons préféré ne pas en tenir compte.

Le Dr. Hélène Gras (1985) a démontré l'efficacité des méthodes de choix si une même zone est reconnue par trois séries de critères. Les cinq peptides sélectionnés sont reconnus par trois ou plus critères différents. Nous avons reporté dans le tableau 2.9 la fréquence de reconnaissance des peptides par nos différents critères de sélection. Il est à souligner que différentes séquences d'un même peptide sont reconnues par la même méthode (peptides 38-61 et 72-88).

SPNIEACGYSDRVLQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGRWPEYLRDSEANPVDQTEPDVAACRFY

38-61

TLDTVSWTKE SRGWWWKLPDALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQCNASKFHQGALGVFAVPE

72-88

MCLAGDSNTTTMHTSYONANPGEKGGTFTGTFTPDNNOTSPARSSARWITSLEMARCWGMPLC

145-158

162-174

SAGIINLRTNNCATLVLPYVNSLSLDSMVKHNHWGIAAILPLAPLNFVSESSPEIPITLTIAPMCC

232-247

EFNGLRNITLPRLO

Tableau 2.10 : Séquence de la protéine VP2 du poliovirus type 1

(souche Mahoney)

	Hopp	acrophilie	Chothia	Janin	mobilité	flexibilité
38-61	+	+	++	+++	++	+
72-88	++		+	+	+	
145-158	+	+			+	
162-174		+	+	+	+	+
232-247	+	+	+		+	+

Tableau 2.9 : fréquence de reconnaissance des peptides

L'ensemble de ces critères nous a guidée pour sélectionner cinq peptides dont la séquence est détaillée ci-après ainsi que dans le tableau 2.10:

38-61 : NH<sub>2</sub>-W-P-E-Y-L-R-D-S-E-A-N-P-V-D-Q-P-T-E-P-D-V-A-A-C-OH  
 72-88 : NH<sub>2</sub>-T-K-E-S-R-G-W-W-W-K-L-P-D-A-L-R-D-OH  
 145-158 : NH<sub>2</sub>-Y-Q-N-A-N-P-G-E-K-G-G-T-F-T-OH  
 162-174 : NH<sub>2</sub>-T-P-D-N-N-Q-T-S-P-A-R-S-S-OH  
 232-247 : NH<sub>2</sub>-P-L-A-P-L-N-F-V-S-E-S-S-P-E-I-P-OH

Tableau 2.10: peptides sélectionnés

Le peptide (162-174) sélectionné, est très voisin du peptide d'Emini (T-P-D-N-N-Q-T-S-P-A-R-R) qui a été publié sous une numérotation différente de celle de Kitamura. Emini a choisi ce peptide d'après des paramètres d'hydrophilie, et d'hyper-variabilité entre les trois types antigéniques.

L'étude de la structure primaire nous a également permis d'influencer notre choix. Nous avons accordé une importance spéciale à l'enchaînement de trois tryptophanes qui se trouvent insérés au milieu de la zone 72-88. En effet, nous pensions que cet enchaînement pouvait, en raison de la relative rareté du tryptophane, présenter un caractère inhabituel, et aurait alors une signification particulière au niveau du système immunitaire. D'après l'hypothèse de Kourilsky (1986), une protéine serait reconnue étrangère si l'un des peptides qu'elle présente ne faisait pas partie du "soi somatique".

#### 2.3.2. Localisation des peptides sélectionnés au niveau de la structure spatiale de la capsid

Lorsque la structure tridimensionnelle du poliovirus a été déterminée, nous avons pu localiser *a posteriori* les dix meilleurs hexapeptides sélectionnés par chacun de nos programmes. La structure de la protéine VP2 est effectivement globulaire, conformément à nos prévisions. Les figures 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.16, 2.17 et 2.18 mettent en évidence une remarquable correspondance des zones accessibles de la protéine VP2 avec les séquences hydrophiles, acrophiles, exposées à la surface, mobiles et possédant de fortes probabilités d'adopter une structure  $\beta$  ou hélicoïdale. Les programmes, à l'exception de celui de Fraga, révèlent une exposition au moins de 8 hexapeptides sur les 10 sélectionnés (7 sur 10 hexapeptides sélectionnés par la méthode de Karplus apparaissent exposés) au

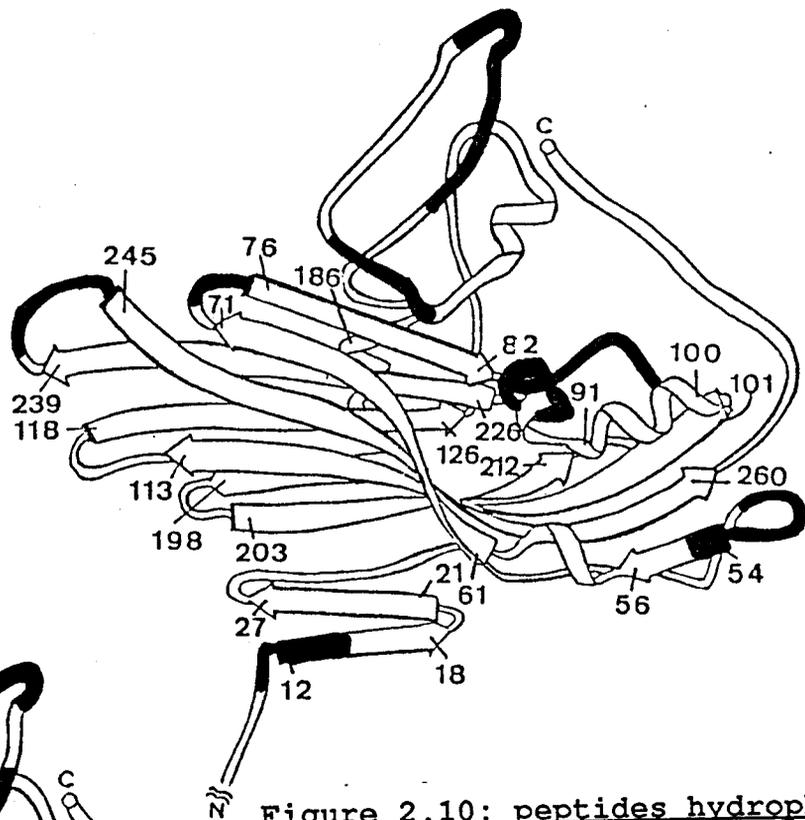


Figure 2.10: peptides hydrophobes sélectionnés selon les paramètres de Hopp et Wood

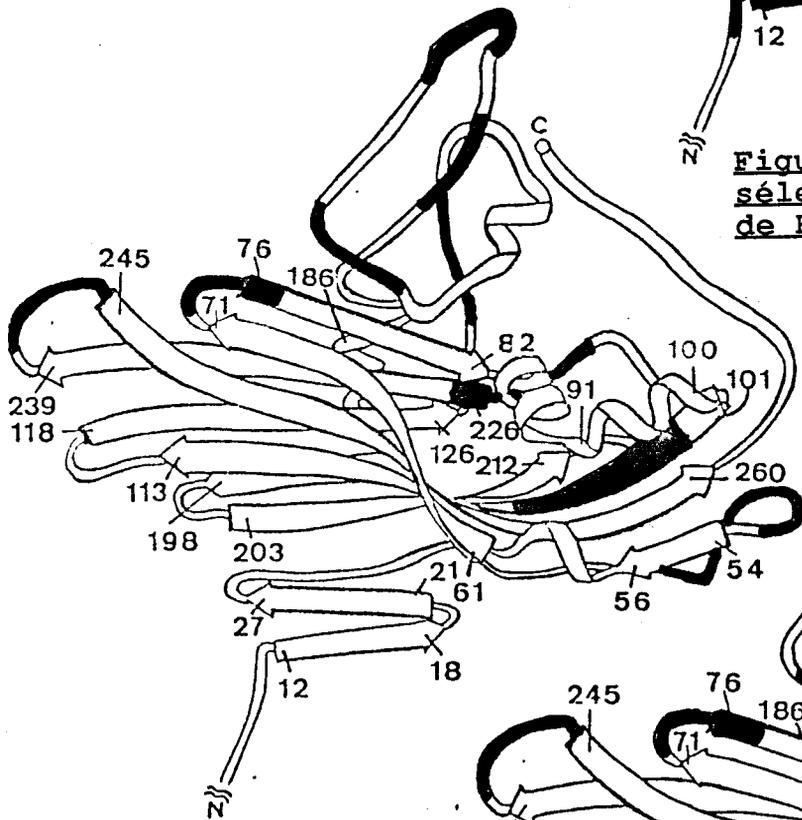


Figure 2.11: peptides acrophiles sélectionnés selon les paramètres de Hopp

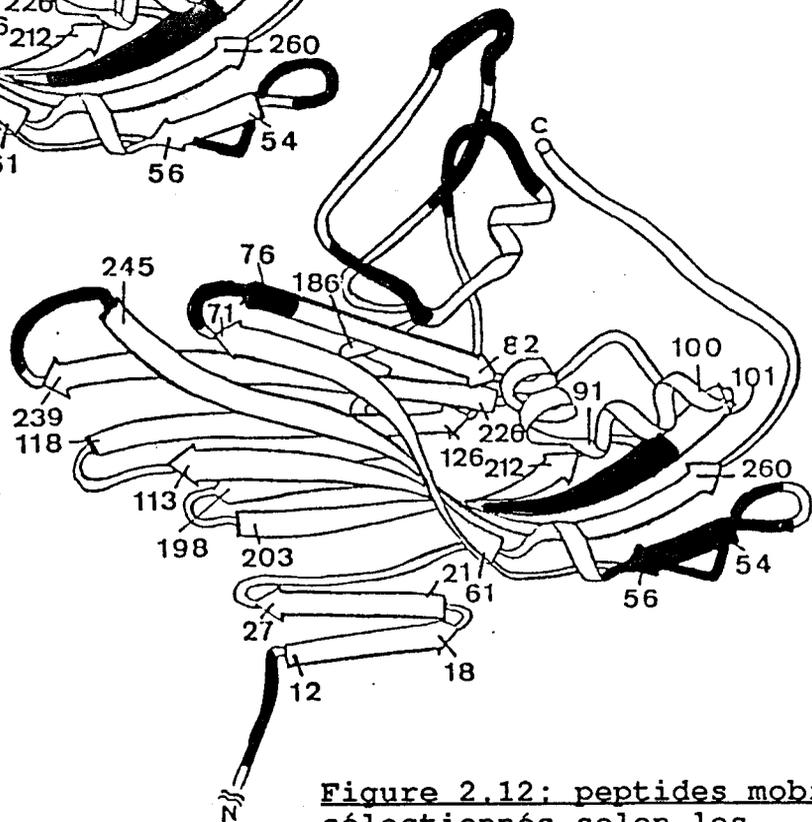


Figure 2.12: peptides mobiles sélectionnés selon les paramètres de Ponnuswamy

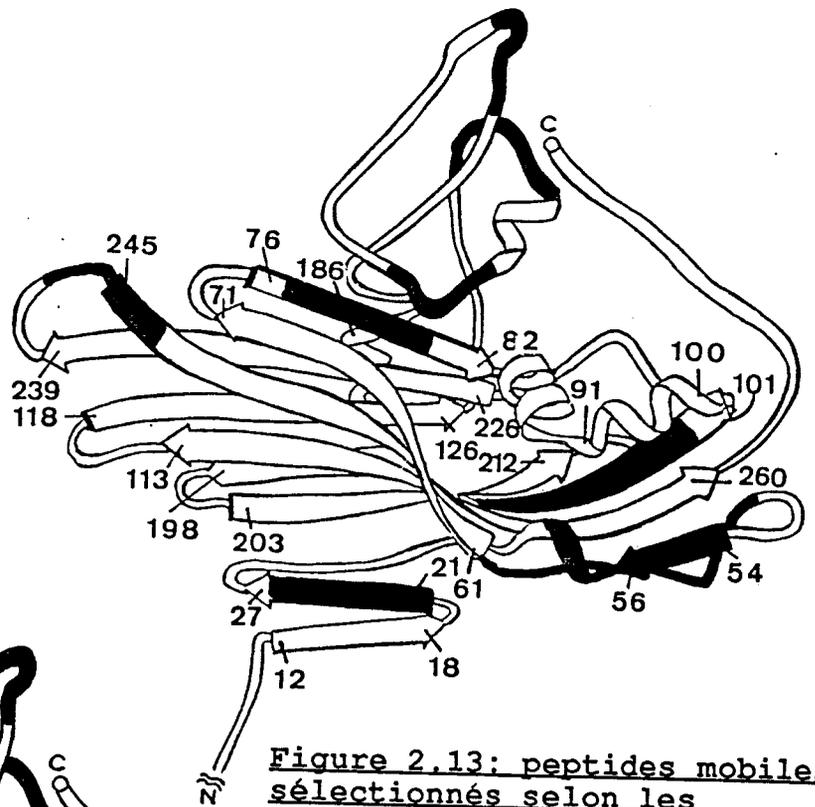


Figure 2.13: peptides mobiles sélectionnés selon les paramètres de Karplus

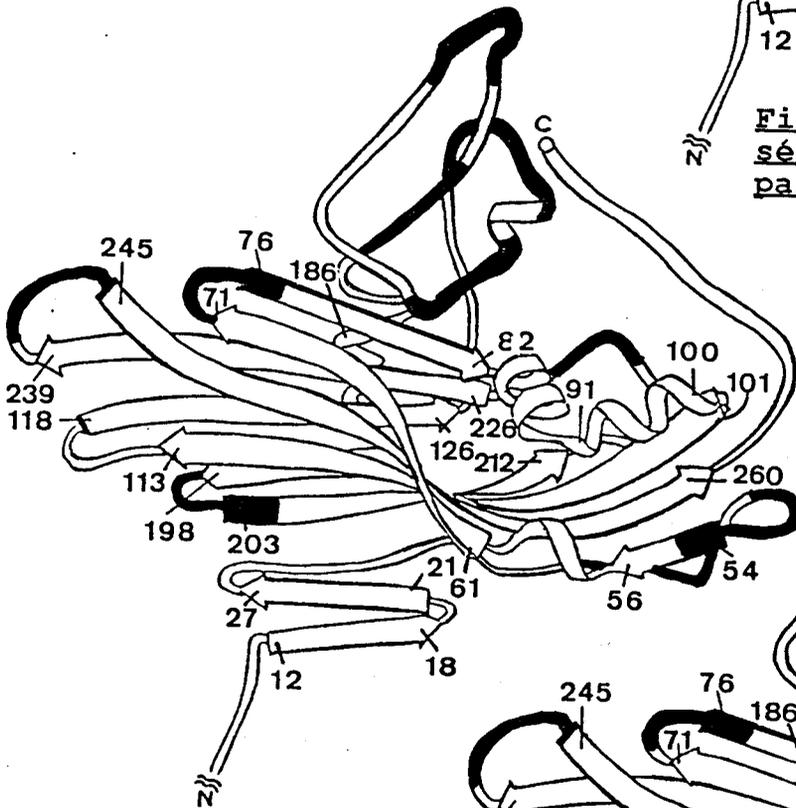


Figure 2.14: peptides sélectionnés selon les paramètres de Chothia

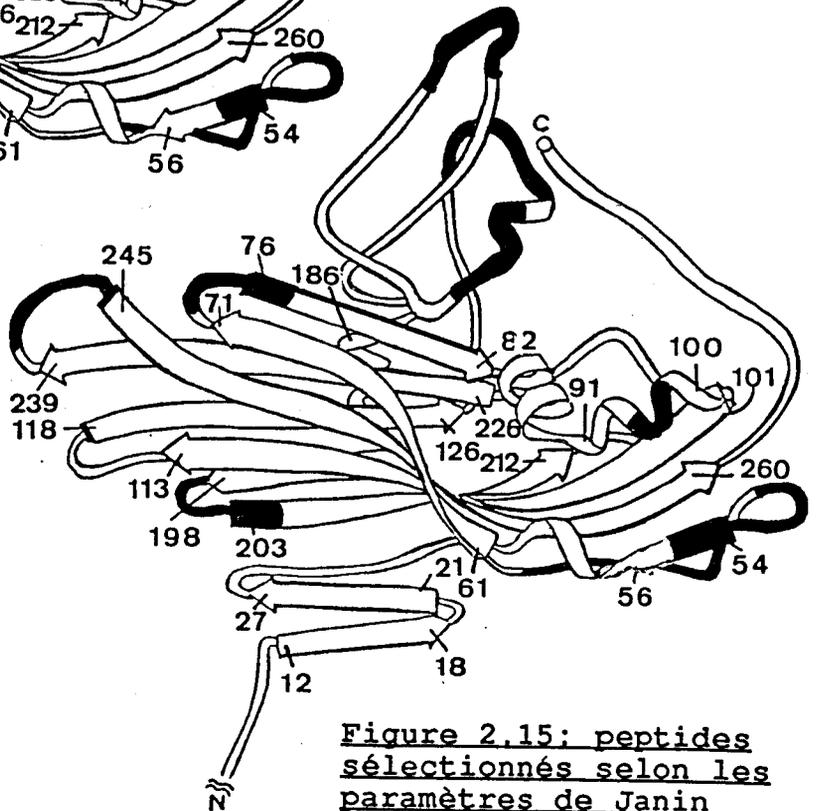


Figure 2.15: peptides sélectionnés selon les paramètres de Janin

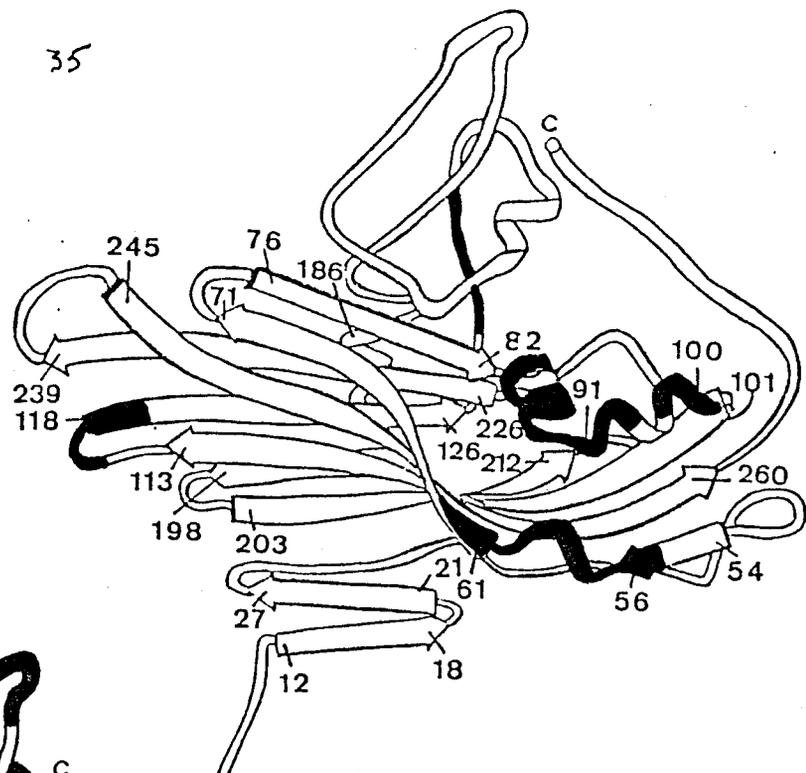


Figure 2.16: peptides hydrophobes sélectionnés selon les paramètres de Fraga

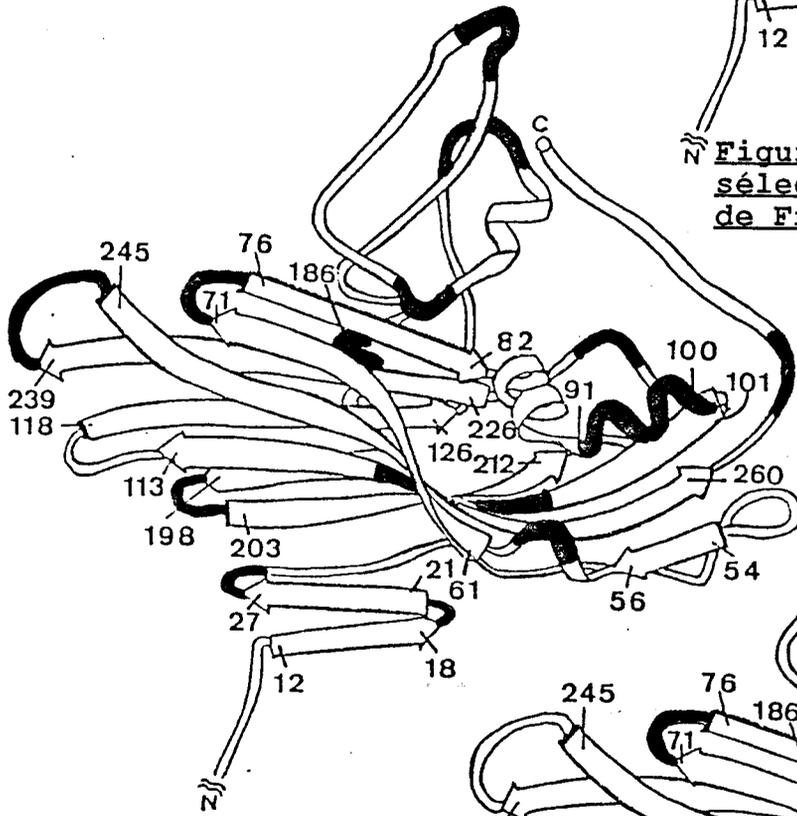


Figure 2.17: coudes  $\beta$  prédits par Chou et Fasman

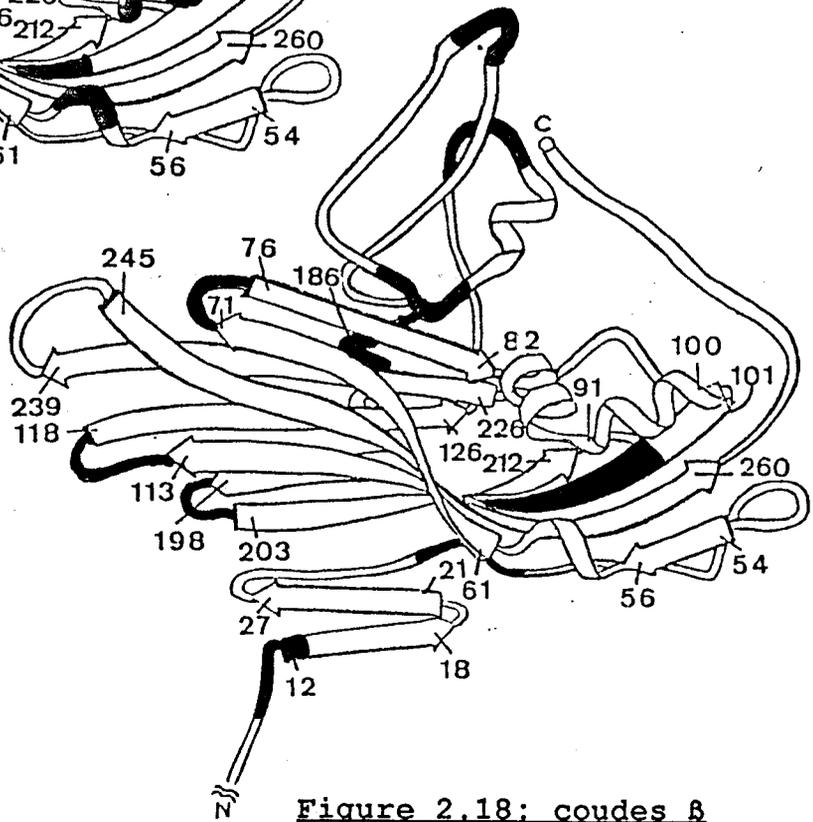


Figure 2.18: coudes  $\beta$  prédits par Garnier

niveau de la protéine VP2 considérée isolément.

Les figures 2.10, 2.11, 2.12, 2.13 et 2.14 présentent une grande similitude entre elles, à l'inverse de la figure 2.15. En effet, les zones repérées selon les critères de Fraga correspondent, sur cette figure, à une large majorité de zones enfouies. Seulement 3 sur 10 des hexapeptides sont exposés à la surface de la protéine. Un enseignement intéressant, tiré de la comparaison des figures 2.12 et 2.13, permet de comparer les critères de Ponnuswamy et ceux de Karplus. Les paramètres de Ponnuswamy, permettent de localiser les zones exposées avec plus de succès (8 zones sur 10) que le programme de Karplus (7 zones sur 10). Nous avons attribué à la différence d'origine des critères la meilleure efficacité de la méthode de Ponnuswamy. Cependant, quelle que soit la méthode employée, il nous est impossible de vérifier la mobilité prédite, si nous ne connaissons pas les facteurs de température. Nous pouvons seulement contrôler l'accessibilité de la protéine étudiée.

Nous avons également comparé les prédictions conformationnelles de Chou et Fasman d'une part et celles de Garnier d'autre part. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 2.11.

peptide	Chou et Fasman	Garnier
38-61	structure aléatoire	coude $\beta$ (faible probabilité)
72-88	structure aléatoire (entre 2 coudes $\beta$ )	coude $\beta$
145-158	structure aléatoire (très faible probabilité de coude $\beta$ )	coude $\beta$
162-174	coude $\beta$ (forte probabilité)	coude $\beta$
232-247	structure aléatoire	"random coil"

Tableau 2.11: prédictions conformationnelles

Les conformations prédites pour les cinq peptides sont soit des structures de coudes  $\beta$ , soit des structures aléatoires ou "random coil". Les structures de coudes  $\beta$ , qui ont une forte probabilité d'exister, sont unanimement reconnues à la fois par Chou et Fasman ainsi que Garnier. Par contre, les structures de coudes  $\beta$ , possédant une faible probabilité d'exister d'après les critères de Garnier, ne sont pas identifiées par Chou et Fasman, qui prédisent des structures aléatoires.

Ne disposant pas des coordonnées tridimensionnelles de la protéine, nous sommes bien conscientes que les figures 2.17 et 2.18 seules ne permettent pas de mettre en évidence les structures de coude  $\beta$  prédites respectivement par Chou et Fasman d'une part, et Garnier d'autre part. En effet, les coudes  $\beta$  sont des structures bien caractérisées par leurs angles de torsion, leurs longueurs de liaison. Nous pouvons par contre apprécier

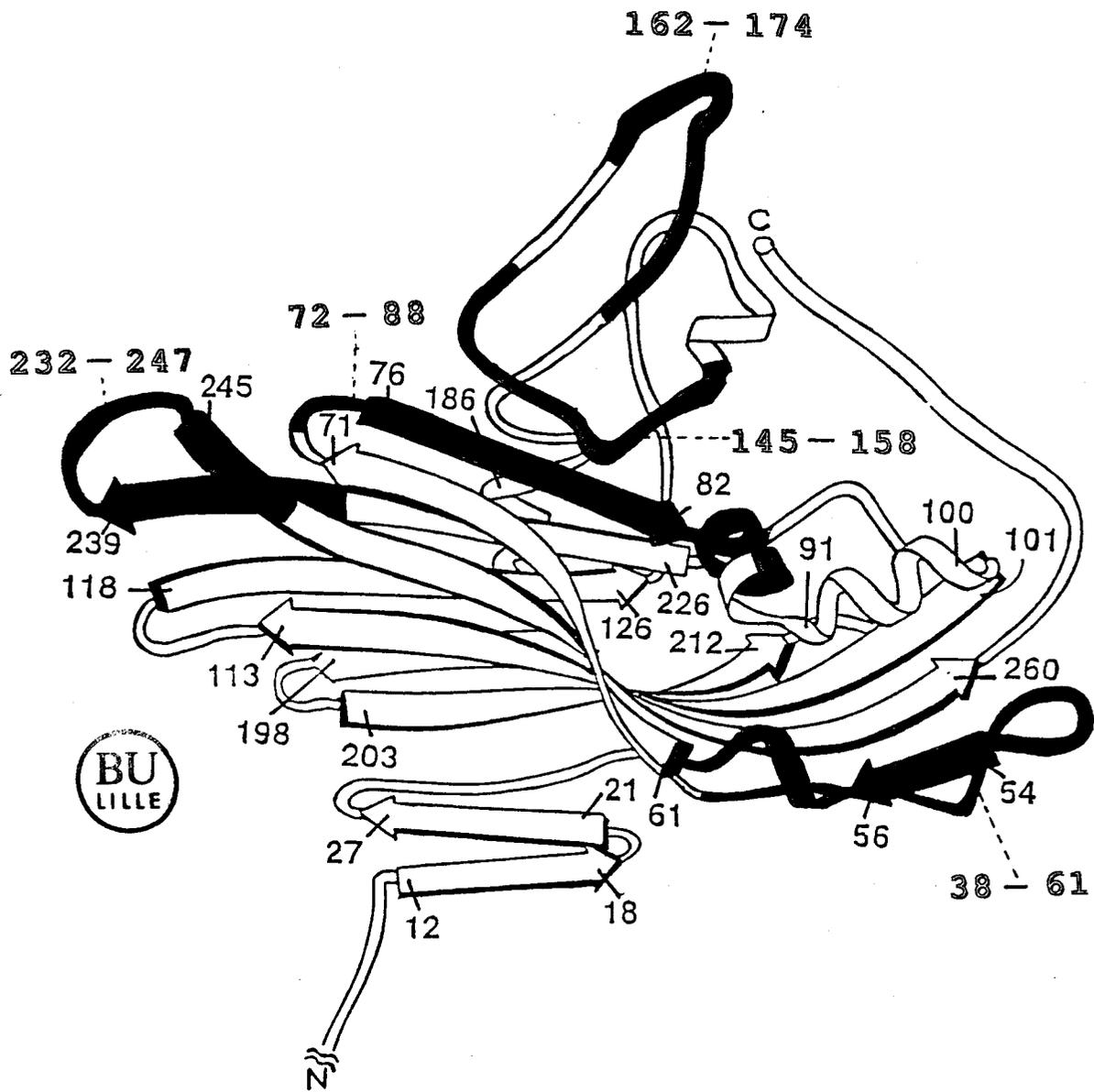


Figure 2.19: peptides sélectionnés selon nos méthodes de choix

leur exposition sur la protéine et repérer les zones en repli qui sont exposées et qui correspondent à une structure plus générale de boucle.

Dix coudes  $\beta$  sur quatorze prédits par Chou et Fasman, ainsi que 8 coudes  $\beta$  sur onze repérés par Garnier correspondent à des boucles qui apparaissent à la surface de la protéine isolée. Par contre, le programme de Chou et Fasman ne signale pas les boucles 45-54 et 113-118. tandis que la méthode de Garnier ne détecte pas les boucles 45-54 et 239-245.

Enfin, nous avons repéré les cinq peptides que nous avons choisis (fig. 2.19). Si nous étudions la protéine VP2 isolée, c'est-à-dire hors de son environnement, quatre peptides apparaissent bien exposés. Les trois peptides 38-61, 162-174 et 232-247 correspondent à des régions très bien exposées. De même le peptide 145-158 apparaît accessible. Par contre, l'extrémité C-terminale du peptide 72-88 apparaît totalement enfouie au sein de la protéine, alors que l'extrémité N-terminale est exposée. Ce peptide aura donc moins de chance d'être reconnu par le système immunitaire.

Mais si nous replaçons la protéine VP2 dans son contexte de capsid, le peptide 38-61 se révèle en fait enfoui puisque l'extrémité N-terminale est proche de l'ARN messager. Seules les boucles correspondant aux résidus 72-75 et 240-244 apparaissent exposées à l'extérieur de la protéine.

Il ne faut pas oublier que la protéine VP2 n'est pas isolée au sein de la capsid, mais qu'au contraire, elle est associée à d'autres protéines VP1, VP3 et VP4, ainsi qu'à l'acide ribonucléique messenger. Ce qui restreint le nombre de régions exposées et accessibles.

### 2.3.3. Recherche d'homologies

Nous avons également recherché l'existence d'homologies de séquence de la protéine VP2 avec les protéines des banques de données NBRF et GENPRO. Une seule protéine présente une importante homologie de séquence en acides aminés: le rhinovirus HRV 14; ce qui n'a rien de surprenant car le HRV 14 appartient à la même famille que celle du poliovirus.

Nous avons estimé le pourcentage d'homologies de la protéine VP2 de la souche Mahoney avec les autres souches et repéré les substitutions au sein de nos peptides sélectionnés (tableau 2.12).

Peptides/ souches	Lansing	Léon	Sabin type 1
38-61	2	4	0
72-88	2	2	0
145-158	3	4	0
162-174	5	8	1
232-247	4	6	0
% d'homologies de VP2 (Mahoney) avec les différentes souches	83,7	75,6	99,2

Tableau 2.12 : nombre d'acides aminés mutants de VP2 (Mahoney)

Toutes les substitutions de nucléotides ne se traduisent pas systématiquement par des modifications d'acides aminés. Ainsi l'atténuation de la souche Mahoney, qui permet d'obtenir la souche Sabin type 1 (Nomoto, 1982 - Stanway, 1983) a révélé sept points de mutation de nucléotides qui se traduisent par la substitution de seulement deux acides aminés suivants :

Position 166 : Asn est remplacé par Asp

Position 181 : Phe est remplacé par Leu

Au contraire du peptide 162-174 qui contient un acide aminé mutant, les peptides 38-61, 72-88 et 145-158 correspondent à des séquences, relativement conservées parmi les trois souches virulentes, également après multiples passages cellulaires, lors de l'atténuation de la souche virale. Cette conservation de la séquence nous amène à tirer deux types d'hypothèses:

- soit ces peptides ne correspondent pas à des zones de pression sélective, car ils n'appartiennent pas à des déterminants antigéniques dominants du virion. Ce qui n'exclut pas leur présence en surface dans des déterminants normalement pas exprimés.
- soit ces séquences sont impliquées dans la vie du virus et par conséquent, sont irremplaçables.

Par contre, les peptides 162-174 et 232-247 correspondent à des régions hyper-variables, où s'opèrent la plupart des substitutions. En particulier, le peptide 162-174 possède un point de mutation lors de l'atténuation de la souche Mahoney. L'inconvénient de sélectionner des fragments hypervariables est

de contraindre à préparer tous les mutants pour les associer dans un vaccin afin d'obtenir une protection la plus large possible.

Après avoir sélectionné cinq peptides, nous les avons synthétisés et purifiés.

## 2.4. Synthèses et purifications

### 2.4.1. Principe de la synthèse peptidique en phase solide

Les cinq peptides ont été synthétisés en phase solide selon la méthode développée par Merrifield (Merrifield 1963, Stewart 1984). Le principe de la synthèse peptidique en phase solide est d'ancrer le peptide par sa fonction carboxylique sur un support insoluble dans les solvants utilisés au cours de la synthèse. Les techniques de purification des étapes intermédiaires sont ainsi réduites à plusieurs opérations de lavages et filtrations qui sont suffisantes pour éliminer les excès de réactifs et sous-produits de réaction. Les acides aminés sont ajoutés un par un de manière récurrente de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale du peptide.

La synthèse peptidique en phase solide met en jeu plusieurs étapes:

#### **Fixation du premier tertio-butyloxycarbonyle-aminoacide**

Les peptides ont été ancrés sur une résine de polystyrène réticulé par 1% du divinylbenzène. Ce degré de réticulation a été

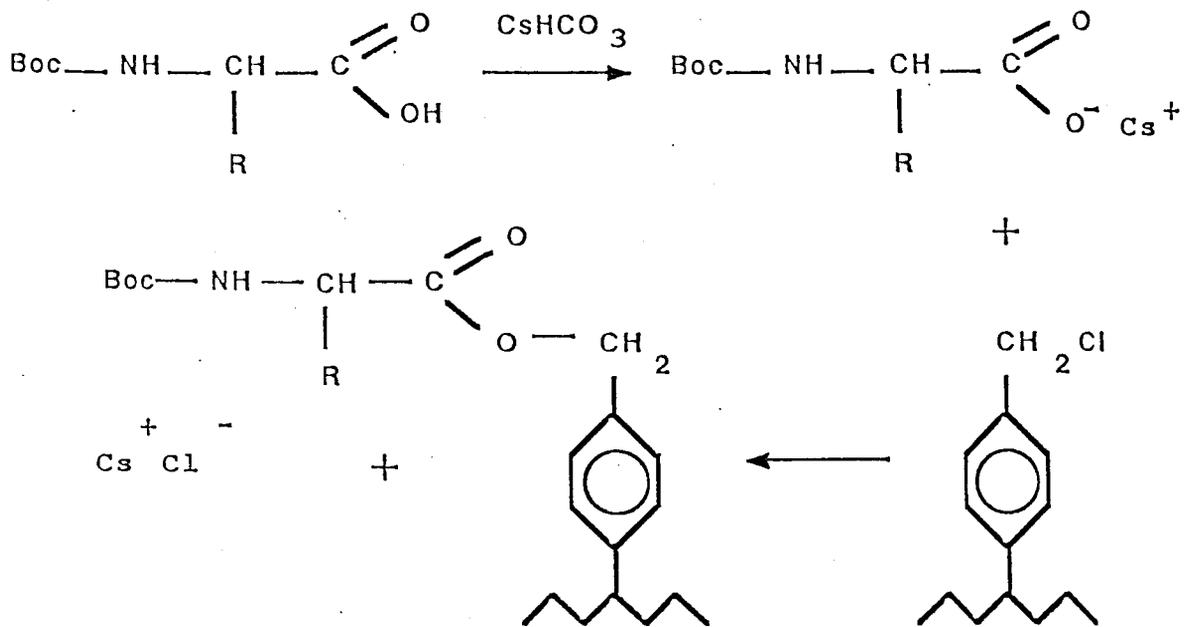


Figure 2.20: fixation du premier acide aminé sur la résine selon la méthode de Gisin

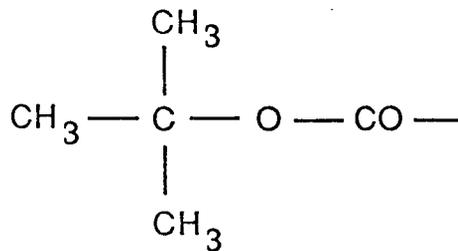


Figure 2.21: groupe tertio-butyloxy-carbonyle (Boc)

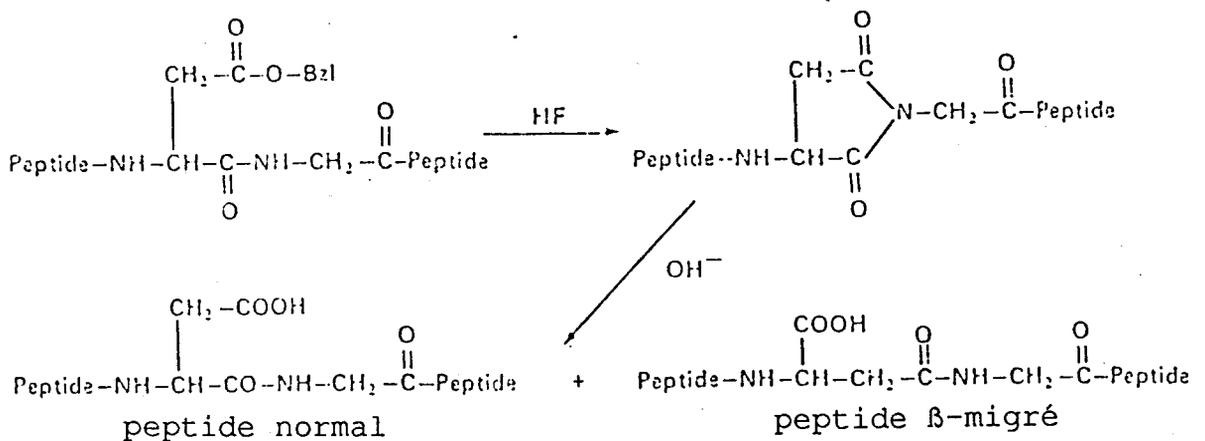


Figure 2.22: formation d'un peptide β-branché

choisi de manière à assurer un bon gonflement de la résine dans les solvants utilisés, tout en préservant les propriétés mécaniques compatibles avec la durée de la synthèse.

La fonctionnalisation de la résine par des groupements chlorométhylés permet la fixation de l'acide aminé au moyen d'une liaison ester benzylique, stable durant la synthèse et qui sera rompue à la fin de la synthèse par le fluorure d'hydrogène anhydre (HF). Le premier acide aminé a été fixé sur la résine chlorométhylée par substitution nucléophile type SN2 du groupement  $-CH_2Cl$  par l'ion carboxylate, amené sous forme de sel de césium selon la technique de Gisin (Gisin, R.B., 1973) (fig 2.20)

Les acides aminés incorporés un à un ont leur fonction amine N-terminale protégée par le groupement tertio-butyloxycarbonyle (Boc) au moment de leur addition (fig. 2.21). Les chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels qui risquent de réagir au cours de la synthèse ont été protégées par les groupes protecteurs suivants :

acide aminé	groupe protecteur	abréviations
arginine	tosyle	tos
acide aspartique	ester benzylique	O-Bzl
	cyclohexyle	c-hex
cystéine	acétamidométhyle	acm
acide glutamique	ester benzylique	O-Bzl
lysine	chloro-2-carbobenzoxo	Cl-Z
sérine	éther benzylique	O-Bzl
thréonine	éther benzylique	O-Bzl
tyrosine	2,6 dichlorobenzyle	2,6 diCl-Bzl

Certains groupes protecteurs ont été choisis pour les raisons

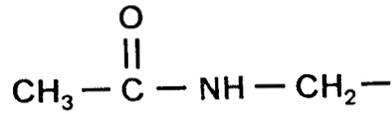


Figure 2.23: groupe acétamidométhyle (acm)

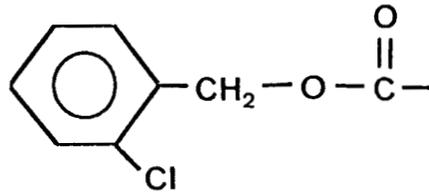


Figure 2.24: groupe 2-chlorobenzoyloxycarbonyle (Cl-Z)

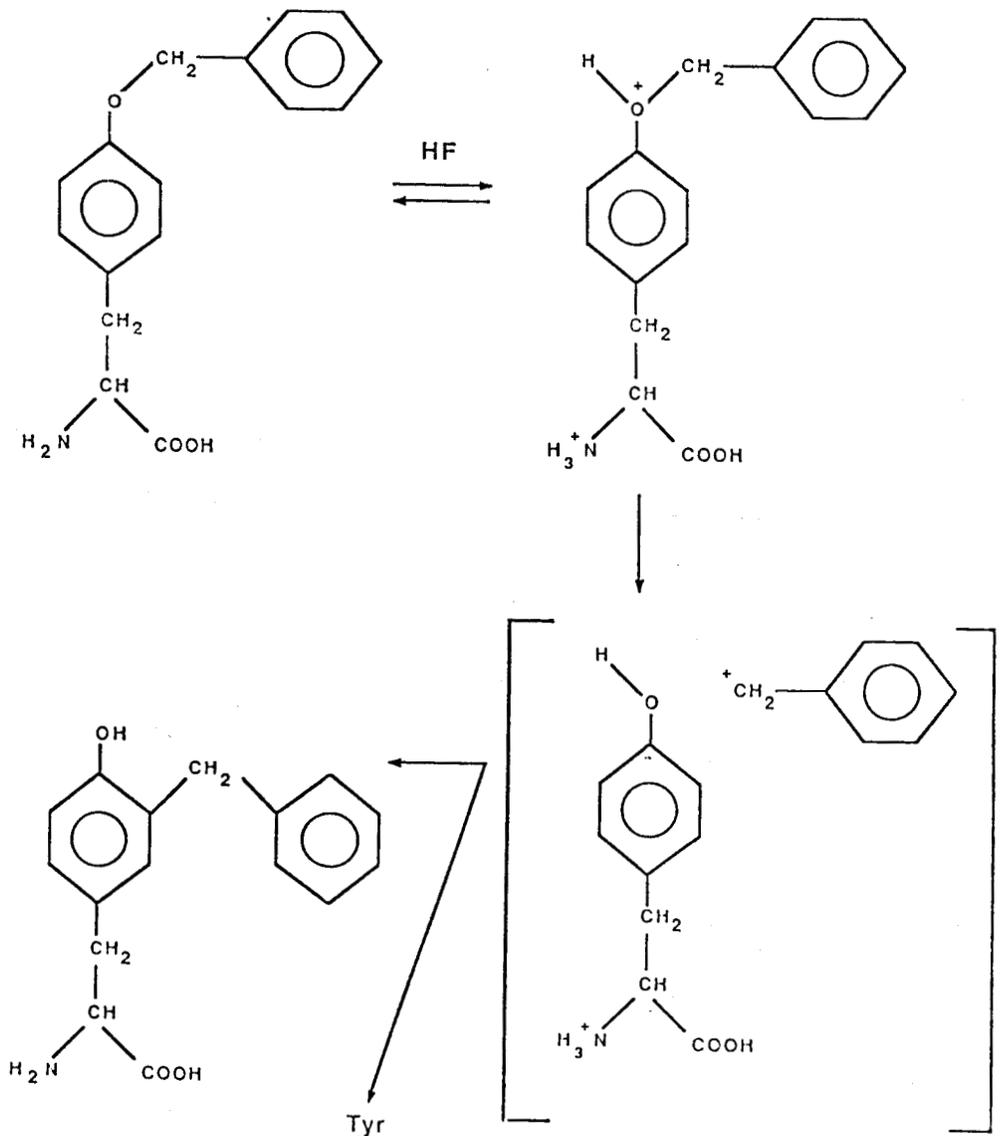


Figure 2.25: formation de la benzyle-3-tyrosine

suivantes:

- la fonction  $\beta$ -carboxylique de l'acide aspartique est classiquement protégée par un groupe ester benzylique. Cette protection est adaptée également pour les longues synthèses. Mais quand l'acide aspartique est suivi, selon l'ordre biologique, par une glycine ou une sérine, il peut se produire une  $\beta$ -migration, notamment lors de la déprotection finale. Dans ce cas, il y a formation d'une succinimide qui s'ouvre en présence d'eau ou de base diluée pour donner le peptide désiré ainsi que le  $\beta$ -migré (fig.2.22). Le groupe protecteur cyclohexyle permet d'éviter cette  $\beta$ -migration (Tam, 1979),
- le groupe acétamidométhyle (acm), protecteur de la chaîne latérale de la cystéine est une fonction stable (fig.2.23), qui résiste au fluorure d'hydrogène. Cependant une petite proportion est tout de même clivée. La déprotection de la cystéine pourra être obtenue par oxydation à l'iode ou action de l'acétate mercurique,
- le groupe benzyloxycarbone ou carbobenzoxy (Z), protecteur de la fonction amine  $\epsilon$  de la lysine résiste mal aux déprotections successives à l'acide trifluoroacétique. Nous avons préféré utiliser le dérivé 2-chlorobenzyloxycarbone (Cl-Z) (fig. 2.24), qui est 60 fois plus stable que le groupe Z à l'acide trifluoroacétique (Erikson, 1973). Nous avons limité l'emploi de la Boc-lysine(Z) seulement aux étapes de recouplage ou lorsque



la lysine à coupler était proche de l'extrémité N-terminale, et par conséquent, supportait un nombre restreint d'acidolyses.

- l'éther benzylique de tyrosine peut être clivé par l'acide trifluoroacétique. Lors de la coupure HF, le groupe benzyle migre rapidement en position 3 du noyau phénolique, le plus souvent par transposition intra-moléculaire (fig. 2.25). Le groupe 2-6 dichlorobenzyle, que nous avons employé est 5000 fois plus stable dans le TFA que le groupe benzyle et prévient la formation du (2,6 dichlorobenzyle)-3 tyrosine non désiré (Erikson, 1973, b).

### **Déprotection-neutralisation**

Après fixation du premier tertio-butyloxycarbonyle-aminoacide, le groupe protecteur Boc de la fonction  $\alpha$ -amine a été clivé par l'acide trifluoroacétique (40% dans le chlorure de méthylène  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : v/v). Puis avant l'élongation de la chaîne peptidique, sa fonction amine N-terminale est déprotonée par une base tertiaire, la diisopropyléthylamine (DIEA 5% dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : v/v)

Pour éviter l'alkylation du tryptophane par les carbocations libérés lors des acidolyses, les peptides 38-61 et 72-88 qui contiennent respectivement 1 et 3 tryptophanes, ont été déprotégés par la solution d'acide trifluoroacétique en présence d'éthane dithiol (2%) qui piège les carbocations.

### **Couplage**

Le couplage du deuxième acide aminé, dont la fonction amine est protégée, est obtenu en activant sa fonction carboxylique. Le réactif de couplage que nous avons utilisé est la dicyclohexylecarbodiimide (DCC). Un adjuvant de couplage, l'hydroxybenzotriazole (HOBT) est ajouté principalement pour éviter le réarrangement de l'O-acylurée réactive en N-acylurée inactive (fig. 2.26)

Les réactifs, Boc-amino-acides, HOBT et DCC ont été utilisés en excès (2,5 équivalents) par rapport à la charge de la résine, dans le chlorure de méthylène ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ou le diméthylformamide (DMF).

Pour éviter les réactions secondaires de l'asparagine et la glutamine (en particulier la déshydratation des chaînes latérales) nous avons préformé les esters d'HOBT, 10 minutes à  $0^\circ\text{C}$ , avant de les introduire dans le milieu réactionnel (Mojsov, 1980).

Nous avons également couplé en activant l'acide aminé à introduire sous forme d'anhydride symétrique au moyen de la dicyclohexylcarbodiimide. Un double excès de Boc-acide aminé a alors été mis en jeu.

Les synthèses ont été réalisées manuellement, dans des réacteurs en verre construits d'après le modèle de Merrifield, complétés par des tubulures et des vannes en téflon, ou dans des

synthétiseurs automatiques (Beckman 990 b - Applied Biosystem 430), ou semi-automatiques (synthétiseur conçu par le Docteur Escher au Canada , ou ceux mis au point dans notre laboratoire).

### **Contrôle de l'efficacité de couplage**

Le déroulement de la synthèse était contrôlé par le test coloré à la ninhydrine de Kaiser (E. Kaiser, 1970) qui révèle les fonctions amines primaires, ou par le test de Christensen (T. Christensen, 1979), indicateur des fonctions amines secondaires, après couplage sur une proline. Nous avons effectué ces tests après:

- déprotection de la peptidyl-résine pour vérifier la présence de fonctions amines libres,
- couplage: dans le cas où le test était positif, nous recommandons le couplage, ou nous bloquons définitivement les fonctions amines encore libres par acétylation à l'anhydride acétique 5% en présence de DIEA 2%.

### **Coupage de la liaison peptide-résine**

A la fin de la synthèse, le peptide a été libéré de la résine et déprotégé simultanément des groupes protecteurs (sauf la cystéine protégée par l'acm) par le fluorure d'hydrogène en présence de para-crésol ou d'anisole, qui piègent les carbocations provenant de l'acidolyse des groupes protecteurs. Nous avons ajouté également l'éthyl-méthyl-sulfure ou le diméthyl-sulfure lorsque les acides aminés fragiles (méthionine, tryptophane, tyrosine) étaient présents.

Les peptides libérés de la résine chlorométhylée possèdent une fonction carboxylique C-terminale. La technique en phase solide ne permet pas de purifier au cours de la synthèse; le produit attendu est libéré avec des peptides à délétions, tronqués, ou des peptides branchés ainsi que les sous-produits qui proviennent de réactions secondaires (ayant eu lieu au cours des couplages ou des déprotections). Il est impératif d'éliminer tous les contaminants.

#### 2.4.2. Techniques de purification

Pour obtenir un peptide pur et bien caractérisé, nous avons employé plusieurs méthodes de purification selon la nature du peptide synthétisé et des contaminants attendus.

##### 2.4.2.1. Gel-filtration

Cette technique permet de séparer les molécules selon leur masse moléculaire; les molécules les plus volumineuses étant éluées les premières.

C'est la première méthode de purification que nous utilisons systématiquement. La technique de gel-filtration peut être réduite à un simple dessalage du peptide à purifier. Nous avons utilisé des gels de dextran Sephadex G (Pharmacia), polyacrylamide Biogel P (Biorad), trisacryl GF 05 (IBF), ou

encore TSK (HW) 40 S (Merck) .

Dans l'optique d'une immunisation de laboratoire, il est généralement admis d'utiliser un peptide pur à 80%. Mais il est possible d'obtenir par gel-filtration des produits de pureté supérieure à 95%. Néanmoins, si nous envisageons un produit pour utilisation clinique, il est nécessaire de poursuivre la purification par d'autres techniques.

#### 2.4.2.2. Chromatographie de partage

Ce type de purification met en jeu la différence de polarité entre les différents produits à purifier. En présence d'un mélange de solvants organiques et aqueux, les peptides les moins polaires seront élués les premiers.

En fait, nous avons utilisé le gel de Sephadex LH 20 (Pharmacia) qui associe à la fois des propriétés de gel-filtration et des propriétés de chromatographie de partage.

#### 2.4.2.3. Chromatographie d'échange ionique

Le principe de ce type de purification est basé sur la différence de charges entre les peptides à purifier.

Selon la charge du peptide attendu, nous avons utilisé soit des

échangeurs de cations (diéthylaminoéthyle:DEAE,IBF), soit des échangeurs d'anions (trisacryl,IBF; carboxyméthylcellulose:CM 52, Whatman). Dans un premier temps, les peptides ionisés sont retenus sur le support, puis, dans un second temps, élués par un gradient de force ionique, ou un gradient de pH. Si nous avons pu obtenir des peptides de très grande pureté, c'est au détriment des rendements qui sont peu élevés.

#### 2.4.2.4 chromatographie de partage en phase inverse (moyenne pression

Nous avons utilisé des colonnes de silice greffées avec une phase apolaire en C18 (Partisil ODS M9 Whatman). L'élution a été réalisé avec des systèmes gradients: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH=2,5. Cette méthode permet d'obtenir des produits de très grande pureté, mais avec de faibles rendements.

#### 2.4.2.5. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

L'HPLC en phase inverse est réalisée sur des colonnes de silice dont les fonctions silanol sont greffées par des phases apolaires telles les chaînes carbonées C18, C8 ou C4. Les peptides sont élués selon un ordre de polarité décroissante, sous haute pression.

Nous avons élué par différents gradients du mélange acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique 1/1000, appropriés à chaque peptide selon sa polarité. Cette purification également conduit à des peptides de grande pureté, avec un faible rendement.

#### 2.4.3. Contrôles

Après purification, chaque produit fini est caractérisé en fonction de contrôles d'homogénéité et d'identité.

L'homogénéité est vérifiée par:

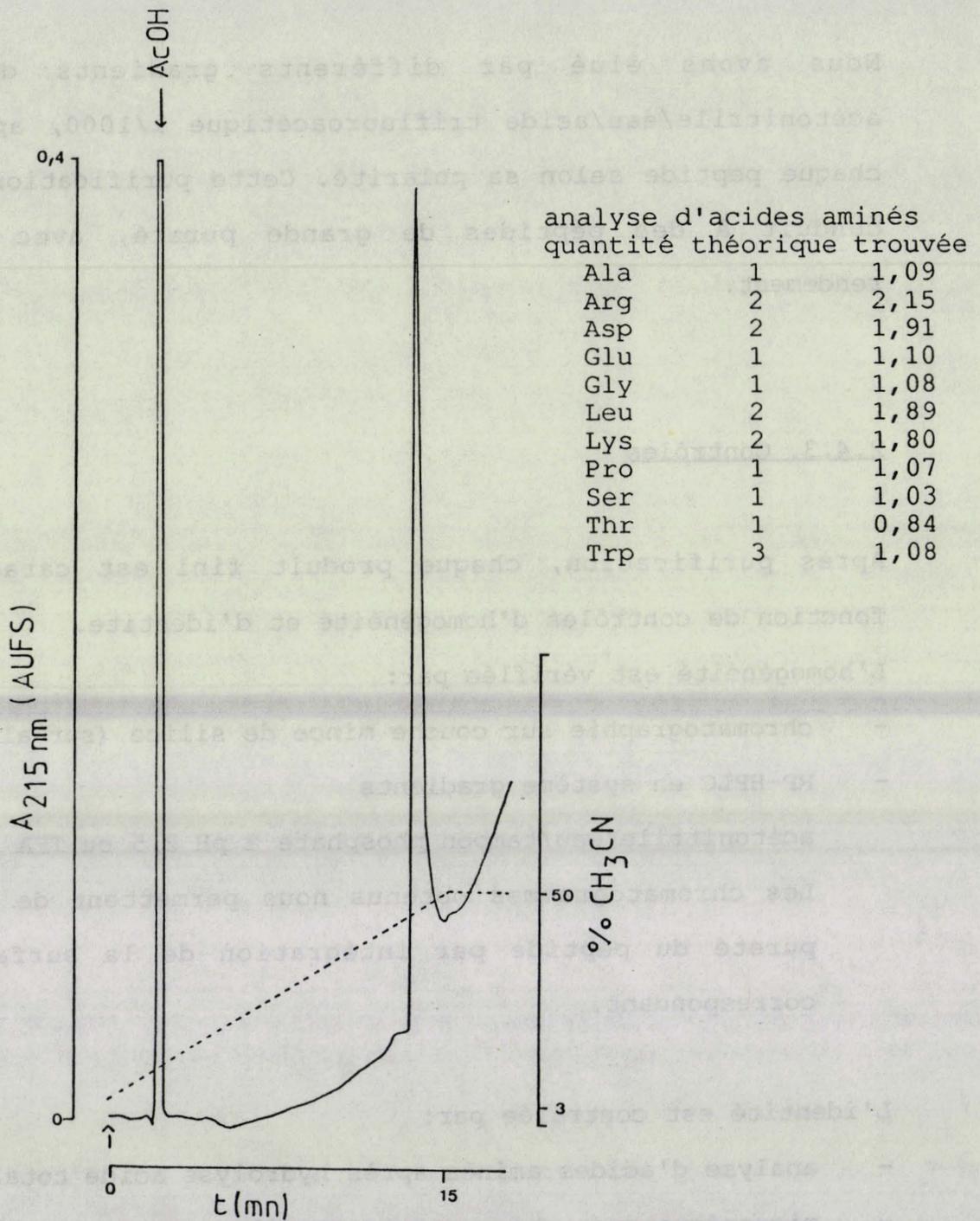
- chromatographie sur couche mince de silice (sur aluminium)
- RP-HPLC en système gradients  
acétonitrile/eau/tampon phosphate à pH 2,5 ou TFA 1/1000.

Les chromatogrammes obtenus nous permettent de déduire la pureté du peptide par intégration de la surface du pic correspondant.

L'identité est contrôlée par:

- analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale,
- microséquençage phase gaz éventuellement,
- spectroscopie de masse, FABS "fast atom bombardment spectroscopy".

#### 2.4.4. Obtention et caractérisation des peptides du VP2



RP-HPLC sur  $\mu$ -Bondapack C18 - Waters  
 débit = 2ml/mn,  
 phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

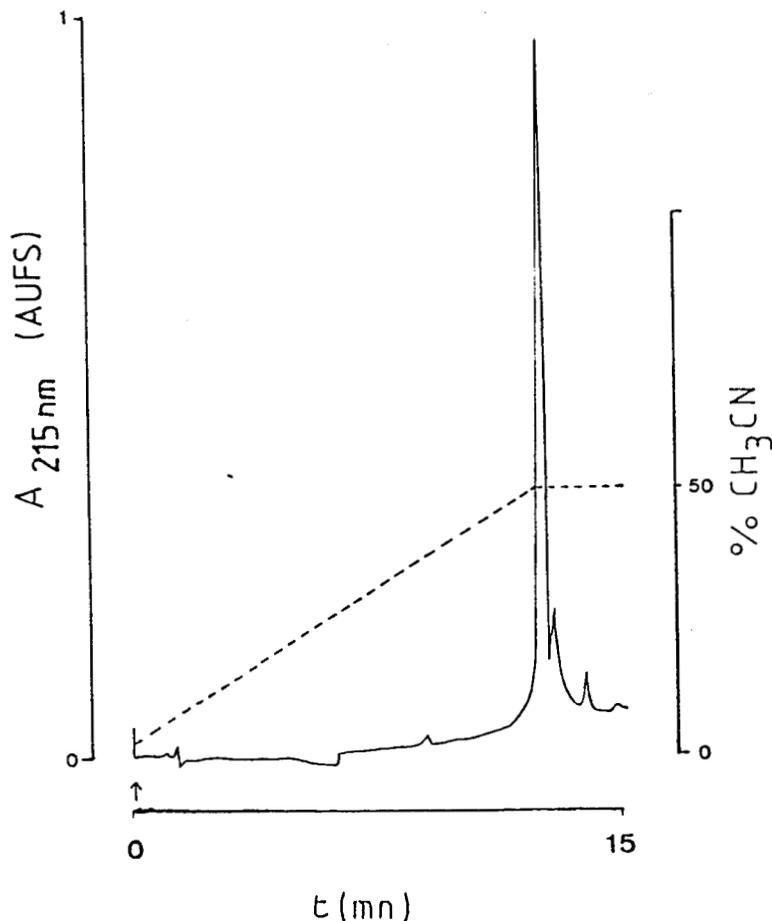
**Figure 2.27: caractérisation du peptide 72-88**

Nous avons synthétisé les cinq peptides selon la méthode précédemment décrite. Les peptides ont été ancrés sur une résine chlorométhylée, et synthétisés selon le protocole classique Boc/TFA. Après coupure au fluorure d'hydrogène, les peptides ont été purifiés par gel filtration, échange ionique, ou chromatographie de partage en phase inverse. Sans entrer dans le détail de la synthèse, (Cf Matériel et Méthodes), nous avons voulu souligner ici quelques points particuliers.

Le peptide 38-61 a été synthétisé sur résine substituée par la Boc-acm-cystéine. Après la coupure HF, nous n'avons pas déprotégé la chaîne latérale des résidus cystéinyles pour les raisons suivantes :

- la purification était plus simple car le peptide, après coupure HF se trouve uniquement sous la forme de monomère. Nous évitons ainsi la formation de dimères par ponts disulfures,
- l'acm ne semble pas gêner l'antigénicité ni l'immunogénicité au stade expérimental (Bellet- 1984).

Les peptides que nous avons obtenus ont un bon degré de pureté, en particulier le peptide 72-88 qui, malgré les trois tryptophanes contigus, présente une pureté de 98% après gel-filtration sur Biogel P2 fine. Son identité a été contrôlée par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale, et son homogénéité par RP-HPLC analytique et chromatographie sur couche mince (CCM) (fig. 2.27).



analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Ala	3	2,99
Arg	1	1,10
Asp	4	3,98
Cys	1	0,74
Glu	4	3,96
Leu	1	1,02
Pro	4	4,06
Ser	1	1,03
Thr	1	1,13
Tyr	1	0,90
Trp	1	-
Val	2	1,94

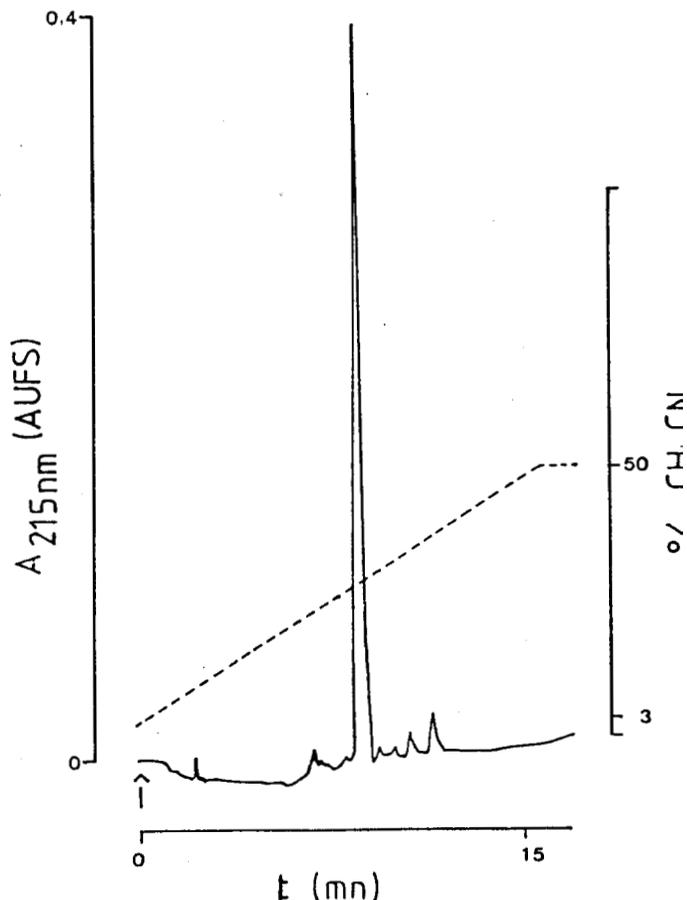
RP-HPLC sur spherisorb ODS2  
débit = 2ml/mn,  
phase mobile: eau/acétonitril  
tampon phosphate à pH = 2,5

**Figure 2.28: caractérisation du peptide 38-61**

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Ala	1	1,02
Asp	2	2,00
Glu	2	2,01
Gly	3	3,11
Lys	1	1,05
Phe	1	1,05
Pro	1	0,99
Thr	2	1,96
Tyr	1	0,76

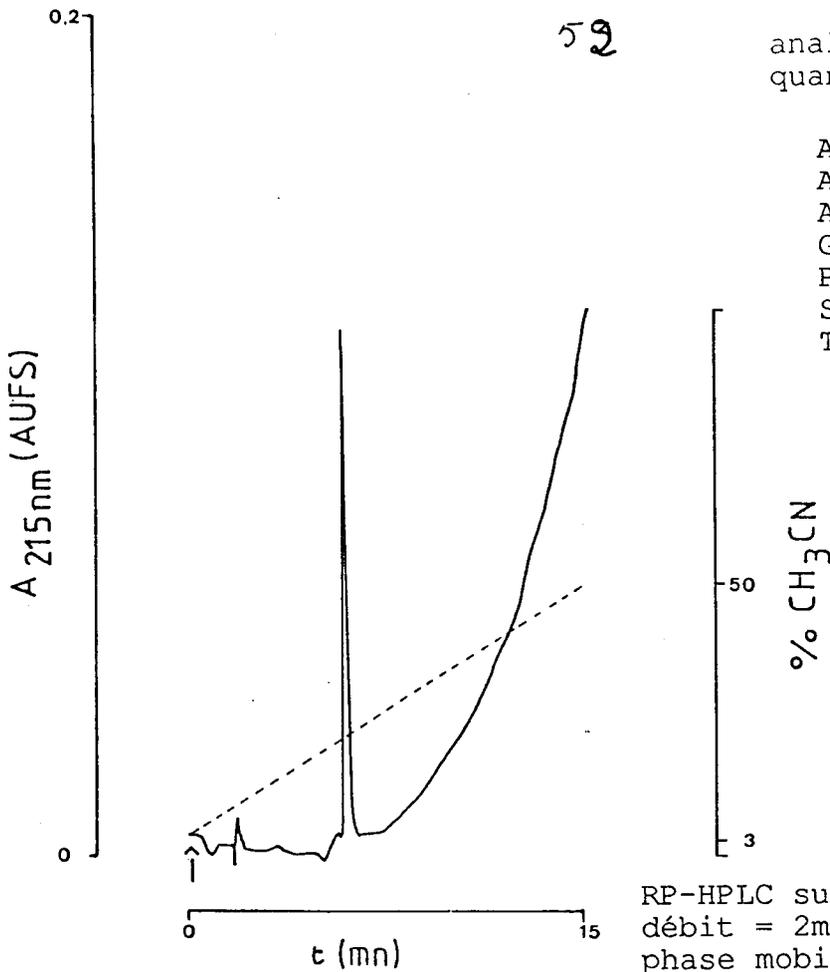
RP-HPLC sur  $\mu$ -Bondapack C18-Waters  
débit = 2 ml/mn,  
phase mobile: eau/acétonitrile/  
tampon phosphate à pH = 2,5



**Figure 2.29: caractérisation du peptide 145-158**

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Ala	1	1,02
Arg	1	1,09
Asp	3	2,61
Glu	1	1,02
Pro	2	2,27
Ser	3	2,92
Thr	2	2,04

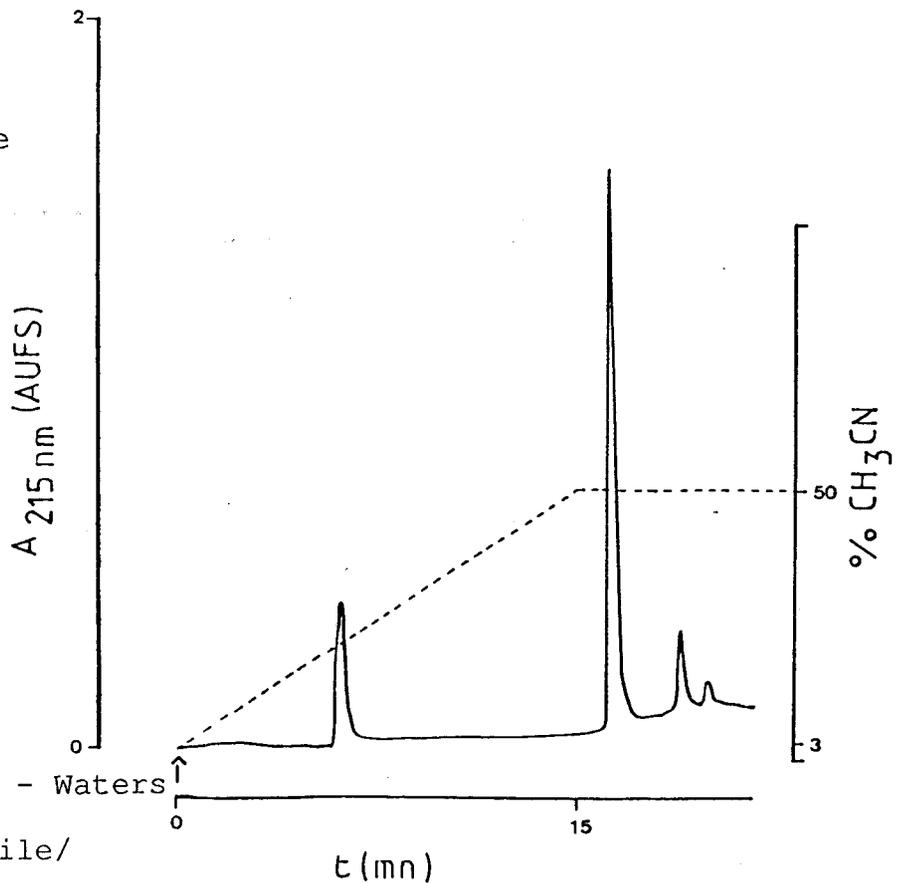


RP-HPLC sur  $\mu$ -Bondapack C18 - Waters  
débit = 2ml/mn,  
phase mobile: eau/acétonitrile/  
tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 2.30: caractérisation du peptide 162-174

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Ala	1	1,00
Asp	1	0,99
Glu	2	2,01
Ile	1	0,95
Leu	2	1,90
Phe	1	0,93
Pro	4	4,00
Ser	3	2,56
Val	1	0,90



RP-HPLC sur  $\mu$ -Bondapack C18 - Waters  
débit = 2ml/mn,  
phase mobile: eau/acétonitrile/  
tampon phosphate à pH = 2,5

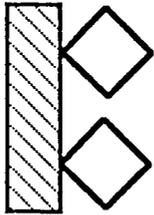
Figure 2.31: caractérisation du peptide 232-247

Après gel-filtration ou chromatographie de partition en phase inverse, ou encore échange ionique, les autres peptides présentent une pureté supérieure à 80%; ce qui autorise leur utilisation chez l'animal. Nous avons également caractérisé chaque peptide par analyses d'acides aminés et RP-HPLC (fig. 2.28, 2.29, 2.30 et 2.31).

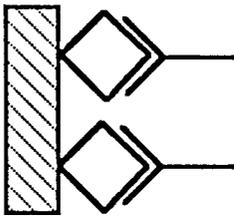
### 2.5. Résultats immunologiques

Ces études ont été réalisées par le Dr.M. Jolivet dans le laboratoire d'Immunologie Expérimentale à l'Institut Pasteur de Paris. Bien que les ayant suivies attentivement nous n'avons pas participé personnellement à ces expérimentations, mais leurs résultats prolongent notre étude. C'est pourquoi nous avons jugé utile de les rapporter dans le cadre de cette thèse.

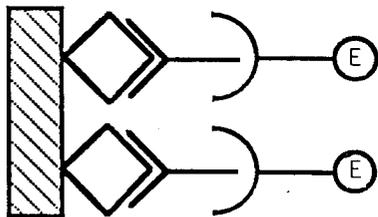
Les différents peptides, couplés à l'anatoxine tétanique, ont été injectés seuls ou en présence de l'adjuvant complet de Freund. Les souris ont été rappelées deux fois avec les immunogènes pour amplifier la réponse immunitaire. Les taux d'anticorps dirigés contre les peptides, et le virion ont été mesurés par ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). C'est une technique rapide (Engvall, E, 1972) qui permet d'évaluer la liaison de l'anticorps avec un antigène donné fixé sur un support solide inerte (une microplaque de polyéthylène de 8 x 12 puits). Les étapes principales de ce test sont illustrées par la figure 2.32. Les titres sont rassemblés dans le tableau 2.13. Nous ne rapportons



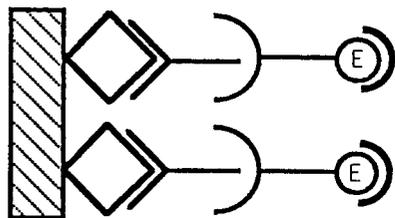
Fixation de l'antigène



Addition des anticorps



Addition d'anti-immunoglobulines  
marquées avec la peroxydase



Addition du substrat de l'enzyme ( $H_2O_2$ )

Réaction colorée mesurable par spectrophotométrie

Figure 2.32: principe de l'ELISA

que les titres des sérums hyperimmuns obtenus par immunisation avec les peptides 38-61, 72-88 et 162-174.

Immunogène (ana TT)	Adjuvant	Réponse 1 <sup>ère</sup>		Réponse 2 <sup>ème</sup>		Réponse 3 <sup>ème</sup>	
		anti-pept.	anti-vir.	anti-pept.	anti-vir.	anti-pept.	anti-vir.
(38-61)	PBS	400	<100	3500	250	1600	1600
	FCA	2500	800	13000	2500	15000	12500
(72-88)	PBS	<100	<100	250	<100	300	<100
	FCA	200	<100	1800	<100	800	<100
(162-174)	PBS	NT	<100	NT	<100	NT	400
	FCA	NT	<100	NT	NT	NT	1000

NT:non testé

Tableau 2.13 : titration des anticorps anti-peptides et anti-virion par la technique ELISA

Ces résultats ont permis de tirer les conclusions suivantes:

- les peptides testés permettent d'obtenir des anticorps qui les reconnaissent, ainsi que le virion, bien qu'à des taux plus faibles.
- l'effet adjuvant du FCA a permis l'élaboration jusqu'à dix fois plus d'anticorps. Les anticorps anti-peptide 38-61 reconnaissent le virion dès la première injection, alors que les anticorps anti-peptide 162-174 qui se lient au virion ne sont décelables qu'après la troisième injection, et que le peptide 72-88 ne donne aucun résultat quant à une réponse immunitaire dirigée contre le virion.

Le peptide 38-61 étant le plus immunogène, nous espérons que les anticorps, qui étaient capables de reconnaître le virion

(comme Dr.M. Jolivet l'avait quantifié), pourraient neutraliser le virus. Nous avons donc décidé de poursuivre les études et de tester l'effet neutralisant des anticorps obtenus contre le peptide 38-61 ainsi que les deux autres peptides 72-88 et 162-174. Les essais furent réalisés par les laboratoires Mérieux à Lyon.

Malheureusement les résultats furent décevants. Aucun effet protecteur ne fut mis en évidence, quel que soit le peptide testé. L'élucidation ultérieure de la structure tridimensionnelle de la capsid virale nous a permis d'éclairer l'interprétation de ces résultats.

En effet, rappelons nous que l'extrémité carboxylique terminale du peptide 72-88 apparaît totalement enfouie au sein de la capsid; ce qui explique le faible titre en anticorps qui reconnaissent le virion.

D'autre part, le peptide 38-61 s'est révélé également enfoui puisque l'extrémité amine terminale est accolée à l'acide ribonucléique messager. Pourtant les anticorps qu'il est capable de susciter, reconnaissent le virion. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la dénaturation du virion, lorsqu'il est fixé sur la plaque d'ELISA; ce qui entraînerait l'exposition de régions normalement peu accessibles de la capsid. Par conséquent, les anticorps détectés par ELISA ne correspondent pas aux anticorps dirigés contre le virus naturel, mais à des anticorps dirigés contre le virion

altéré, très différent du vivant.

Les deux autres peptides 145-158 et 232-247 apparaissent très bien exposés sur la protéine VP2. Il serait donc très intéressant d'évaluer les anticorps élevés contre ces peptides, et surtout de tester leur effet neutralisant. Les études sont en cours.

#### 2.6. Fiabilité des méthodes prévisionnelles

Pour sélectionner des séquences peptidiques susceptibles de déclencher l'apparition d'anticorps protecteurs vis à vis d'agents pathogènes tels qu'un virus, nous nous sommes intéressées aux zones exposées à la surface de la protéine considérée. Les méthodes prévisionnelles que nous avons utilisées sont basées sur des critères d'hydrophilie, exposition à la surface, mobilité et prédiction des coudes  $\beta$ .

L'élucidation de la structure tridimensionnelle nous a permis de tester la fiabilité des différents programmes appliqués à la protéine VP2 du poliovirus type 1.

Nous avons vérifié effectivement la bonne exposition des séquences sélectionnées par chacun de nos programmes (à l'exception de celui de Fraga) à la surface de la protéine considérée isolément. Nous avons pu également apprécier une bonne concordance entre toutes les méthodes (sauf celle de

Fraga); en effet les peptides que nous avons choisis figurent parmi les cinq premiers fragments sélectionnés selon les différents critères.

Malheureusement si les anticorps anti-peptides se sont révélés capables de reconnaître le virion, ils ne permettent pas la neutralisation du virus, du moins en ce qui concerne les peptides étudiés 38-61, 72-88 et 162-174.

Les critères physico-chimiques étant basés sur la structure primaire de la protéine isolée de son contexte, nos méthodes prédictives présentent l'inconvénient de ne pas prendre en considération l'environnement de la protéine étudiée, qu'il soit lipidique, glucosidique, ou protéique. Or la protéine VP2 n'est pas isolée, mais au contraire, est associée au sein de la capside, aux protéines VP1, VP3 et VP4, ainsi qu'à l'acide ribonucléique messenger. Les peptides 38-61 et 72-88 sont en réalité enfouis au sein de la capside.

Néanmoins, en dépit de cet inconvénient qui limite l'efficacité des méthodes prédictives, ces critères de choix restent de bons outils de sélection en absence de tout autre renseignement que la séquence en acides aminés.

**III : CONCEPTION ET ELABORATION  
D'IMMUNOGENES SYNTHETIQUES**

Le parasite *Plasmodium falciparum* nous a servi de modèle pour affiner les méthodologies de préparation d'immunogènes synthétiques. Notre but était d'obtenir un peptide pur, puis de transformer ce réactif de laboratoire en un produit défini chimiquement et utilisable dans le cadre de vaccination humaine.

Tout d'abord, nous traiterons brièvement les principes d'élaboration d'immunogènes synthétiques, puis après un rappel succinct du cycle biologique du *Plasmodium falciparum*, nous détaillerons dans ce chapitre:

- les différentes stratégies de synthèse,
- le choix d'adjuvants et protéines porteuses,
- l'optimisation des méthodes de couplage,
- la conception de formes de présentation d'antigènes au niveau du système immunitaire.
- l'influence de la structure secondaire au niveau de l'immunogénicité et l'antigénicité des peptides,
- l'association dans un polyvaccin synthétique de plusieurs antigènes peptidiques correspondant à des séquences protéiques de différents stades du parasite.

## 1. PRINCIPES D'ELABORATION D'IMMUNOGENES SYNTHETIQUES

Avant d'aborder la conception des immunogènes synthétiques, il est nécessaire de définir les propriétés d'immunogénicité et de spécificité antigénique.

L'immunogénicité reflète la capacité de la molécule à stimuler une réponse humorale et/ou une réactivité cellulaire. Elle dépend des cellules T et B ainsi que d'autres facteurs tels le mode de présentation. La spécificité antigénique représente la capacité d'interaction d'une molécule avec les anticorps ou les lymphocytes du système immunitaire.

Un peptide est souvent trop petit pour être efficacement repéré par le système immunitaire. Il doit être généralement couplé à une protéine porteuse au niveau de laquelle il sera reconnu comme haptène. Par ailleurs, la réponse immunitaire aura avantage à être amplifiée par association de l'immunogène à un adjuvant.

### 1.1 Choix des molécules porteuses

L'immunogénicité des haptènes dépend de:

- leur accessibilité et interaction avec les récepteurs de surfaces des cellules responsables de l'immunité,
- leur caractère étranger aux molécules au "soi",
- l'aptitude de la molécule porteuse à stimuler la production et l'activité des cellules T-helper. En effet,

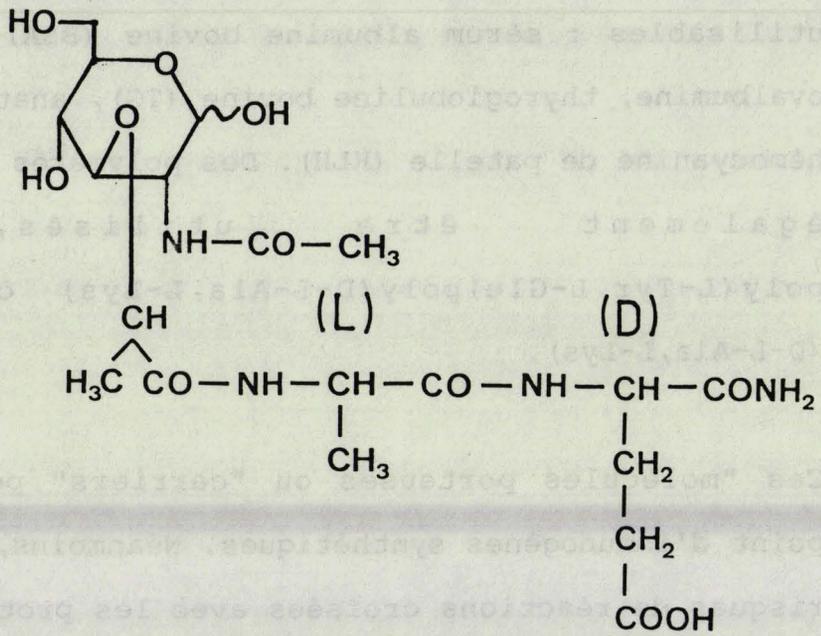
l'obtention d'une forte réponse immune est obtenue par coopération des lymphocytes B et T.

Dans les protocoles de laboratoire, plusieurs protéines sont utilisables : sérum albumine bovine (BSA) ou humaine (HSA), , ovalbumine, thyroglobuline bovine (TG), anatoxine tétanique (TT), hémocyanine de patelle (KLH). Des polymères synthétiques pourront également être utilisés, tels le poly(L-Tyr,L-Glu)poly(D-L-Ala,L-Lys) ou encore le poly(D-L-Ala,L-Lys).

Ces "molécules porteuses ou "carriers" permettent la mise au point d'immunogènes synthétiques. Néanmoins, elles présentent des risques de réactions croisées avec les protéines de l'organisme, de sensibilisation, d'immunosuppression spécifique de l'haptène.

Pour éviter ces inconvénients, les recherches se sont orientées vers les molécules hydrophobes (Hopp, 1984), la polymérisation de l'haptène sur lui-même, ou encore la copolymérisation de peptides différents (Audibert, 1985). Plus récemment, Tam a mis au point une matrice peptidique permettant d'accrocher plusieurs antigènes peptidiques (1988). Ce noyau est constitué de huit lysines qui peuvent fournir ainsi seize bras d'ancrage.

La stimulation de la réponse immunitaire pourra également être obtenue uniquement par association à des adjuvants d'immunisation. Dans certains cas, il est possible de s'affranchir de la molécule porteuse et d'associer seulement



**Figure 3.1: muramyl-dipeptide**

l'antigène peptidique à un adjuvant (H. Gras-Masse, 1985).

### 1.2. Choix des adjuvants

Les adjuvants d'immunisation sont d'un emploi constant en vaccination, y compris dans les vaccins actuels (souvent de l'alumine). Ces adjuvants ont pour effet de stimuler la réponse immunitaire, en renforçant les phénomènes de coopération cellulaire, nécessaires à l'établissement d'une réponse efficace. Leurs mécanismes d'action sont liés à un effet dépôt (qui retarde sa dispersion), à l'activation des macrophages, et aux effets spécifiques sur les lymphocytes.

En immunisation de laboratoire, l'adjuvant le plus utilisé est l'adjuvant complet de Freund (FCA), constitué de mycobactéries tuées, dans une émulsion d'eau et d'huile minérale. Son emploi provoque cependant des réactions inflammatoires, des abcès, de la fièvre, toutes réactions secondaires indésirables dans un contexte thérapeutique, humain ou animal. L'adjuvant incomplet de Freund est une émulsion simple d'eau dans l'huile.

De considérables progrès ont été amenés par la découverte du principe actif de cette préparation, de Muramyl-Di-Peptide. Ce produit, et les nombreux dérivés qui ont été synthétisés depuis, ont été largement étudiés. Le muramyldipeptide (N-acétyl muramyl-L-alanine-D-isoglutamine ou MDP) est le composant actif des mycobactéries contenues dans l'adjuvant complet de Freund (fig. 3.1). Le MDP ainsi que les dérivés qui ont été synthétisés (Ellouz, 1974 - Kotani, 1975 - Lederer, 1980 - Lefrancier, 1981) sont

capables de remplacer le FCA pour stimuler les taux d'anticorps, induire l'hypersensibilité retardée et susciter également une réponse non spécifique vis à vis des infections bactériennes (Leclerc, 1984, Leclerc, 1985). Le MDP présente l'avantage d'être actif en milieu salin (Audibert, 1976) et administrable par voie orale (Chedid, 1976). Son activité immunostimulante est accrue quand il est associé à un antigène synthétique par liaison covalente (Chedid, 1979). Malheureusement, le MDP a des effets pyrogènes et hypnogènes. Certains de ses analogues, comme le murabutide, conservent les propriétés adjuvantes et immunostimulantes sans exercer ces deux effets secondaires.

Récemment, Allison (1987) a développé une nouvelle formulation d'adjuvant à base de squalane, qui est la forme saturée du squalène, constituant de la peau.

## **2. PLASMODIUM FALCIPARUM**

Aujourd'hui 200 à 400 millions d'habitants des régions tropicales sont atteints de paludisme. En Afrique la maladie tue dix pour cent de ses victimes et contribue fortement à maintenir un taux de mortalité infantile important .

Pourtant on avait cru maîtriser le fléau, au début des années 1960, grâce aux pulvérisations intensives de dichloro-diphényl-trichloréthane (DDT) qui déciment les moustiques *Anopheles* (vecteur de la maladie) et au traitement

des maladies par la chloroquine et ses dérivés. Mais au cours du temps, le protozoaire *Plasmodium*, agent responsable de la maladie, est devenu résistant aux médicaments, et la femelle du moustique *Anopheles* s'est adaptée au DDT et autres insecticides. Il est donc urgent de mettre au point un nouveau moyen d'enrayer ce fléau, notamment par traitements préventifs.

Mais actuellement, le développement de vaccins anti-malaria efficaces se heurte à deux problèmes majeurs:

- le premier problème concerne la diversité antigénique importante du parasite. Le parasite est passé maître dans l'art d'échapper au système immunitaire. Cette grande variété de la forme antigénique pourrait expliquer l'instabilité et le développement très lent de l'immunité dirigée contre la malaria,
- le deuxième problème est lié au faible niveau d'immunité acquis dans les conditions naturelles.

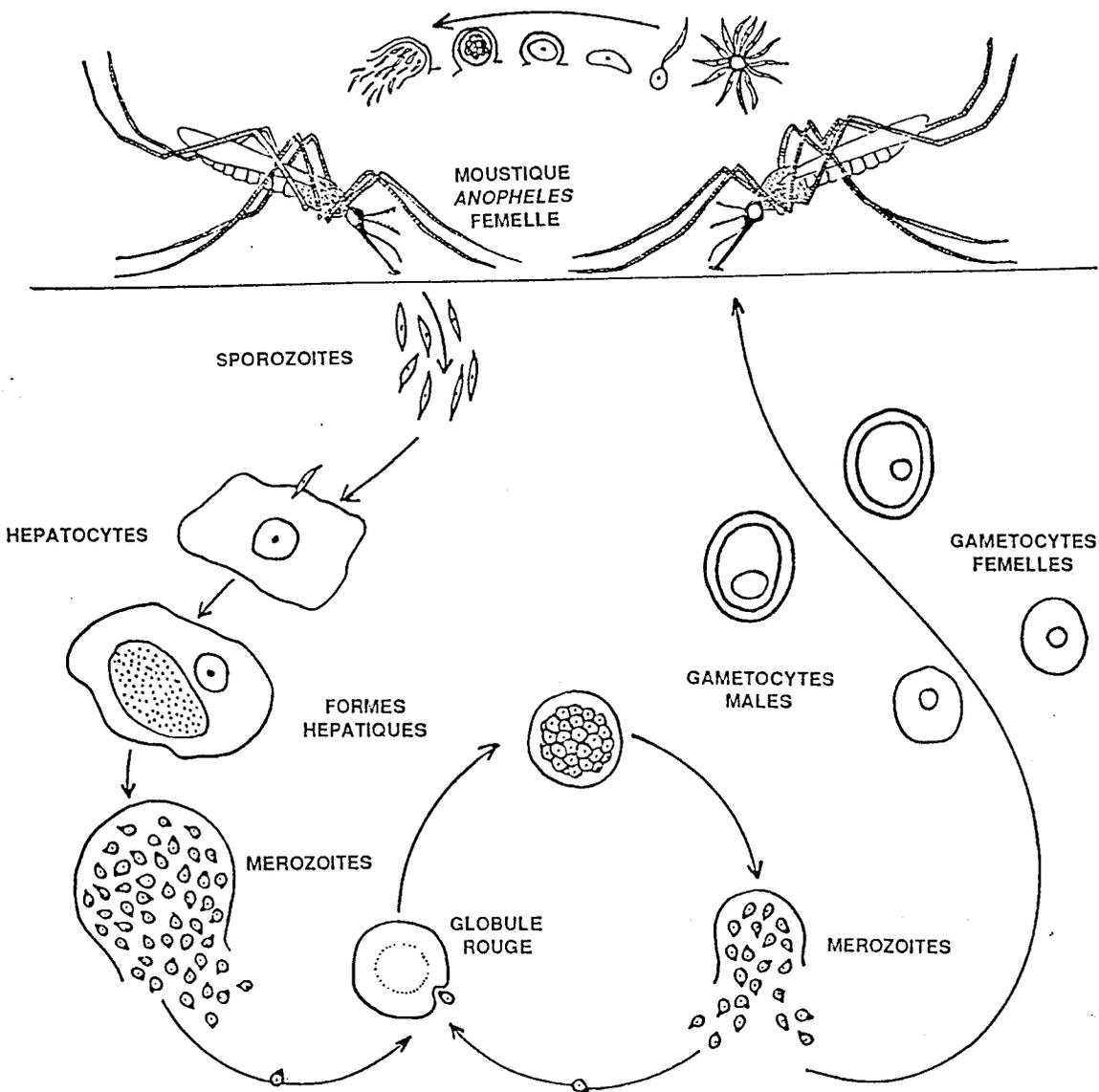
Par conséquent, les hommes habitant en zones d'endémie subissent de nombreux épisodes symptomatiques de parasitémie durant les premières années de leur vie. Dans les régions où la transmission est instable, la mortalité touche également les gens plus âgés. De plus, bien que des adultes, habitant des zones où la transmission est fréquente et intensive, possèdent des anticorps, des parasites sanguins sont retrouvés dans leur sérum.

Un vaccin efficace ne pourra être mis au point que lorsque ces problèmes seront résolus.

## 2.1 Cycle évolutif du Plasmodium

Parmi les 4 espèces pathogènes chez l'homme (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*) le *Plasmodium falciparum* est l'agent le plus fréquent et le plus mortel. Au cours de son cycle évolutif chez le moustique vecteur et l'hôte humain, cet organisme unicellulaire subit une série de modifications morphologiques.

La forme infectante, le sporozoïte, qui se trouve dans les glandes salivaires du moustique, passe dans le sang humain quand le moustique femelle pique l'homme au cours d'un repas sanguin. En moins d'une heure, chaque sporozoïte gagne une cellule hépatique où il subit une série de transformations pour atteindre le stade schizonte (cellule géante polynucléaire), qui se divise ensuite en petits mérozoïtes sphériques. Un seul sporozoïte donne naissance entre 5000 à 10000 mérozoïtes qui sont libérés ensuite dans le sang. Chaque mérozoïte envahit alors un globule rouge et s'y reproduit de façon asexuée jusqu'à ce que l'érythrocyte éclate et libère 10 à 20 nouveaux mérozoïtes, qui envahiront à leur tour d'autres globules rouges. Cette lyse périodique des érythrocytes ainsi que la libération concomitante des mérozoïtes et de déchets toxiques sont responsables de fièvres et frissons intermittents caractéristiques de la maladie. Certains mérozoïtes se transforment en gamétocytes mâles ou femelles qui amorcent le cycle sexuel du parasite. Les moustiques en piquant des malades, aspirent des gamétocytes en même temps que des globules rouges. Les gamétocytes, poursuivant leur développement, arrivent à



**Figure 3.2: cycle évolutif du Plasmodium**

maturité chez les *Anopheles* et fusionnent pour former des zygotes. Après une série de transformations supplémentaires, les sporozoïtes parvenus à maturité apparaissent dans les glandes salivaires du moustique et sont prêts à renouveler le cycle infectieux (fig. 3.2).

Au sein de chaque espèce de *Plasmodium*, il existe une spécificité d'espèce tant au point de vue morphologique qu'antigénique. Chacun des quatre stades pourrait servir de cible contre laquelle seraient dirigés les vaccins.

Une protection efficace semble difficile à assurer par des vaccins dirigés contre les formes mérozoïtes et gamétocytes. En effet, si un vaccin anti-gamétocyte permettait de rompre la chaîne de transmission du parasite par les moustiques à d'autres hommes, il ne pourrait bloquer le cycle infectieux du *Plasmodium* chez les sujets vaccinés qui contracteraient la maladie. D'autre part, la très grande diversité et variation antigéniques du stade érythrocytaire (mérozoïte) complique de manière considérable le développement d'un vaccin anti-mérozoïte.

Les stades pré-érythrocytaires, c'est à dire le sporozoïte et la forme hépatique, nous ont donc paru les meilleurs candidats pour mettre au point des immunogènes synthétiques capables de stimuler la production d'anticorps protecteurs.

Mais pour être efficace à 100%, il est impératif que de tels vaccins suscitent l'élaboration d'anticorps qui neutralisent tous

les sporozoïtes dès leur entrée dans l'organisme, ou après leur transformation en formes hépatiques. Il est primordial d'empêcher la multiplication du parasite ainsi que la poursuite de son cycle infectieux.

### 3. PROTEINE CS (CIRCUMSPOROZOITE)

Bien que les sporozoïtes restent peu de temps en circulation avant de pénétrer dans les hépatocytes, la vaccination avec des sporozoïtes irradiés par les rayons X permet de protéger des rongeurs, des singes et des hommes contre la malaria.

L'immunité protectrice qui est spécifique de l'espèce et du stade, est assurée en grande partie par des anticorps. Le pouvoir infectieux des sporozoïtes peut être neutralisé par leur incubation avec des sérums d'animaux protégés. Au cours de cette réponse se forme un dépôt à la surface du sporozoïte; cette précipitation est connue sous le nom de réaction de circumsporozoïte (CSP).

Malgré la brièveté de l'immunité protectrice, acquise après injection de sporozoïtes irradiés, elle peut être rappelée naturellement par piqûres de moustiques infectés. L'inoculation fréquente de sporozoïtes chez des hommes habitant en zone d'endémie peut avoir un effet similaire. La résistance contre la malaria, acquise dans les conditions naturelles, augmente avec l'âge des individus et est associée à des titres importants

d'anticorps anti-sporozoïte (Nardin, 1979). Néanmoins, les quantités de sporozoïtes obtenus par dilacération des glandes salivaires de moustiques sont trop faibles pour envisager la préparation de vaccins à partir de ces extraits.

La membrane des sporozoïtes matures et infectieux est recouverte par une protéine : la protéine de circumsporozoïte (ou protéine CS). C'est une protéine, synthétisée uniquement par les sporozoïtes, qui recouvre entièrement leur surface.

Les protéines CS des sporozoïtes ont été identifiées au moyen d'anticorps monoclonaux chez la souris (Potajnak, 1980, Hollingdale, 1982), le singe (Cochrane, 1982), l'homme (Nardin, 1982). Les anticorps monoclonaux ainsi que leurs fragments (Fab) anti-sporozoïtes neutralisent le pouvoir infectieux du sporozoïte *in vivo* et *in vitro*, et préviennent également l'attachement du parasite sur les cellules cibles.

Les propriétés immunologiques de la protéine CS sont remarquables. Elle possède un motif de quatre acides aminés répété plusieurs fois. Les anticorps d'humain habitant en zones endémiques, ou ceux de deux volontaires immunisés après injection de sporozoïtes irradiés aux rayons X de *P. falciparum* ou *P. vivax* protègent contre le parasite et sont dirigés en grande partie, contre l'épitope répétitif (Zavala, 1983).

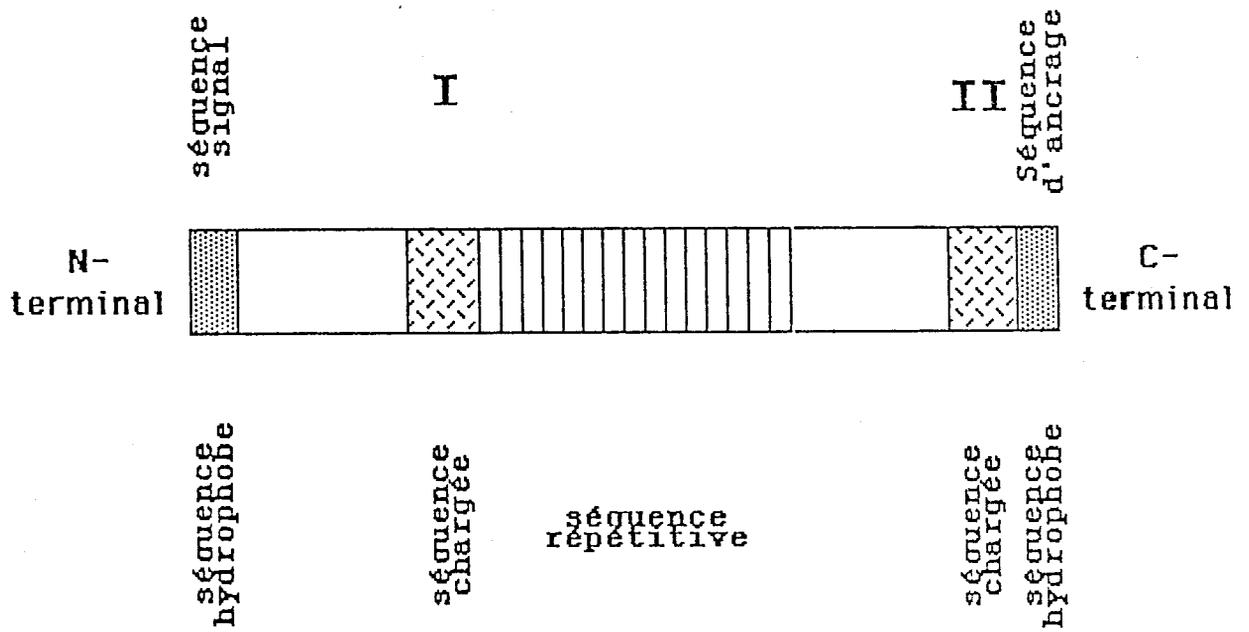


Figure 3.3: structure de la protéine CS

### 3.1 Structure de la protéine du circumsporozoïte

La structure primaire de la protéine CS de *P. falciparum* qui a été déduite de la séquence en nucléotides, confirme effectivement que la protéine CS contient un motif répétitif (Enéa, 1984 - Dame, 1984). Il est remarquable que les séquences répétitives de deux souches de *P. falciparum*, bien que provenant de régions différentes, soient pratiquement identiques. Le motif de répétition est un tétrapeptide Asn-Ala-Asn-Pro (NANP) répété 37 fois selon Dame ou 23 fois selon Enéa. Dame a également mis en évidence une séquence mutante, Asn-Val-Asp-Pro (NVDP), qui est répétée quatre fois.

Les protéines CS du *P. falciparum* présentent une organisation proche de celle du *P. knowlesi*, un des parasites du singe (Godson, 1983 - Sharma, 1985). La figure 3.3 indique que l'épitope répétitif (environ 40% de la protéine) en position centrale est encadré par deux régions fortement chargées qui contiennent chacune deux courtes séquences I et II relativement bien conservées entre les espèces *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. knowlesi*. A l'extrémité N-terminale, les résidus hydrophobes pourraient correspondre à une séquence signal tandis que les résidus hydrophobes à l'extrémité C-terminale constitueraient une séquence d'ancrage sur une membrane (Ozaki, 1983).

La présence d'une structure répétitive, remarquablement conservée, du moins en ce qui concerne la séquence en acides

aminés, est tout à fait étonnante. Il est d'autant plus surprenant de retrouver de telles répétitions de séquences, non seulement au sein de la protéine CS du *P. falciparum*, mais également dans d'autres espèces de *Plasmodii* (Mac Cutchan, 1985 - Enea, 1984 - Eichinger, 1986) et d'autres stades (Coppel, 1983 - Favoloro, 1986 - Stahl, 1985 - Koenen, 1984 - Kochan, 1986 - Ravetch, 1984) (tableau 3.1).

### Protéine CS

<i>P. falciparum</i>		(NANP) 37	(NVDP) 4
<i>P. vivax</i>		(GDRADGQPA)	
<i>P. knowlesi</i>	souche H	(GQPQAQGDGANA) 12	
	souche Nury	(EQPAAGAGG)	
<i>P. cynomolgy</i>		(GGAAAAGGGGN) 10	
<i>P. berghei</i>		(DPPPPNPN)	

### Stade hépatique

<i>P. falciparum</i>		EQQSDLEQERLAKEKLO
----------------------	--	-------------------

### Stade érythrocytaire

<i>P. falciparum</i>	protéine S	(PAKASQGGLED) 100
	RESA	(EENVEHDA) 6 (EENV) 36
	FIRA	(VTTQEP) 12
	PF-11	(EEVVVEEVP) 32
	GBP-130	(LTSADPEGNIMREYAADPEYRKHLE IFHKILTNTDPNDEVERRNADNKED) 11
<i>P. lophurae</i>	protéine riche en His (APH <sub>8</sub> ) (DAH <sub>8</sub> )	

Tableau 3.1 : séquences répétitives de protéines de *Plasmodii*

Cette répétition de séquence laisse présager une fonction importante au niveau du système immunitaire (de la Cruz, 1987). Pour tenter de comprendre ce rôle, nous avons synthétisé une série de peptides contenant un nombre croissant de la structure

NANP:

$(\text{NANP})_n$  avec  $n$  variant de 1 à 8.

Nos études nous ont amené à:

- préciser que les séquences répétitives ne sont pas impliquées dans le mécanisme de reconnaissance des hépatocytes par les sporozoïtes,
- évaluer le nombre minimal de motifs de répétition nécessaires à une réponse immunitaire efficace,
- estimer le nombre minimal de séquences répétitives qui doivent être associées pour adopter une structure secondaire et déterminer l'influence de l'organisation des peptides au niveau des résultats immunologiques,
- optimiser la préparation d'immunogènes en potentialisant l'immunogénicité du peptide par association avec un adjuvant approprié, et améliorer le mode de présentation au système immunitaire d'un antigène synthétique en retardant sa dispersion.

### 3.2. Stratégies de synthèse

Nous avons mis en oeuvre différentes stratégies pour synthétiser les peptides  $(\text{NANP})_n$  :

- synthèse en phase solide
- synthèse en phase homogène
- couplage de fragments

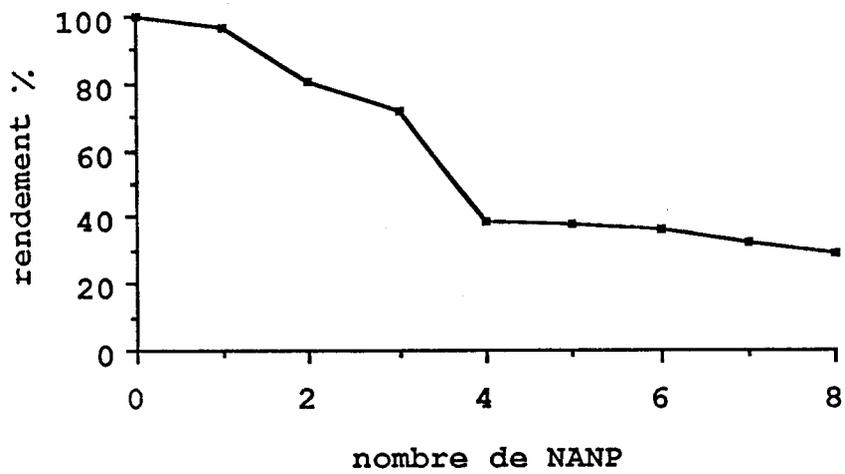


Figure 3.4 : évolution de la synthèse

### 3.2.1: Synthèse en phase solide

Nous avons préparé les différents peptides  $(\text{NANP})_n$  avec  $n$  variant de 1 à 8.

La tertio-butyloxycarbonyl-proline a été ancrée sous forme de sel de césium sur une résine chlorométhylée (0,49 mEq./g). Les chaînes latérales des acides aminés Asn, Pro et Ala ne nécessitaient pas de protection. Les couplages ont été effectués en présence de DCC et HOBt avec un excès de 2,5 selon le protocole classique Boc-TFA. Les 8 peptides  $\text{NANP}$ ,  $(\text{NANP})_2$ ,  $(\text{NANP})_3$ ,  $(\text{NANP})_4$ ,  $(\text{NANP})_5$ ,  $(\text{NANP})_6$ ,  $(\text{NANP})_7$  et  $(\text{NANP})_8$  ont été obtenus par prélèvements successifs de la peptidyl-résine au cours de la synthèse, puis clivages par le fluorure d'hydrogène (90%).

Le déroulement de la synthèse a été suivi par le test quantitatif à la ninhydrine (Sarin, 1981). Si le rendement de synthèse du peptide  $(\text{NANP})_3$  est bon (87%), il chute à partir de  $(\text{NANP})_4$  (39%) et diminue progressivement en fin de synthèse (29%), (fig. 3.4). Nous avons attribué les mauvais rendements de synthèse au repli de la chaîne peptidique quand elle devient suffisamment longue (après douze acides aminés) ainsi qu'à la fragilité de la liaison ester benzylique entre le peptide et la résine. En effet ce type de liaison supporte mal les traitements répétés au TFA, surtout pour les longs peptides.

Une purification par simple gel-filtration sur Biogel P2, P4 ou

tris-acryl GF05 a permis d'obtenir des peptides avec un degré de pureté qui varie entre 81 et 99%.

Les peptides ont été caractérisés par RP-HPLC, CCM et analyses d'acides aminés (fig. 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 et 3.12). Si l'analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale ne permet pas d'évaluer le nombre de tétrapeptides NANP, elle peut néanmoins indiquer un défaut ou un excès d'acides aminés au sein de la séquence NANP. La séquence du peptide (NANP)<sub>4</sub> a par ailleurs été vérifiée par microséquence phase gaz.

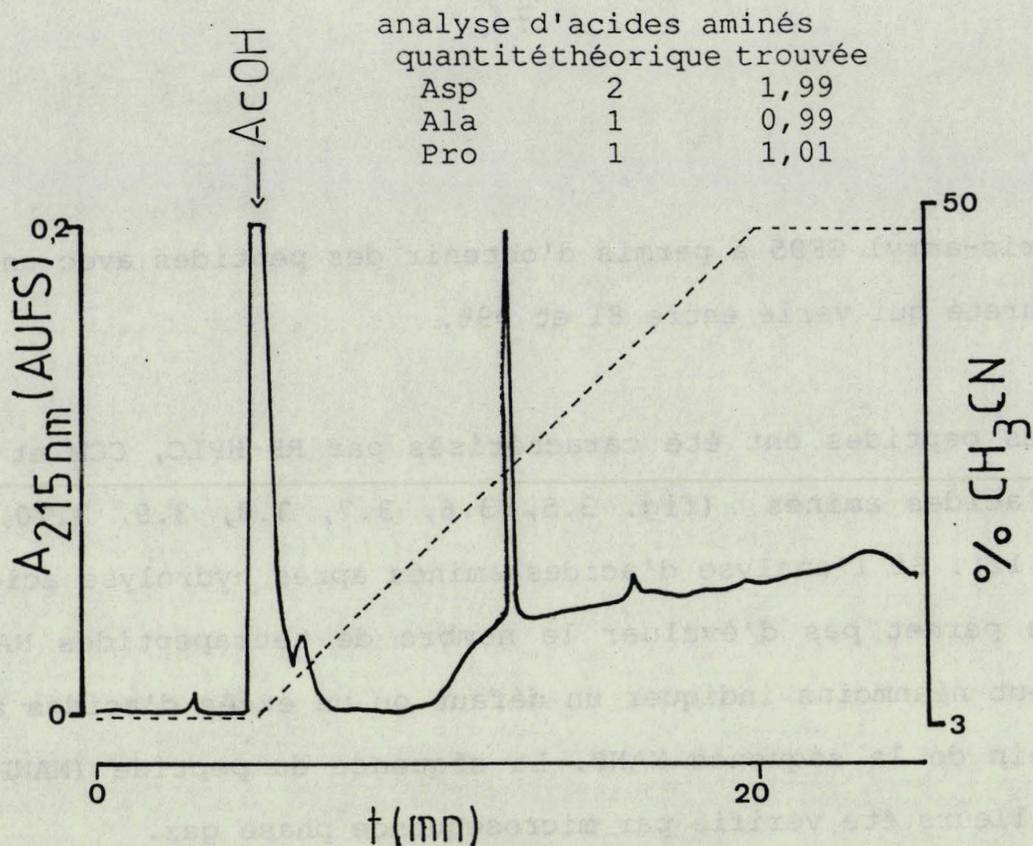
Nous avons mis au point les conditions analytiques pour séparer les 8 peptides par RP-HPLC (fig. 3.13).

### 3.2.2 : Synthèse de NANP en phase homogène

Nous avons envisagé le couplage de fragments en phase homogène, compatible avec la position C-terminale de Pro, qui permettait de limiter la racémisation lors des couplages. Pour mettre en oeuvre une stratégie de couplages de tétrapeptides NANP, il nous fallait préparer, avec de très bons rendements, une quantité importante de tétrapeptide pur, convenablement protégé.

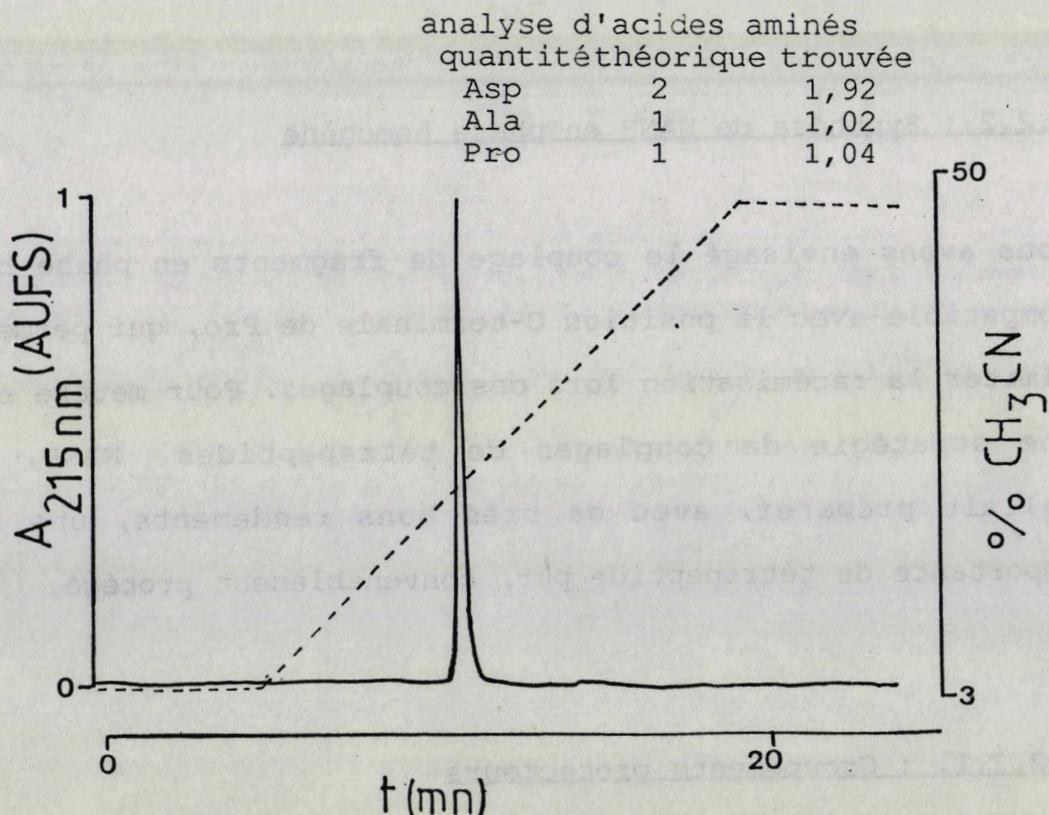
#### 3.2.2.1. : Groupements protecteurs

Nous avons réalisé la synthèse de NANP, sous la direction du Dr.



RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel  
débit = 1ml/mn, phase mobile: eau/acétonitrile/TFA 1/1000

**Figure 3.5: caractérisation de NANP**

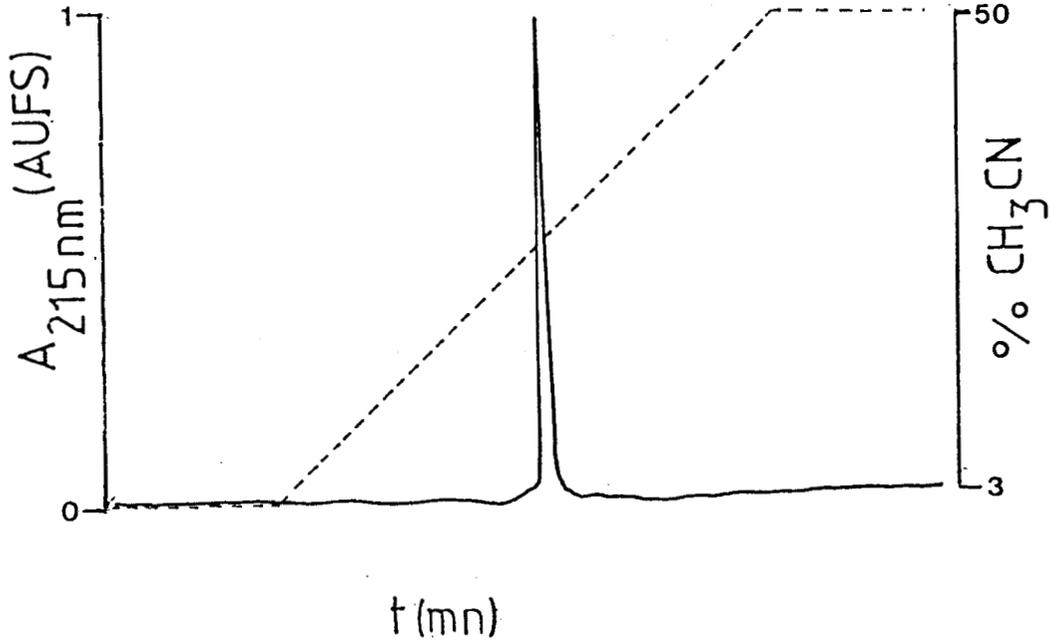


RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel  
débit = 1ml/mn  
phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH=2,5

**Figure 3.6: caractérisation de (NANP)<sub>2</sub>**

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	2	1,94
Ala	1	1,01
Pro	1	1,05



RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.7: caractérisation de (NANP)<sub>3</sub>

RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/  
tampon phosphate à pH = 2,5

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	2	1,96
Ala	1	0,98
Pro	1	1,08

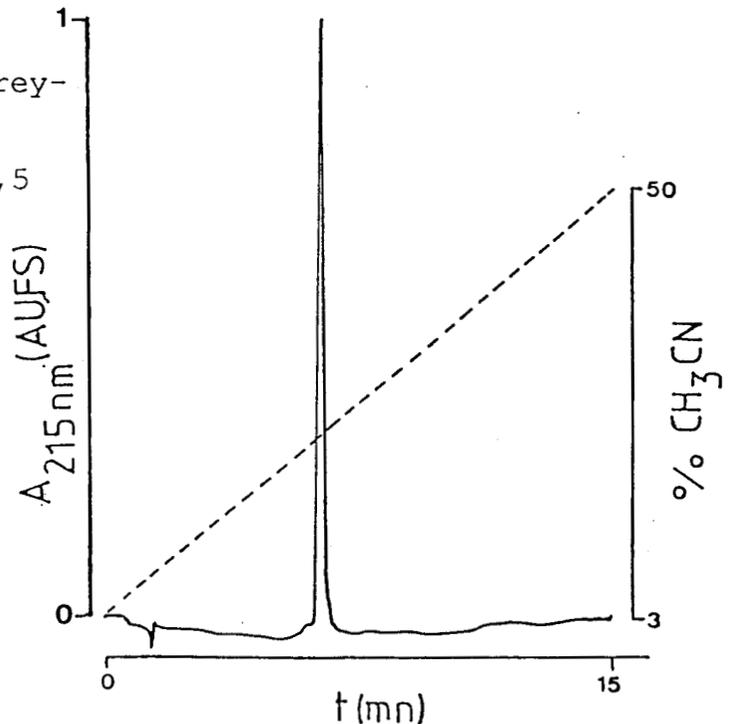
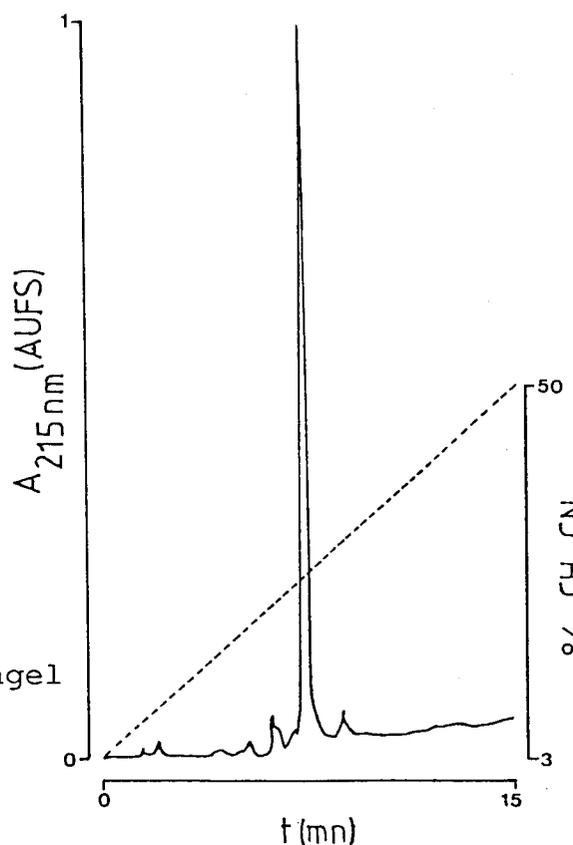


Figure 3.8: caractérisation de (NANP)<sub>4</sub>

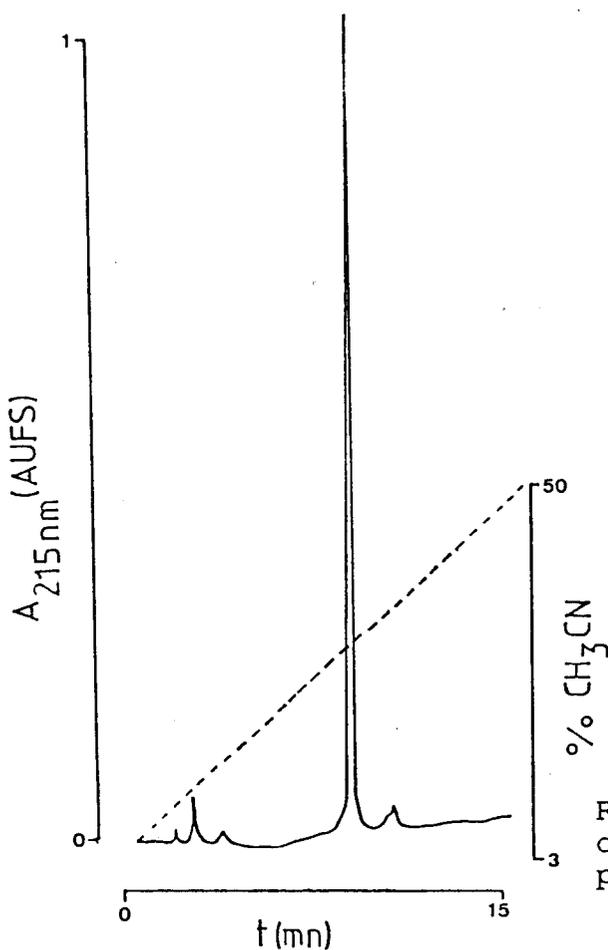
analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	2	2,03
Ala	1	1,04
Pro	1	1,00

RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel  
débit = 1ml/mn  
phase mobile: eau/acétonitrile/  
tampon phosphate à pH = 2,5



**Figure 3.9: caractérisation de (NANP)<sub>5</sub>**



analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	2	1,90
Ala	1	1,05
Pro	1	1,03

RP-HPLC sur Nucléosil C18 Mache  
débit = 1ml/mn Na  
phase mobile: eau/acétonitrile/  
tampon phosphate à pH = 2,5

**Figure 3.10: caractérisation de (NANP)<sub>6</sub>**

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	2	1,81
Ala	1	1,18
Pro	1	1,00

RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-  
débit = 1ml/mn Nagel  
phase mobile: eau/acétonitrile/  
tampon phosphate à pH = 2,5

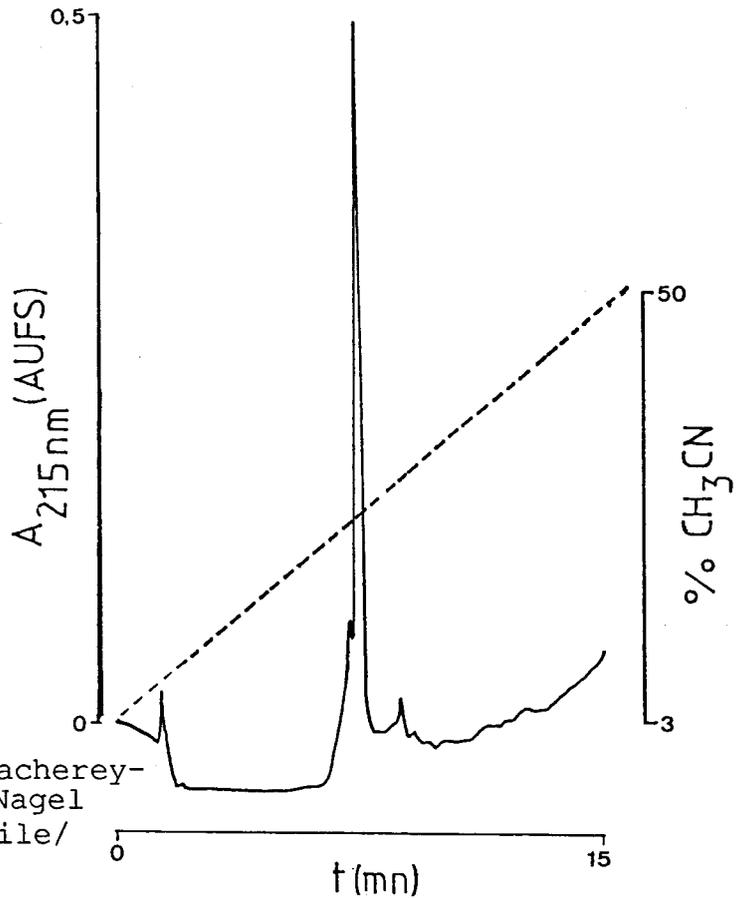
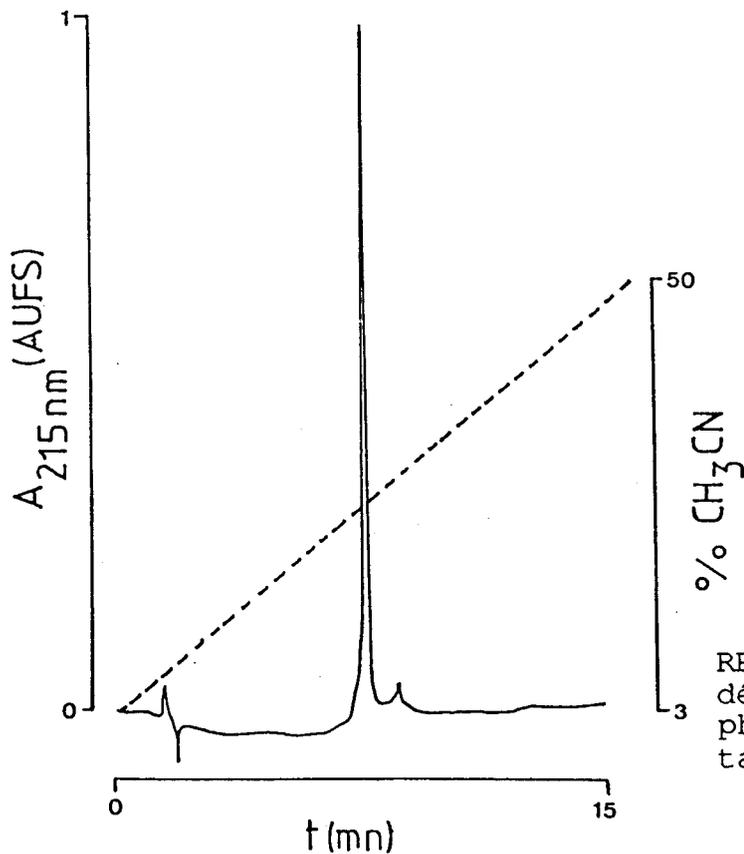


Figure 3.11: caractérisation de (NANP)<sub>7</sub>

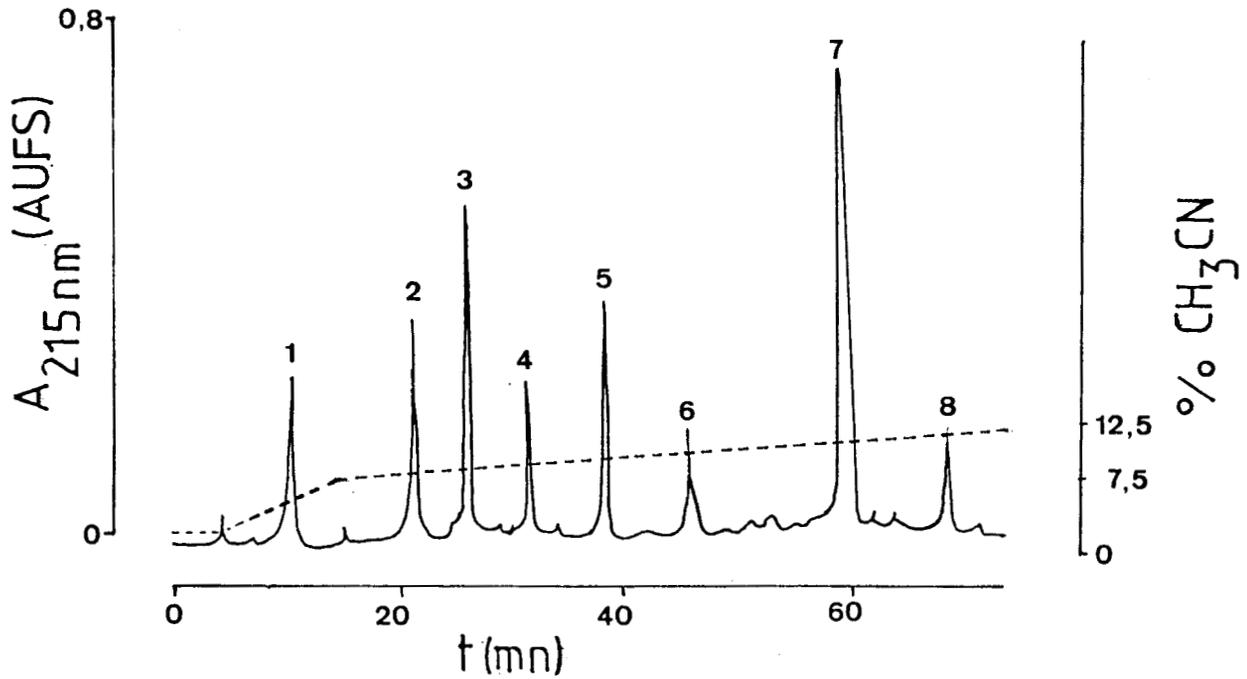


analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	2	1,93
Ala	1	1,02
Pro	1	1,04

RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-  
débit = 1ml/mn Nagel  
phase mobile: eau/acétonitrile/  
tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.12: caractérisation de (NANP)<sub>8</sub>



Nucléosil C18 Macherey-Nagel  
débit = 1ml/mn  
phase mobile: eau/acétonitrile/TFA 1/1000°

Figure 3.13: RP-HPLC des 8 peptides (NANP)<sub>n</sub> (N VARIANT DE 1 à 8)

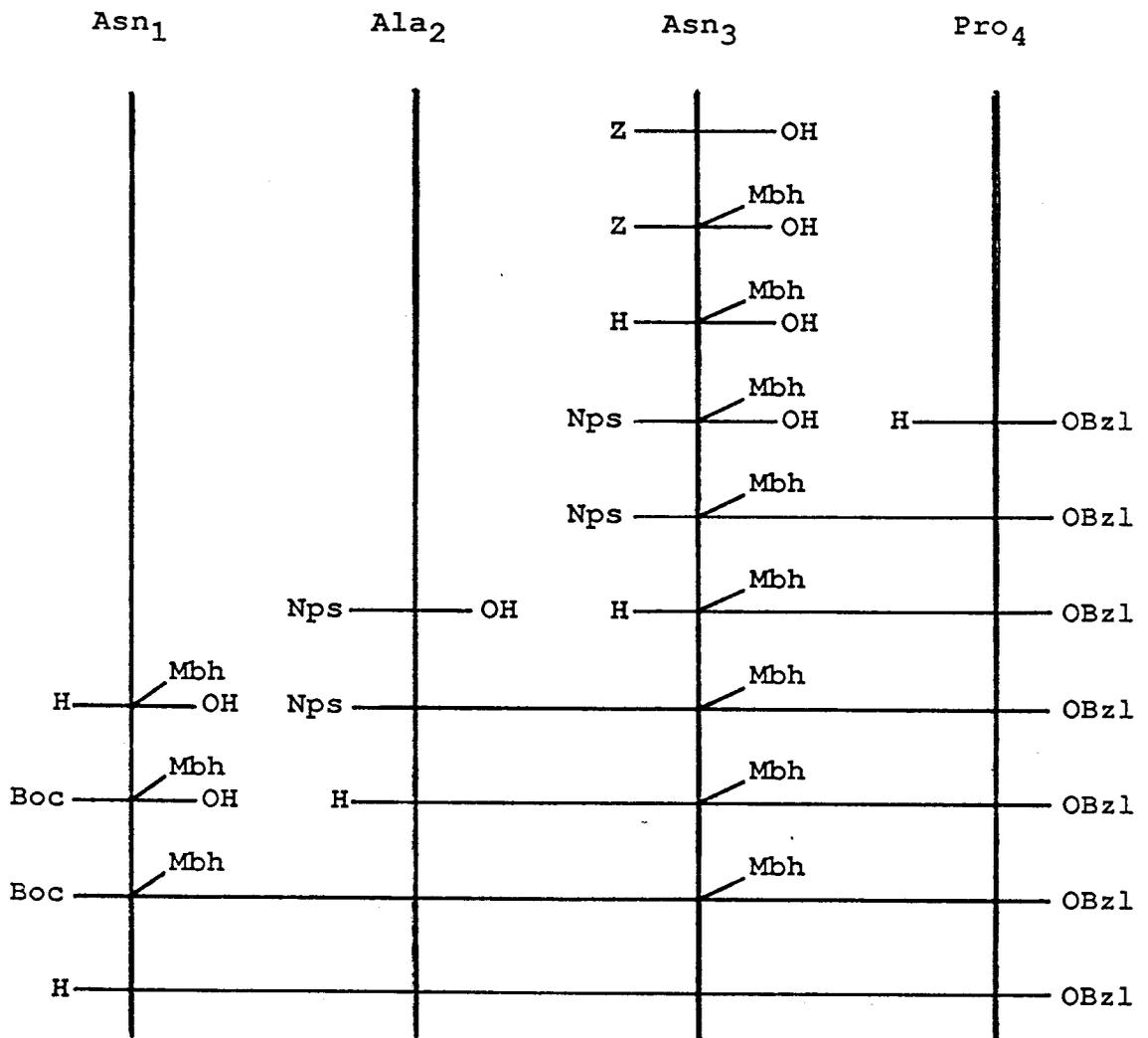


Figure 3.14: stratégie de synthèse du térapeptide

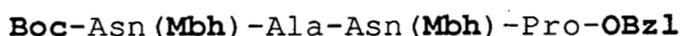
D. Blanot, dans le service du Dr. J. Van Heijenoort à l'Unité de Biochimie Moléculaire et Cellulaire d'Orsay .

La stratégie que nous avons choisie est résumée dans la figure 3.14. La synthèse est réalisée par voie récurrente en ajoutant un acide aminé à la fois.

Afin de permettre leur couplage en phase homogène, nous voulions obtenir les fragments suivants:

- **Boc-Asn (Mbh) -Ala-Asn (Mbh) -Pro-OH,**
- **H-Asn-Ala-Asn-Pro-OBzl,**

qui pouvaient être préparés par déprotection sélective du tétrapeptide:



Tout au long de la synthèse, la chaîne latérale des deux Asn est resté protégée par le groupe 4,4'-diméthoxybenzylidyle ou Mbh ( fig. 3.15) résistant à l'hydrogénation catalytique, mais est clivé par le TFA. (König, 1970). A l'opposé de la synthèse en phase solide, nous avons choisi de protéger les fonctions carboxamides par un groupement hydrophobe afin de faciliter les recristallisations et précipitations au cours des étapes intermédiaires de la synthèse.

Les fonctions  $\alpha$ -amines ont été protégées par le groupe Boc pour Asn<sub>1</sub> ou par le groupe 2-nitrophénylsulfényle (Nps) pour Ala<sub>2</sub> et Asn<sub>3</sub> (Zervas, 1963), (fig 3.16). Ce dernier groupement est éliminé sélectivement à chacune des étapes intermédiaires par action du bromhydrate de pyridine en présence d'indole (König,

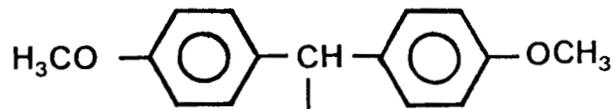


Figure 3.15: groupe 4,4'-diméthoxybenzhydryle (Mbh)

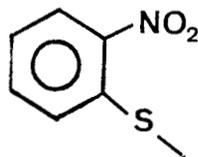


Figure 3.16: groupe ortho-nitrophenylsulfenyl (Nps)

1971 ; Klostermeyer, 1973 ; Sakarellos, 1976) . Les autres groupements de protection temporaire ne sont pas touchés dans ces conditions.

Le groupe Z, qui protégeait initialement la fonction  $\alpha$ -amine de Asn<sub>3</sub> a été éliminée par hydrogénation catalytique.

La fonction  $\alpha$ -carboxylique de Pro a été protégée par un ester benzylique (O-Bzl), pendant toute la durée de la synthèse.

#### 3.2.2.2. méthodes d'activation

Nous avons d'abord réalisé les couplages par la méthode des anhydrides mixtes car c'est une technique rapide qui ne nécessite pas l'isolement et la purification des acides aminés activés avant leur couplage, contrairement aux esters activés. Nous avons suivi les recommandations d'Anderson (1967).

Le mécanisme réactionnel se déroule en deux étapes:

- 1) activation à -15°C de la fonction carboxylique de l'acide aminé N-protégé par le chloroformiate d'isobutyle pour former l'anhydride mixte,
- 2) aminolyse à -10°C de l'anhydride formé par la fonction amine du peptide en cours d'élongation ou de l'acide aminé C-protégé pour obtenir la liaison peptidique attendue (fig.3.17).

Chaque produit intermédiaire a été purifié par recristallisation

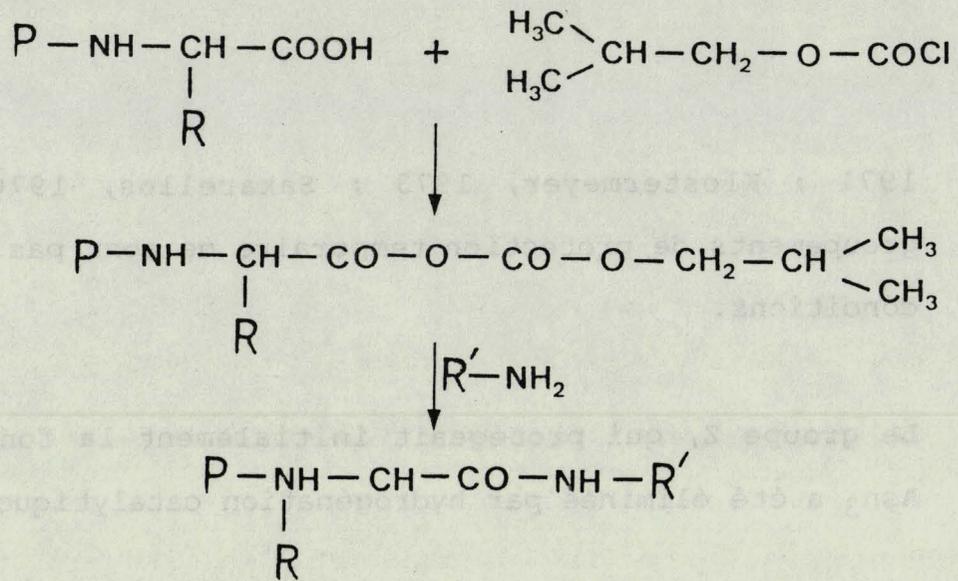


Figure 3.17: couplage par la méthode des anhydrides mixtes

CCM dans: butanol/acide acétique/eau:  $R_f = 0,13$   
 butanol/pyridine/acide acétique/eau:  $R_f = 0,29$

analyse d'acides aminés		
quantité	théorique	trouvée
Asp	2	2,29
Ala	1	0,93
Pro	1	0,85

Figure 3.18: caractérisation du tétrapeptide

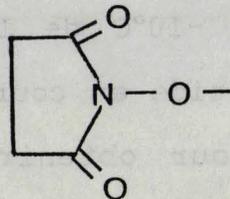


Figure 3.19: ester N-hydroxysuccinimide (-OSu)

ou précipitation, puis chromatographie sur colonne de silice si nécessaire. Le tétrapeptide obtenu a été caractérisé et contrôlé par analyse d'acides aminés et CCM (fig. 3.18). Malheureusement les rendements de couplage des acides aminés, (20 à 43%), ne furent pas aussi bons que nous l'espérions.

Pour améliorer ces rendements, nous avons utilisé une autre méthode d'activation : l'ester activé N-hydroxysuccinimidique (-OSu) (Anderson, 1964) (fig. 3.19). Cette méthode contraint à préparer et isoler l'ester activé par action de la N-hydroxysuccinimide (HOSu) sur la fonction  $\alpha$ -carboxylique de l'acide aminé au moyen de la dicyclohexylcarbodiimide, puis de coupler l'ester activé sur la fonction  $\alpha$ -amine déprotégée, soit de Pro-OBzl, soit du peptide en cours de formation.

Nous avons préparé le dipeptide et le tripeptide par cette méthode. Le dipeptide Nps-Asn(Mbh)-Pro-OBzl a été synthétisé avec un faible rendement de synthèse (47%) qui est proche de celui obtenu par activation aux anhydrides mixtes (43%). Par contre, le tripeptide Nps-Ala-Asn(Mbh)-Pro-OBzl a été obtenu facilement avec un rendement (84%), qui est meilleur que celui obtenu par activation aux anhydrides mixtes (41%).

Quelle que soit la méthode d'activation utilisée, la synthèse présente des rendements trop faibles pour envisager la préparation de quantités importantes de tétrapeptides. En effet, les rendements étant cumulatifs, nous ne pouvions entreprendre une longue synthèse dans ces conditions.

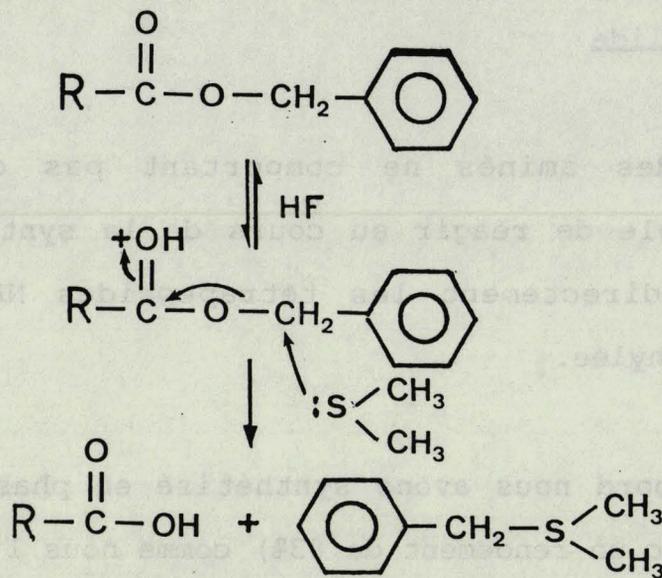
### 3.2.3. Synthèse de (NANP)<sub>4</sub> par couplage de fragments en phase solide

Les acides aminés ne comportant pas de chaîne latérale susceptible de réagir au cours de la synthèse, nous avons pu coupler directement les tétrapeptides NANP sur une résine chlorométhylée.

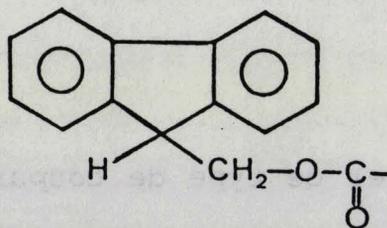
Tout d'abord nous avons synthétisé en phase solide le peptide NANP (avec un rendement de 83%) comme nous l'avons déjà décrit au paragraphe 2.2.1.

Ensuite pour séparer le peptide de la résine, nous avons employé une méthode de coupure selon un mécanisme différent: "low HF" (Tam, 1982). La coupure classique "high HF" (HF/para-crésol : 90ml/10ml) est effectuée selon un mécanisme S<sub>N</sub>1, générateur de carbocations qui sont des agents alkylants et acylants. Il est possible de les éviter en modifiant les conditions de clivage afin de réaliser la coupure HF selon un mécanisme S<sub>N</sub>2 (Tam, 1983).

Pour favoriser ce type de coupure, le fluorure d'hydrogène est dilué dans le diméthylsulfure (DMS), réactif nucléophile, très volatil (fig.3.20). Le peptide a été déprotégé et clivé de la résine par une solution de HF/DMS/para-crésol : 25ml/65ml/10g. Dans ces conditions le DMS reste non protoné au contraire des groupements protecteurs. Après traitement de la peptidyl-résine par "low HF" à 0°C pendant deux heures, le peptide brut a été



**Figure 3.20: coupure au fluorure d'hydrogène type  $S_N2$**



**Figure 3.21: groupe fluorénylméthylloxycarbonyle (Fmoc)**

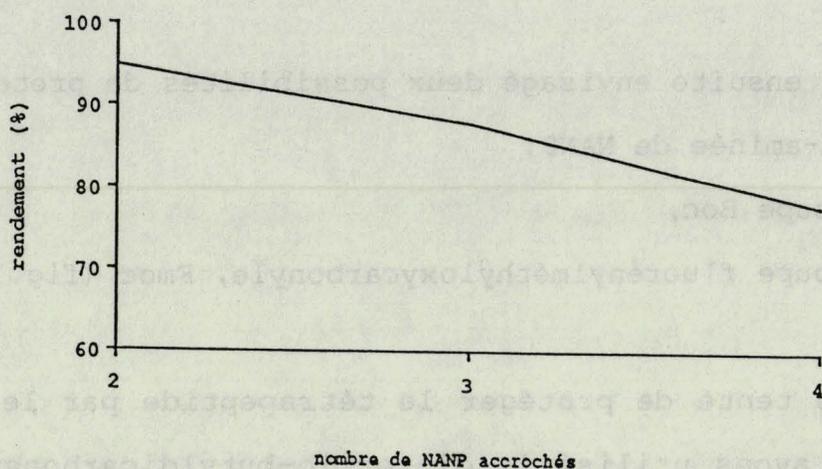
purifié sur Sephadex G10 (rendement=56%).

Nous avons ensuite envisagé deux possibilités de protection de la fonction  $\alpha$ -aminée de NANP:

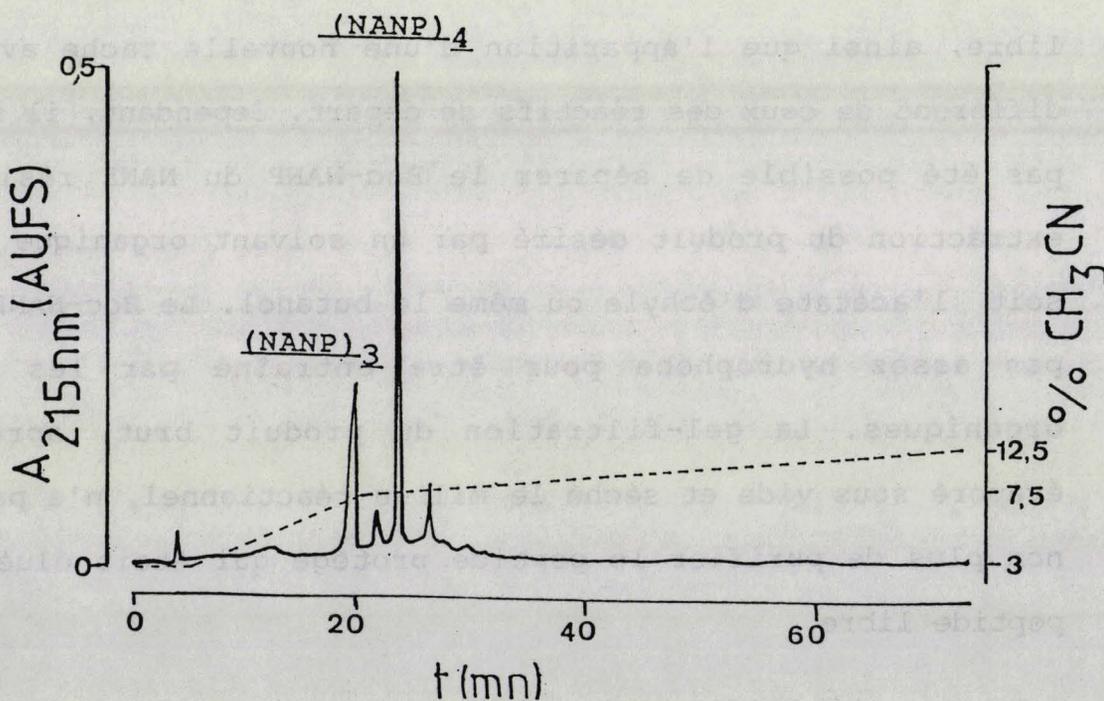
- le groupe Boc,
- le groupe fluorénylméthylloxycarbonyle, Fmoc (fig. 3.21).

Nous avons tenté de protéger le tétrapeptide par le groupement Boc. Nous avons utilisé le di-tertio-butylidicarbonate  $(\text{Boc})_2\text{O}$ , que nous avons ajouté à une solution de NANP dans un mélange eau/dioxane en présence de soude (Bodanszky, 1984). Le pH a été contrôlé tout au long de la réaction et nous avons vérifié par CCM la disparition de la tache correspondant au tétrapeptide libre, ainsi que l'apparition d'une nouvelle tache avec un  $R_f$  différent de ceux des réactifs de départ. Cependant, il ne nous a pas été possible de séparer le Boc-NANP du NANP résiduel par extraction du produit désiré par un solvant organique, que ce soit l'acétate d'éthyle ou même le butanol. Le Boc-NANP n'étant pas assez hydrophobe pour être entraîné par les solvants organiques. La gel-filtration du produit brut, après avoir évaporé sous vide et séché le milieu réactionnel, n'a pas permis non plus de purifier le peptide protégé qui était élué avec le peptide libre.

Nous avons alors opté pour une protection par le groupement fluorénylméthylloxycarbonyle (Fmoc), introduit sous forme de chlorure de fluorenylméthylloxycarbonyle dans le dioxane en présence de carbonate de sodium (Chang, a, 1980,). Après



**Figure 3.22: évolution de la synthèse par couplage de fragments**



Nucléosil C18 Macherey-Nagel  
 débit = 1ml/mn  
 phase mobile: eau/acétonitrile/TFA 1/1000°

**Figure 3.23: RP-HPLC du peptide brut obtenu par couplage de fragments**

extraction par le butanol et recristallisation dans l'hexane, nous avons obtenu le produit désiré avec un rendement de 49%.

Afin de faciliter la synthèse, nous avons préféré coupler le premier fragment protégé sur un tétrapeptide NANP déjà ancré sur une résine chlorométhylée. Les couplages étaient effectués deux fois (un premier couplage avec 1,5 équivalent pendant 24 heures, un deuxième couplage avec un équivalent pendant 48 heures) en présence de DCC et HOBt, suivis systématiquement par une acétylation. La fonction  $\alpha$ -amine du peptide en cours d'élongation était déprotégée par la pipéridine (50% dans le DMF) (Chang, b, 1980). Nous avons poursuivi la synthèse et couplé deux fragments NANP supplémentaires selon le même protocole Fmoc/pipéridine.

Les tests de Kaiser étant peu fiables, nous suivions l'évolution de la synthèse par dosage spectrophotométrique (301 nm) des éluats de filtration après déprotection. Pour chaque couplage, les rendements estimés par rapport à l'étape précédente varient entre 78 et 95% (fig. 3.22).

En fin de synthèse, le peptide fut séparé de la résine par traitement au fluorure d'hydrogène et contrôlé par RP-HPLC. Nous avons pu vérifier la présence du peptide (NANP)<sub>4</sub> dans le produit brut, mais aussi l'apparition d'un pic correspondant à un fragment plus court, (NANP)<sub>3</sub> (fig. 3.23). Ceci peut s'expliquer par la difficulté pour le tétrapeptide d'accéder à la chaîne peptidique ancrée sur la résine, lors du dernier couplage. Nous

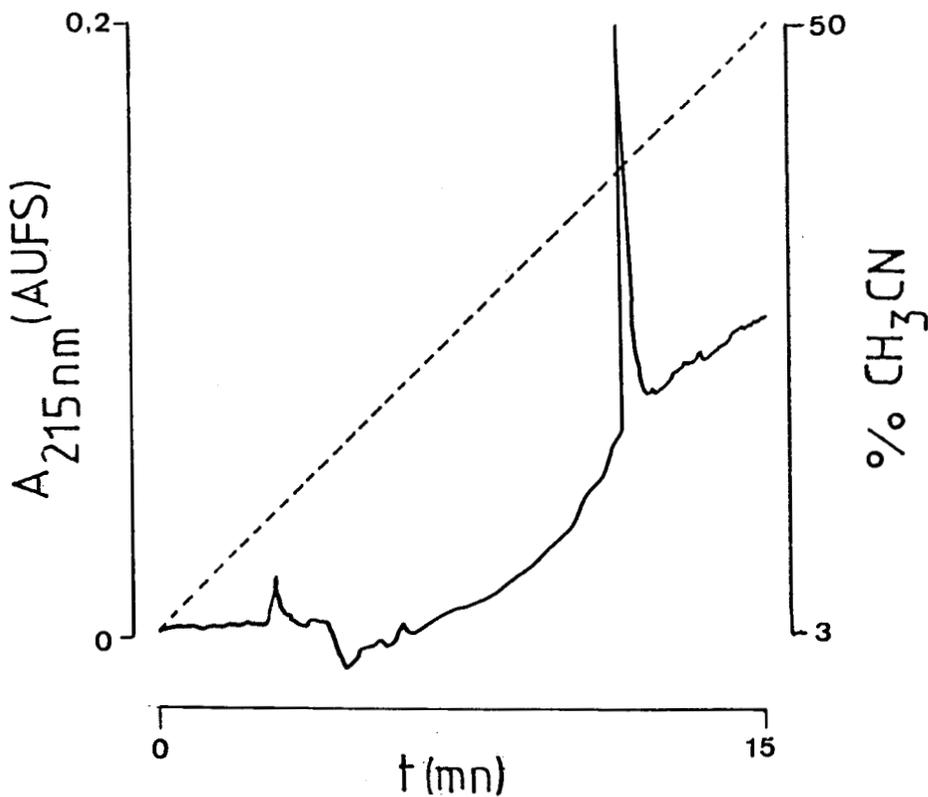
avons remarqué, au cours des nombreuses synthèses effectuées en phase solide, que l'élongation de la chaîne peptidique devenait plus difficile lorsque 10-12 acides aminés étaient accrochés sur la résine. Ce phénomène est sans doute lié aux capacités de repli de la chaîne peptidique, masquant ainsi ses fonctions réactives.

Le peptide brut a été purifié par RP-HPLC semi-préparative sur Nucleosil C18, et nous l'avons contrôlé par HPLC analytique, CCM et analyse d'acides aminés.

### 3.3 Etude de ciblage

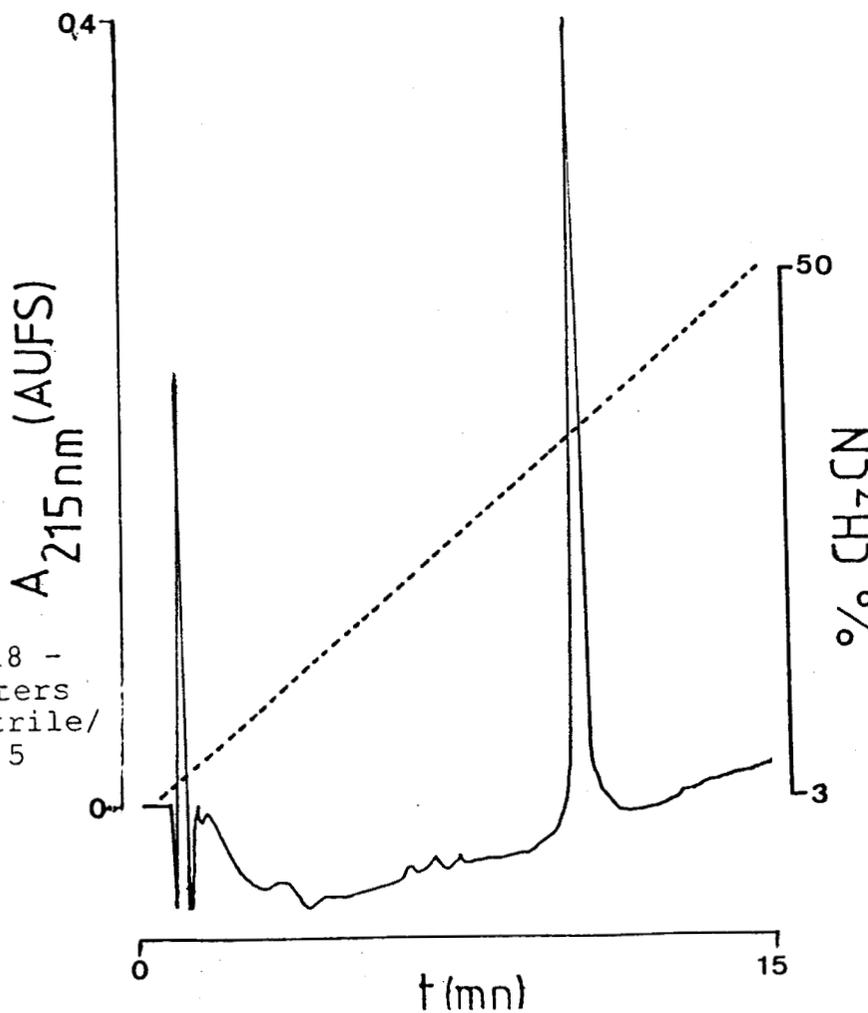
Les anticorps de souris obtenus après immunisation avec soit le sporozoïte de *P. falciparum*, soit plusieurs protéines recombinantes, ou soit les peptides (NANP)<sub>2</sub> et (NANP)<sub>4</sub> émulsifiés dans l'adjuvant complet de Freund, sont capables d'inhiber *in vitro* la pénétration de sporozoïtes de *P. falciparum* dans un système de culture d'hépatocytes humains (Mazier, 1986).

Nous avons supposé que les séquences répétitives (NANP)<sub>n</sub> pouvaient être impliquées dans la reconnaissance des sporozoïtes par les hépatocytes. Pour vérifier cette hypothèse nous avons préparé trois peptides, marqués à la fluorescéine. Nous avons choisis trois peptides, de séquence relativement longue, (NANP)<sub>3</sub>, (NANP)<sub>6</sub> et (NANP)<sub>8</sub> de manière à déterminer la structure minimale qui pourrait servir de récepteur pour le sporozoïte.



RP-HPLC sur  $\mu$ -Bondapack C18 - Waters  
 débit = 2 ml/mn  
 phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.24: Caractérisation de FITC-(NANP)<sub>3</sub>



RP-HPLC sur  $\mu$ -Bondapack C18 - Waters  
 débit = 2 ml/mn  
 phase mobile: eau/acétonitrile/  
 tampon phosphate à pH = 2,5

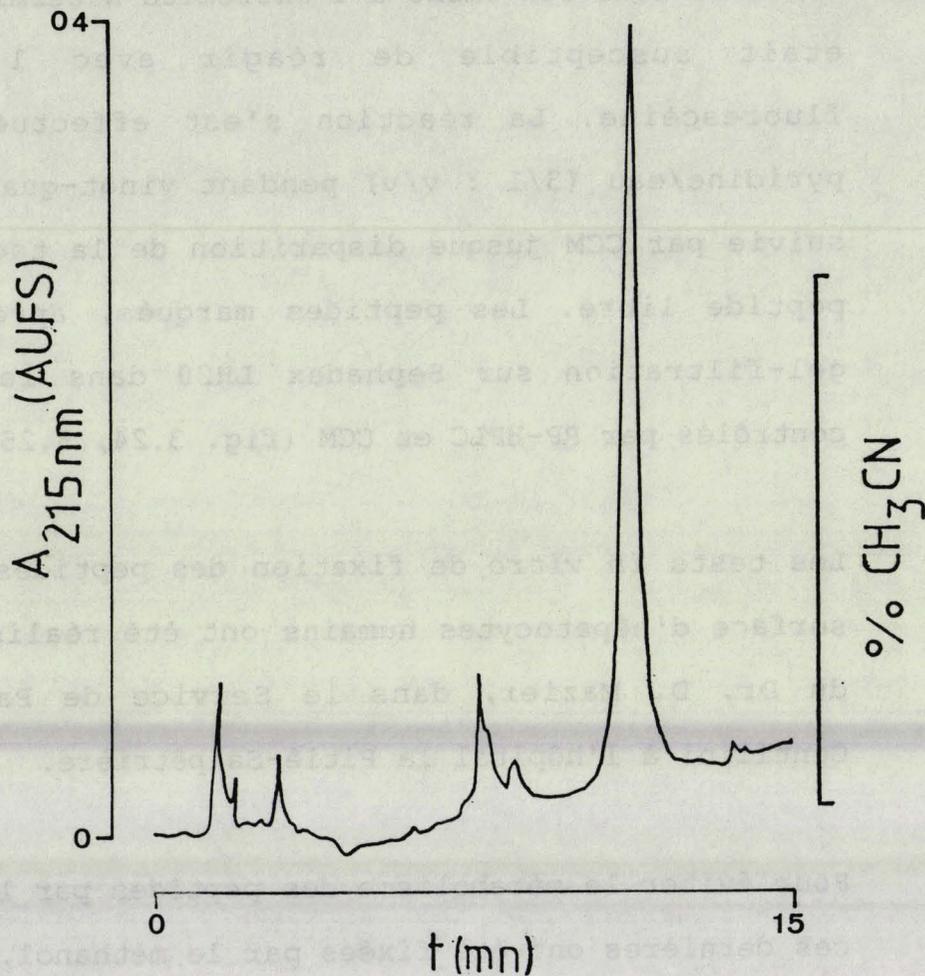
Figure 3.25: Caractérisation de FITC-(NANP)<sub>6</sub>

Seule la fonction amine à l'extrémité N-terminale de ces peptides était susceptible de réagir avec l'isothiocyanate de fluorescéine. La réaction s'est effectuée dans un mélange pyridine/eau (3/1 : v/v) pendant vingt-quatre heures et a été suivie par CCM jusque disparition de la tache correspondant au peptide libre. Les peptides marqués, après purification par gel-filtration sur Sephadex LH20 dans le méthanol, ont été contrôlés par RP-HPLC et CCM (fig. 3.24, 3.25 et 3.26).

Les tests *in vitro* de fixation des peptides fluorescents à la surface d'hépatocytes humains ont été réalisés avec le concours du Dr. D. Mazier, dans le Service de Parasitologie du Pr. Gentilini à l'hôpital la Pitié-Salpêtrière.

Pour éviter le métabolisme des peptides par les cellules du foie, ces dernières ont été fixées par le méthanol. Nous n'avons jamais mis en évidence, au microscope à immersion, de fluorescence significative à la surface des hépatocytes humains, Nous observions au contraire une fluorescence non spécifique, à forte concentration de peptides (quel que soit le peptide testé). L'affinité des peptides à la surface des sporozoïtes de *P. falciparum* ne purent non plus être observés par ces contrôles.

Nos études n'ont pu prouver l'implication des structures répétitives de NANP dans la reconnaissance des hépatocytes par les sporozoïtes. Ceci a été confirmé ultérieurement par Aley, qui a montré également qu'un peptide de 10 acides aminés (correspondant à la partie de la région fortement conservée I,



RP-HPLC sur  $\mu$ -Bondapack C18 - Waters

débit = 2 ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

**Figure 3.26: Caractérisation de FITC-(NANP)<sub>8</sub>**

immédiatement adjacente à la zone de répétition) reconnaissait spécifiquement des récepteurs à la surface de cultures cellulaires d'hépatômes humains (Aley, 1986).

#### 3.4. Etudes conformationnelles

Selon les travaux de Dane (1984), les propriétés antigéniques des peptides comprenant un nombre relativement restreint de tétrapeptides ne doivent pas être éloignées de celles de la protéine CS. Ces résultats suggèrent que ces peptides pourraient adopter une conformation proche de celle trouvée dans la protéine CS.

Différentes structures ont été prédites à partir de calculs théoriques sur des peptides contenant un grand nombre répétitif NANP associées (Gibson, 1987 - Brooks, 1987).

Nous avons voulu déterminer le nombre de tétrapeptides, NANP, à associer pour permettre l'organisation d'une structure secondaire définie, et apprécier l'influence de la conformation sur l'antigénicité.

Nous avons d'abord étudié par dichroïsme circulaire les huit peptides  $(\text{NANP})_n$  avec  $n$  variant de 1 à 8. Nous n'avons pu mettre en évidence aucune organisation particulière dans l'eau ni dans les solvants organiques tels que le trifluoroéthanol (TFE), le diméthylsulfoxyde (DMSO), ou le dioxane. Mais ces résultats

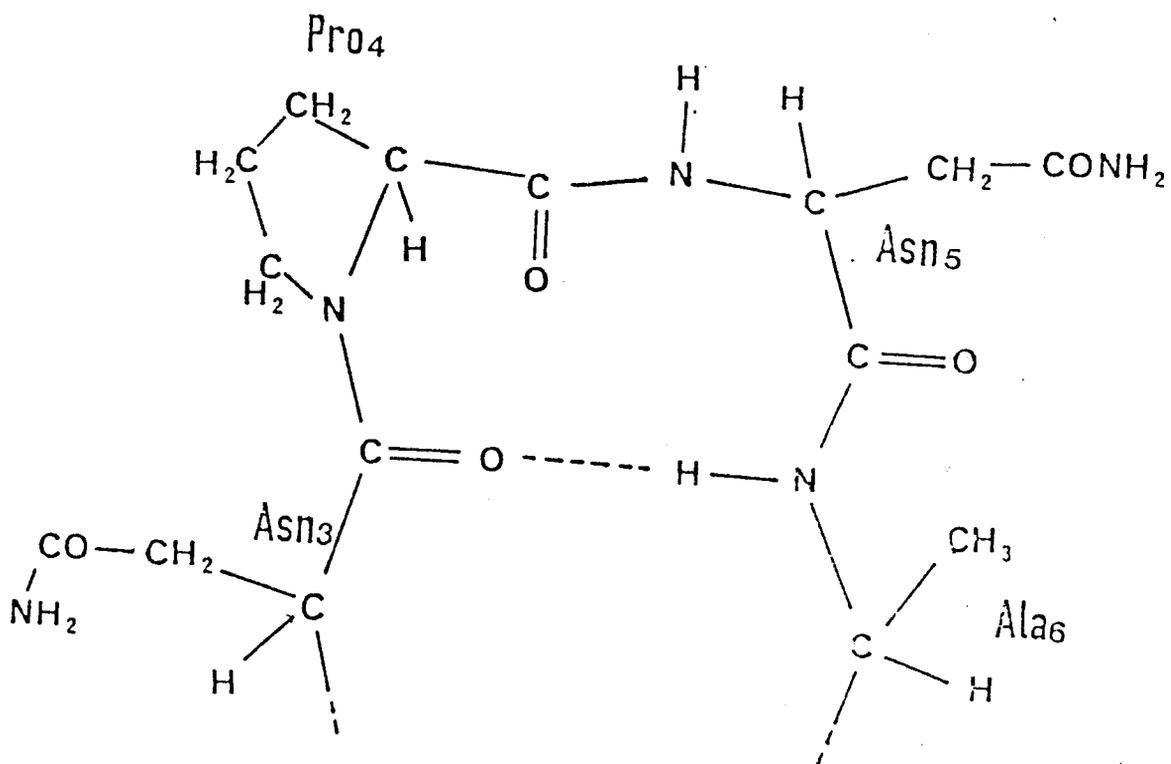


Figure 3.27: coude B type 1

n'excluent pas la possibilité d'organisation de ces peptides sous d'autres structures que celles indiquées par dichroïsme circulaire.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) à deux dimensions a permis de définir la structure adoptée par ces peptides. Les études ont été réalisées par le Dr. B. Perly, spécialiste de la RMN au CEN de Saclay. Nous ne présenterons dans ce chapitre que les résultats des études de RMN qui nous ont permis de mesurer l'influence de la structure secondaire sur les études immunologiques.

Les premières expériences réalisées dans l'eau furent décevantes. Par contre, les spectres effectués dans le DMSO témoignent d'une organisation des peptides.

Au contraire du tétrapeptide NANP qui n'a pas de structure secondaire particulière, le peptide  $(\text{NANP})_2$  est organisé. Plus précisément, c'est le tétrapeptide central NPNA qui adopte une conformation de coude  $\beta$  type 1, dans laquelle la proline est située en position 2 (fig 3.27). Cette conformation est stabilisée par une liaison hydrogène entre Asn en position 1 et Ala en position 4. Les résultats sont en accord avec ceux tirés de la littérature : Pro occupe souvent la seconde place d'un coude  $\beta$  type 1, alors que Asn a tendance à prendre la première place (Ghelis, 1982).

Dans ces conditions, l'octapeptide  $(\text{NANP})_2$  ou  $\text{NA}(\text{NPNA})\text{NP}$  doit

être considéré non plus comme une double séquence de répétition sur la base de structure primaire mais comme une simple unité de structure sur la base de structure secondaire.

Quand un troisième tétrapeptide est ajouté, pour former le peptide  $(\text{NANP})_3$ , une seconde séquence NPNA organisée en coude  $\beta$  type 1 apparaît. Un effet coopératif qui stabilise le peptide  $(\text{NANP})_3$  est mis en évidence. Autrement dit, le dodécapeptide  $\text{NA}(\text{NPNA})_2\text{NP}$  possède une organisation plus stable que l'octapeptide  $\text{NA}(\text{NPNA})\text{NP}$ .

Aucune modification importante n'a pu être mise en évidence quand plus de trois NANP sont associés, même pour le peptide  $(\text{NANP})_8$ . Chaque unité ajoutée à  $(\text{NANP})_3$  s'organise de la même manière.

Par modélisation moléculaire et minimisation d'énergie, nous avons vérifié la présence de la liaison hydrogène du coude  $\beta$  type 1 entre  $1\text{CO}_{\text{Asn}}$  et  $4\text{NH}_{\text{Ala}}$ , au niveau de la séquence NPNA. Ces études ont été réalisées par Dr. G. Vergoten au CERIM à Lille.

### 3.5. Influence de la structure secondaire sur l'antigénicité des peptides

Bien que ces études soient réalisées dans le DMSO, il nous a paru très intéressant de les corrélérer avec les résultats biologiques. En effet, le potentiel d'organisation que possède le peptide, dans un solvant tel que le DMSO, peut être exprimé quand ce peptide interagit avec une structure macromoléculaire telle que

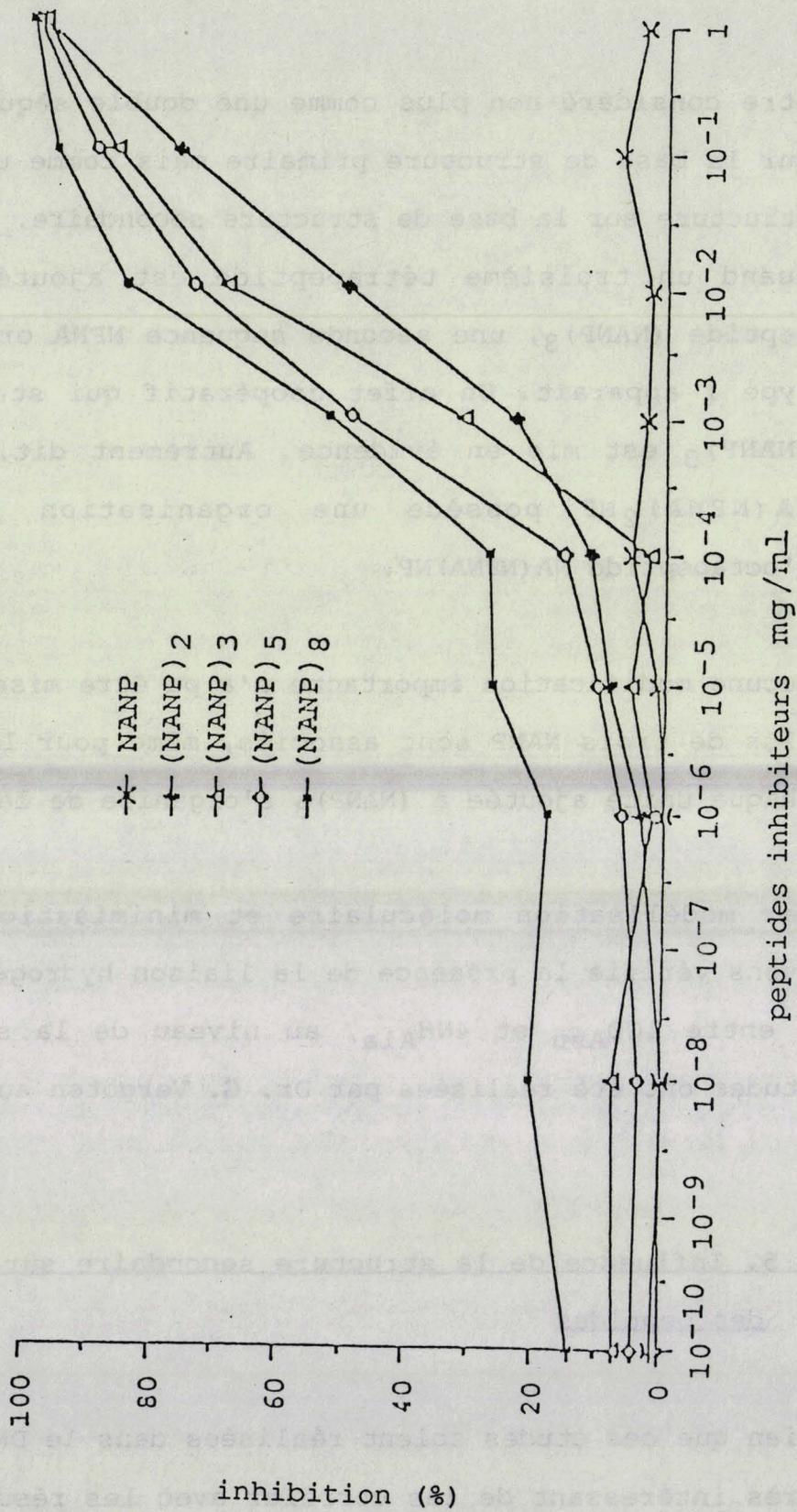


Figure 3.28: inhibition d'ELISA

la zone de liaison de l'anticorps, ou une membrane cellulaire. Nous devons tenir compte du fait que les anticorps sont dirigés contre la protéine native, qui est repliée à la surface du parasite.

La capacité de différents peptides  $(\text{NANP})_n$  d'inhiber la liaison entre un anticorps monoclonal anti-sporozoïte et une protéine recombinante  $\text{R32tet}_{32}$ , a été testée en ELISA par le Dr. P. Druilhe et A. Londono dans le Service de Parasitologie du Dr. Gentilini à l'hôpital la Pitié-Salpêtrière. La protéine recombinante  $\text{R32tet}_{32}$  (Young, 1985) contient 30 (NANP) et 2 peptides mutants (NVDP) .

Bien que n'ayant pas réalisé personnellement l'inhibition d'ELISA, nous pouvons néanmoins en rappeler brièvement le principe. Le test consiste à faire réagir l'anticorps monoclonal, préalablement incubé avec les peptides (NANP),  $(\text{NANP})_3$ ,  $(\text{NANP})_5$  et  $(\text{NANP})_8$  sur la protéine recombinante fixée sur une plaque de polyéthylène. Le pourcentage d'inhibition des différents peptides est estimé en fonction de leur concentration.

Cette expérience (fig. 3.28) montre que parmi les peptides testés, seul NANP est inactif. Les peptides  $(\text{NANP})_3$ ,  $(\text{NANP})_5$  et  $(\text{NANP})_8$  sont légèrement plus inhibiteurs que  $(\text{NANP})_2$ . La courbe d'inhibition ne met pas en évidence de différence majeure entre les trois plus longs peptides. Cependant cette observation est limitée à l'emploi d'un seul anticorps monoclonal.

Les résultats de ces études sont en accord avec les expériences décrites dans la littérature:

- Zavala a pu déterminer que (NANP)<sub>3</sub> et (NANP)<sub>4</sub> inhibaient fortement, et avec la même efficacité la liaison de différents anticorps monoclonaux aux extraits de sporozoïtes. Au contraire (NANP)<sub>2</sub> se révéla un pauvre inhibiteur (Zavala, 1985).
- les peptides, dont la séquence contient au moins 2 NPNA, ont été capables de stimuler in vitro les cellules T alors que le peptide (NANP)<sub>2</sub> qui contient un NPNA, était beaucoup moins actif. Néanmoins les essais de prolifération de cellules T par différents peptides (NANP)<sub>n</sub> ont montré cependant des résultats hétérogènes sur des souris qui étaient immunisées soit avec des peptides (Togna, 1986) soit avec une protéine recombinante (Good, 1986).
- le peptide (NANP)<sub>3</sub> couplé à l'anatoxine tétanique a été administré en présence d'hydroxyde d'aluminium chez des volontaires humains. La plupart des sérums, contenant des anticorps anti-NANP détectés par ELISA, réagissent avec les sporozoïtes de *P. falciparum*. (Herrington 1987). Un retard significatif de la parasitémie a pu être observé.

### 3.6. Elaboration d'immunogènes synthétiques

Nous avons consacré une partie de nos recherches à préparer des

immunogènes synthétiques caractérisés chimiquement, qui soient utilisables en vaccination chez l'homme. Nous avons cherché à potentialiser l'immunogénicité par :

- construction d'un modèle de présentation de l'antigène, capable de retarder sa dispersion,
- association des antigènes (NANP)<sub>4</sub> et (NANP)<sub>8</sub> par liaison covalente à un adjuvant : le muramyl-dipeptide (MDP).

### 3.6.1 Construction d'un modèle de présentation au système immunitaire

L'utilisation de protéines porteuses pose un certain nombre de problèmes (réactions croisées avec les protéines de l'organisme, sensibilisation à la protéine porteuse, suppression épitopique). Les recherches actuelles s'orientent vers l'emploi de porteurs synthétiques, dénués de toxicité.

Hopp a mis au point un acide gras, le dipalmityl-lysine, sur lequel un antigène synthétique peut être greffé. Les conjugués obtenus sont chimiquement caractérisés, et possèdent une pureté supérieure à celle obtenue avec des protéines usuelles (Hopp, 1984).

Dans notre laboratoire le Professeur C. Sergheraert a conçu et synthétisé un acide hydrophobe original, qui porte une fonction amine primaire protégée par un groupement Boc afin de permettre son utilisation en phase solide.

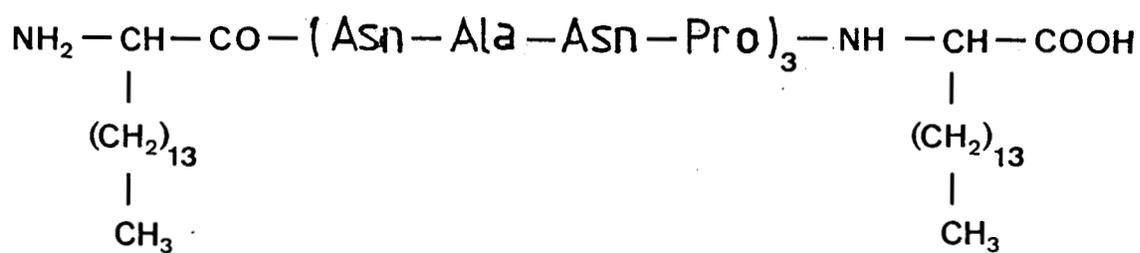


Figure 3.29: modèle de présentation de l'antigène peptidique (NANP)<sub>3</sub>

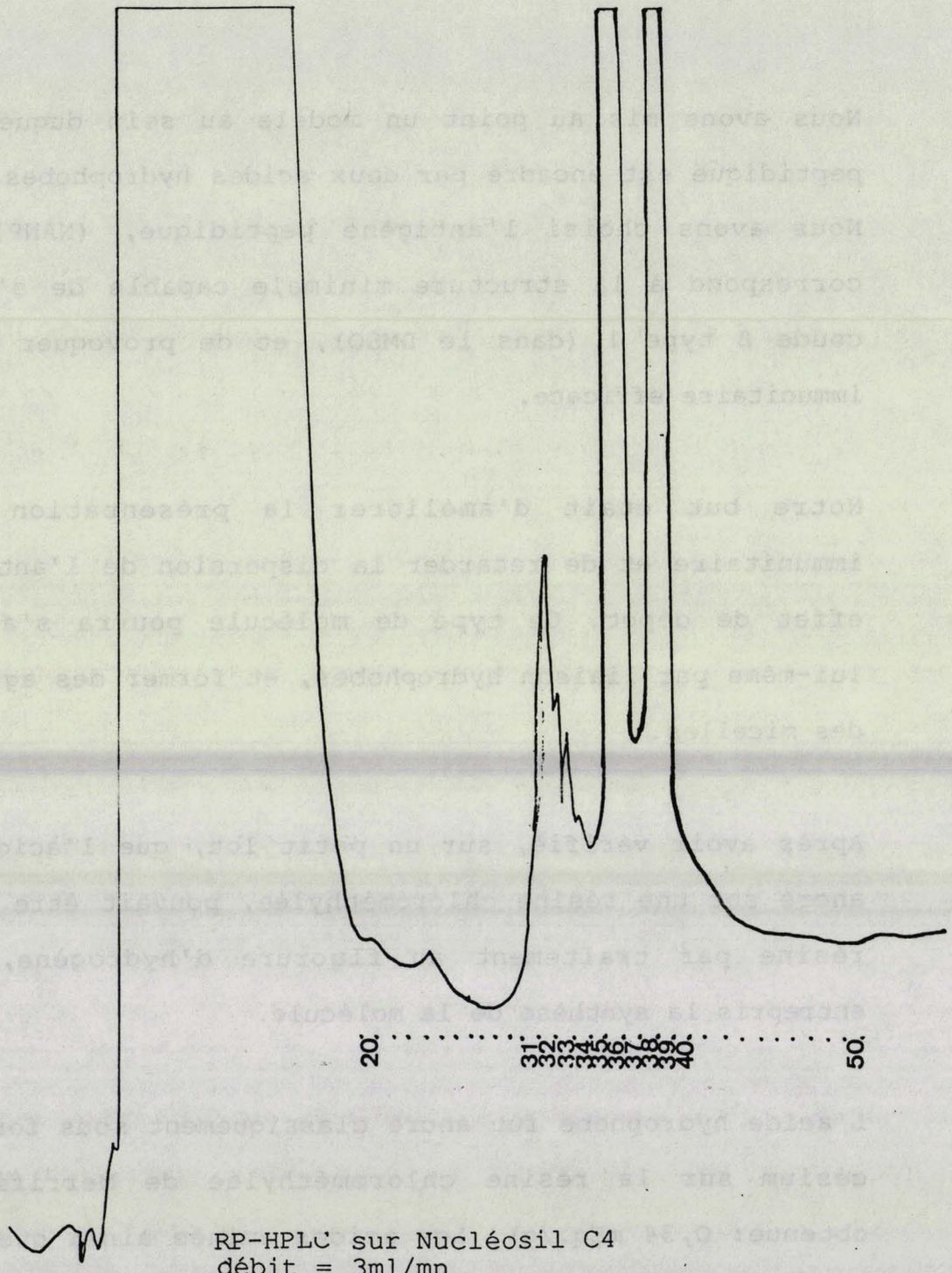
Nous avons mis au point un modèle au sein duquel l'antigène peptidique est encadré par deux acides hydrophobes (fig. 3.29). Nous avons choisi l'antigène peptidique, (NANP)<sub>3</sub> puisqu'il correspond à la structure minimale capable de s'organiser en coude  $\beta$  type 1 (dans le DMSO), et de provoquer une réaction immunitaire efficace.

Notre but était d'améliorer la présentation au système immunitaire et de retarder la dispersion de l'antigène par un effet de dépôt. Ce type de molécule pourra s'associer avec lui-même par liaison hydrophobes, et former des agrégats, voire des micelles.

Après avoir vérifié, sur un petit lot, que l'acide hydrophobe ancré sur une résine chlorométhylée, pouvait être libéré de la résine par traitement au fluorure d'hydrogène, nous avons entrepris la synthèse de la molécule.

L'acide hydrophobe fut ancré classiquement sous forme de sel de césium sur la résine chlorométhylée de Merrifield (charge obtenue: 0,34 mEq./g). Les acides aminés ainsi que le deuxième acide hydrophobe furent couplés par synthèse récurrente totale, selon le protocole Boc/TFA. L'efficacité des couplages a été vérifiée par le test qualitatif de Kaiser.

Après clivage par le fluorure d'hydrogène 1 heure à 0°C en présence de p.crésol ("high HF"), le produit brut qui a été obtenu avec un rendement de 77% fut élué sur Sephadex LH20 dans



RP-HPLC sur Nucléosil C4  
 débit = 3ml/mn  
 phase mobile: eau/acétonitrile/TFA 1/1000°

**Figure 3.30: RP-HPLC semi préparative de (NANP)<sub>3</sub> encadré par les acides hydrophobes**

un mélange DMF/H<sub>2</sub>O, et contrôlé par RP-HPLC sur Nucleosil C4. Le chromatogramme obtenu indiquait la présence de deux pics principaux que nous avons séparés par RP-HPLC semi-préparative sur Nucleosil C4 (fig. 3.30).

Les fractions correspondant à chaque pic d'HPLC furent collectées, lyophilisées et contrôlées par :

- **CCM**: chaque fraction était révélée par le réactif de Reindel-Hoppe, ce qui signifie qu'ils comportent des liaisons peptidiques.
- **analyse d'acides aminés**: les deux fractions présentent une analyse similaire en acide aspartique, alanine et proline.
- **spectroscopie de masse FABS**: les spectres indiquent la présence du produit désiré dans les deux fractions.

Deux acides aminés hydrophobes étant introduits au cours de la synthèse sous la forme racémique, le produit de synthèse contient alors quatre diastéréoisomères. Ceci a été confirmé par l'ensemble des contrôles ci-dessus (fig. 3.31). Les deux pics observés par RP-HPLC correspondent à des diastéréoisomères différents qui présentent la même composition en acides aminés et la même masse moléculaire.

Les études immunologiques sont en cours de réalisation dans le Service d'Immunologie du Dr. Chedid à l'University of South Florida aux USA. Pour immuniser des animaux de laboratoire, le modèle synthétique a été introduit dans des liposomes.

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	2	1,88
Ala	1	1,02
Pro	1	1,10

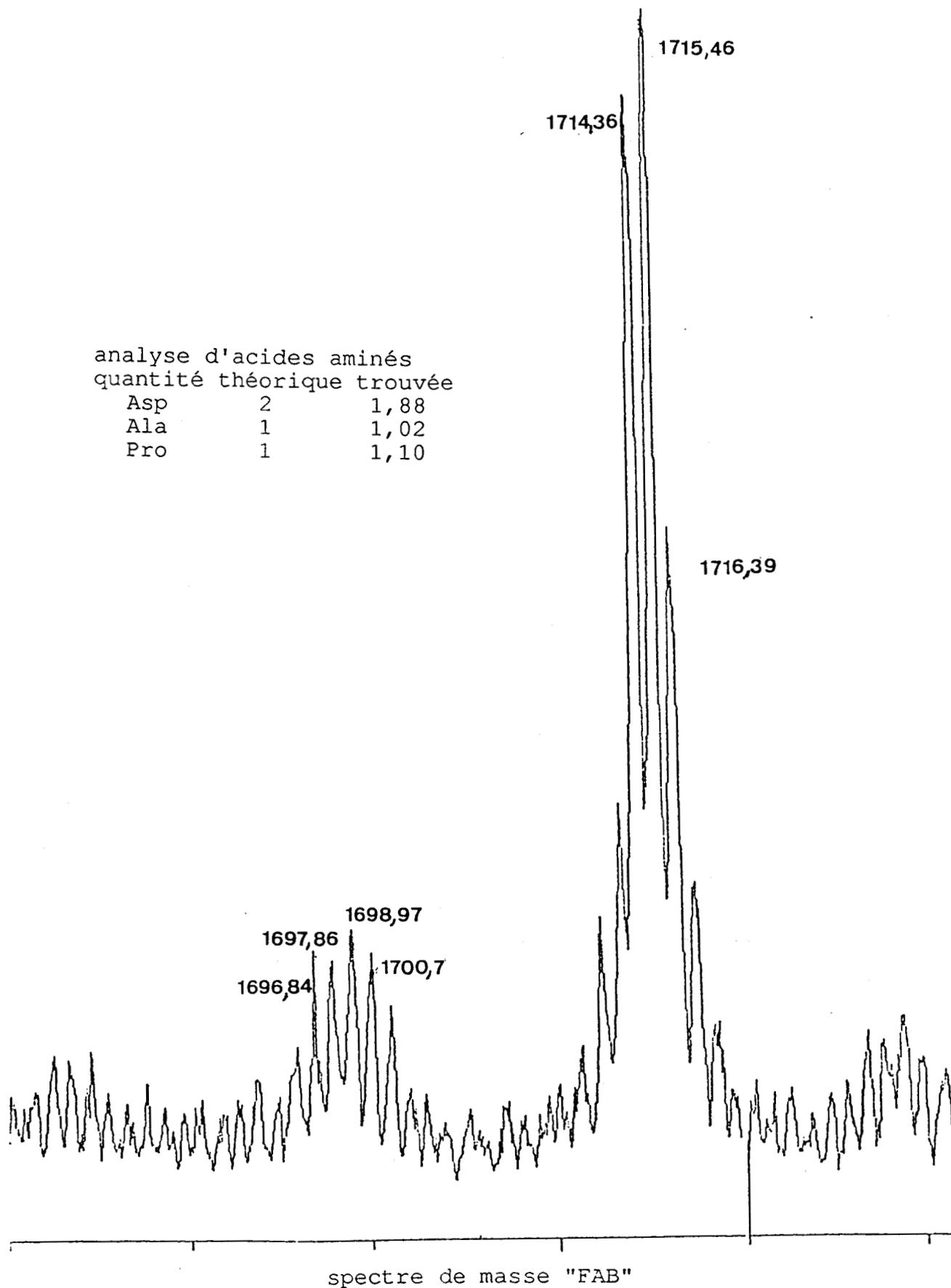


Figure 3.31: contrôle des diastéréoisomères

### 3.6.2. Synthèses des conjugués-MDP

Bien que le MDP présente l'inconvénient d'être pyrogène, ce qui limite son utilisation en vaccination humaine, nous l'avons utilisé pour mettre au point les conditions de couplage. Le protocole de préparation d'immunogènes pourra, par la suite, s'appliquer à d'autres analogues du MDP dépourvus d'activité pyrogène, tel le murabutide (Lefrancier, 1982).

Nous avons choisi parmi les peptides que nous avons synthétisés le peptide le plus long (NANP)<sub>8</sub> ainsi qu'un peptide de séquence relativement courte (NANP)<sub>4</sub>. Nous ne disposions pas à cette époque des renseignements conformationnels fournis par les études de RMN.

#### 3.6.2.1. Synthèse de MDP-(NANP)<sub>4</sub>

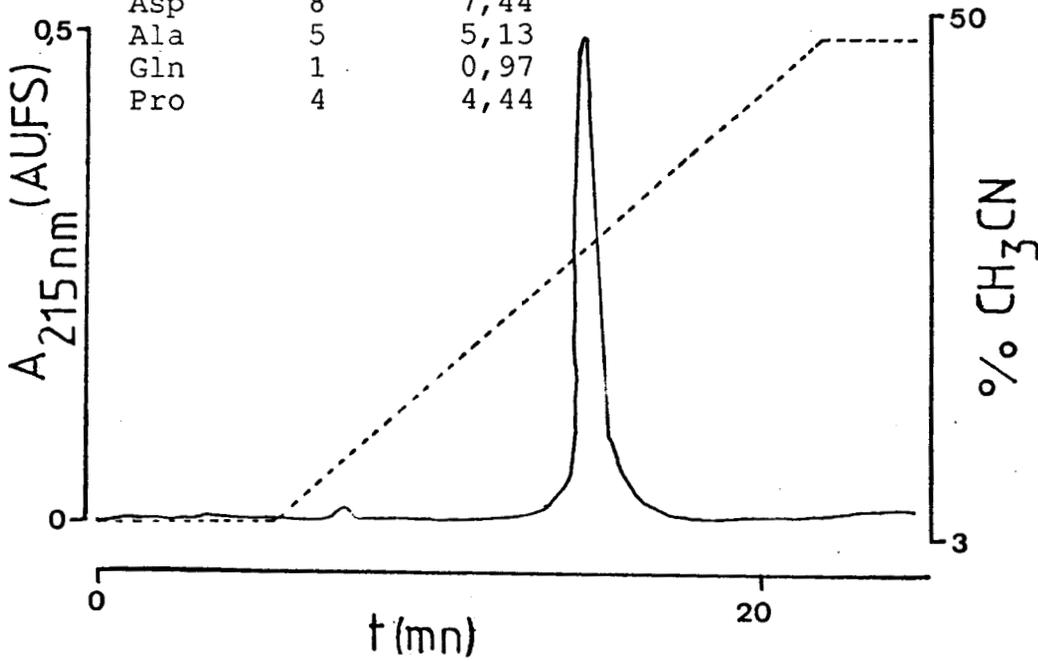
L'obtention de ce produit a été réalisée par une stratégie douce de couplages de fragments en phase homogène.

Nous avons alors activé, au moyen de différentes méthodes, la fonction carboxylique du MDP, avant de le coupler au (NANP)<sub>4</sub> par son unique fonction amine réactive .

L'activation par le chloroformiate d'isobutyle ou l'hexafluorophosphonate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthyl-amino-phosphonium (BOP) (Castro, 1975) s'est révélée

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	8	7,44
Ala	5	5,13
Gln	1	0,97
Pro	4	4,44



RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel  
débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.32: caractérisation de MDP-(NANP)<sub>4</sub>

infructueuse, en dépit des modifications des systèmes de solvants et des temps d'incubation.

Nous avons alors activé, dans le DMF, la fonction carboxylique du MDP par un ester hydroxy-succinimidique (MDP-OSu), au moyen de dicyclohexylcarbodiimide, avant de coupler l'adjuvant à la fonction amine du peptide (NANP)<sub>4</sub> en présence de triéthylamine. Nous avons pris soin d'éliminer l'acide acétique, qui pourrait bloquer la réaction, par élution de (NANP)<sub>4</sub> et du MDP sur Sephadex G10 avec HCl 1/100. L'évolution de la réaction a été suivie par RP-HPLC analytique et CCM, jusque disparition du pic et de la tache correspondant au peptide libre. Le conjugué a été obtenu au bout de soixante-douze heures avec 3 équivalents de MDP-OSu.

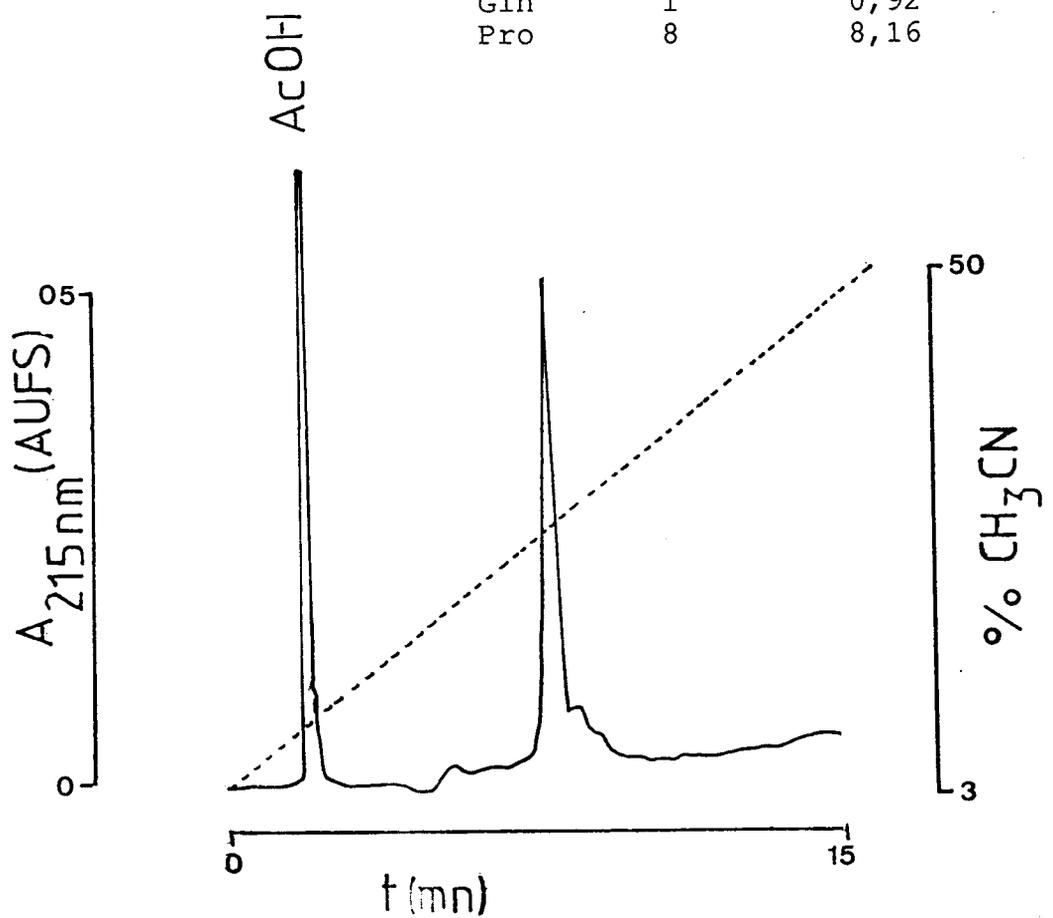
Après avoir repris dans l'eau et lyophilisé le milieu réactionnel, nous avons purifié le produit brut par gel-filtration sur Biogel P2 (ultrafine) dans AcOH 2% pour éviter les absorptions non spécifiques. Nous avons obtenu le produit pur avec un rendement de 39% et l'avons caractérisé par RP-HPLC, analyse d'acides aminés, et chromatographie sur couche mince (fig. 3.32).

#### 3.6.2.2. Synthèse de MDP-(NANP)<sub>8</sub>

Le conjugué fut préparé également par couplage du MDP activé par l'HOSu sur le (NANP)<sub>8</sub> dans le DMF en présence de N-méthylmorpholine.

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	16	16,34
Ala	9	8,87
Gln	1	0,92
Pro	8	8,16



RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel  
débit = 1ml/mn  
phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH=2,5

Figure 3.33: caractérisation de MDP-(NANP)<sub>8</sub>

La disparition du pic correspondant à  $(\text{NANP})_8$ , en RP-HPLC fut observée après 72 heures avec un excès de 7 équivalents en MDP-OSu.

Après élution sur Biogel P2 (ultrafine) avec AcOH 2%, le produit purifié obtenu avec un rendement de 32% fut contrôlé par RP-HPLC, analyse d'acides aminés et chromatographie sur couche mince (fig. 3.33).

#### 3.6.2.3. Résultats immunologiques

Les études immunologiques des conjugués obtenus furent réalisées dans le laboratoire d'Immunothérapie Expérimentale du Dr. L. Chedid à l'Institut Pasteur de Paris.

Les résultats furent décevants: aucun anticorps anti- $(\text{NANP})_4$  ou anti- $(\text{NANP})_8$  n'a été détecté.

Par contre, les peptides  $(\text{NANP})_4$  et  $(\text{NANP})_8$ , couplés à l'anatoxine tétanique et administrés à des souris en présence d'hydroxyde d'aluminium, ont permis de stimuler la formation d'anticorps qui reconnaissent les sporozoïtes et inhibent in vitro leur pénétration dans une culture cellulaire humaine (Lise, 1988).

Pour tenter d'expliquer ces résultats, nous avons émis plusieurs hypothèses.

**Première hypothèse:** les conjugués, en raison de leur hydrophilie, sont métabolisés et éliminés trop rapidement pour être pris en compte par le système immunitaire. Pourtant un modèle synthétique différent, correspondant au LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) couplé au MDP a permis, en dépit de son hydrophilie, de stimuler l'élaboration d'anticorps anti-LHRH (H. Gras-Masse, thèse, 1985). Le modèle hydrophobe précédent (cf. §3.6.1), que nous avons mis au point, permettra d'éclaircir ce problème.

**Deuxième hypothèse:** les conjugués n'ont pas été pris en compte par le système immunitaire, car il manquait des informations indispensables. De nombreux travaux que nous avons déjà cités ont montré que  $(\text{NANP})_3$  correspondait à un épitope B; D'autre part, les lymphocytes T ne sont stimulés *in vitro* par différents peptides  $(\text{NANP})_n$  que chez certaines races de souris (Togna, 1986 - Good, 1986).

Il est apparu ultérieurement que la séquence répétitive de la protéine CS ne contenait pas d'épitope T pour l'homme. L'immunisation réalisée soit avec  $(\text{NANP})_3$  couplé à l'anatoxine tétanique (Herrington, 1987), soit avec la protéine recombinante R32tet<sub>32</sub> (Ballou, 1987) a permis de provoquer l'apparition d'anticorps anti-NANP et de retarder la parasitémie, voire de protéger. Au contraire les essais d'immunisation avec une autre protéine recombinante R32tet<sub>LeuArg</sub> (qui contient la séquence  $(\text{NANP})_{15}(\text{NVDP})_2$  couplé à deux acides aminés Leu et

Arg) se sont révélés inefficaces (Hoffman, 1987). Ceci signifie qu'un épitope T artificiel peut être amené soit par une protéine porteuse telle l'anatoxine tétanique, soit par la protéine recombinante R32tet<sub>32</sub>.

**Troisième hypothèse:** la séquence répétitive, fortement conservée, a peut être une fonction immuno-suppressive qui permet au parasite d'échapper au système immunitaire. Les antigènes (NANP)<sub>4</sub> et (NANP)<sub>8</sub> ont un rôle immunomodulateur possible qui concurrencerait ou s'opposerait à celui du MDP. Afin de vérifier cette éventualité, le Dr. L. Chedid et son équipe ont étudié les propriétés immunopharmacologiques de ces modèles. Les essais préliminaires ont révélé que les conjugués-MDP étaient capables, aussi bien que le MDP seul, de stimuler une réponse immunitaire non spécifique. C'est donc à un autre niveau que celui du MDP, qu'il faut envisager, l'immunomodulation des antigènes.

L'obtention d'un vaccin efficace anti-sporozoïte présentant des difficultés, il nous a semblé particulièrement intéressant d'étudier le stade hépatique, étape qui suit le développement du sporozoïte.

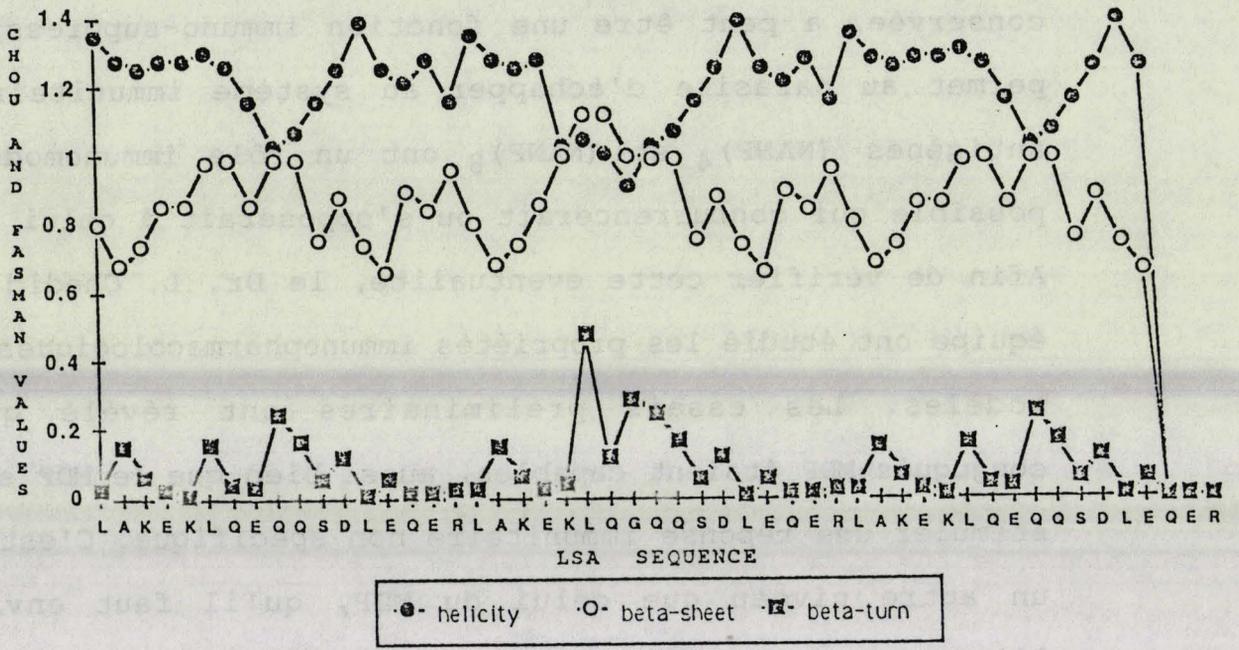


Figure 3.34: prédictions conformationnelles de la protéine LSA

#### 4. ANTIGENE SPECIFIQUE DU STADE HEPATIQUE (LSA)

Récemment un antigène spécifique du LSA a été identifié par criblage d'une banque d'expression génomique du parasite avec des sérums humains obtenus d'individus qui habitaient en zone d'endémie (Marchand, 1987). Le fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui s'exprime dans le clône sélectionné a été séquencé, il comporte une séquence répétitive de 51 nucléotides. La structure primaire, qui a été déduite, contient un motif de répétition de dix-sept acides aminés (tableau 3.2). Il existe une mutation dans une des séquences où une glycine remplace un acide glutamique. La forte conservation de la séquence en acides aminés, contrairement à la séquence en nucléotides, suggère un rôle fonctionnel ou structural pour ces motifs de répétition.

Les prédictions conformationnelles selon Chou et Fasman indiquent que la séquence possède une forte probabilité de s'organiser en hélice  $\alpha$  (fig 3.34).

Les hélices sont des structures qui peuvent être reproduites dans des solutions aqueuses par des peptides synthétiques de séquence relativement courte (13 acides aminés). L'organisation hélicoïdale sera favorisée par des phénomènes qui stabilisent l'hélice tels l'amphiphilie, respect des dipôles aux extrêmités, interactions électrostatiques (Shoemaker, 1987 - Creighton, 1987).

Nous avons synthétisé une série de peptides qui nous ont permis de:

- évaluer leur éventuelle capacité de ciblage,
- localiser un éventuel épitope B majeur,
- apprécier l'influence de son organisation sur l'antigénicité,
- mesurer l'importance de l'extrémité carboxamide sur la capacité d'organisation du peptide,
- déterminer le rôle de l'acide aminé mutant, Gly aussi bien au niveau de l'antigénicité que de l'organisation peptidique.

#### 4.1 Choix des peptides

Nous avons choisi deux peptide de 34 et 41 acides aminés, qui contiennent deux fois l'unité de répétition, avec une glycine dans un des deux motifs LSA 1-34 et LSA(-7)-34 (tableau 3.3). Le peptide de 34 acides aminés nous a servi de référence pour la numérotation des acides aminés, l'acide aminé N-terminal, en l'occurrence Gly, correspond à l'acide aminé 1.

Dans le but de repérer la structure minimale impliquée dans une réaction immunitaire, nous avons synthétisé trois peptides de 17 acides aminés qui correspondent à la taille de la séquence répétitive. Deux peptides de 17 acides aminés ont été synthétisés de manière à ce que l'acide glutamique ou la glycine occupe la position N-terminale pour des commodités de

préparation. Ce sont les peptides LSA 18-34 Glu N-term et LSA 18-34 Gly N-term. La séquence du troisième peptide LSA 13-29 est décalée du côté N-terminal de LSA 18-34 de 6 acides aminés. Ce déplacement correspond au nombre généralement admis d'acides aminés, impliqués dans un épitope séquentiel.

De manière à couvrir tout épitope de ce type, nous avons sélectionné 4 séquences plus courtes :

- LSA 23-34 et LSA 27-34 qui forment des sous-fragments spécifiques de LSA 18-34.
- LSA 18-29 et LSA 23-29 qui sont contenus à la fois dans les peptides LSA 18-34 et 13-29.

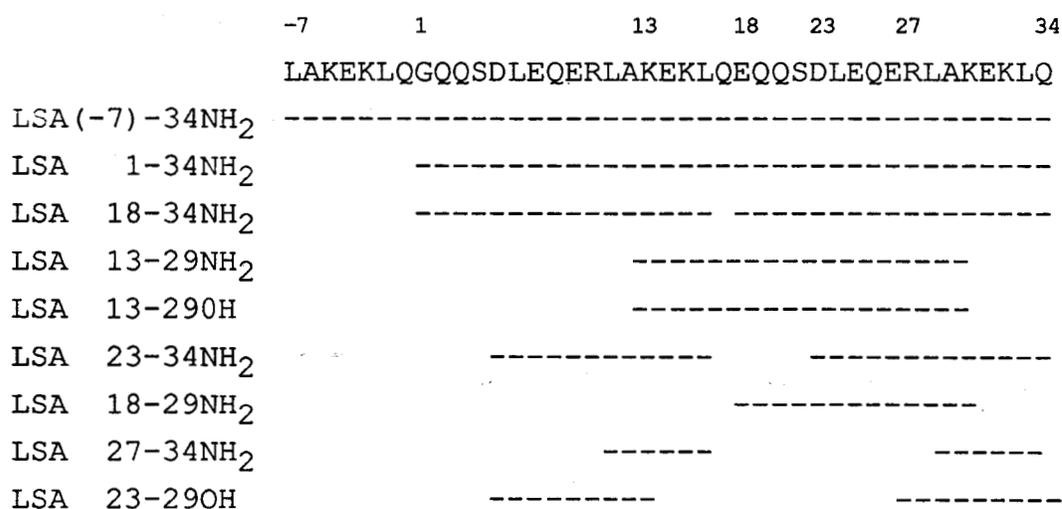
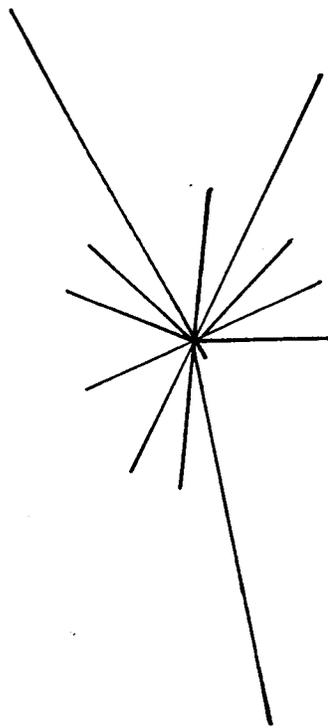


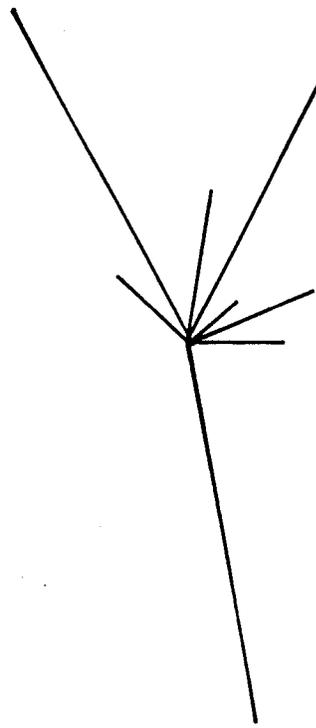
Tableau 3.3 : peptides sélectionnés

Nous avons également tenu compte du caractère amphiphile qui permet de stabiliser les structures hélicoïdales.

Nous avons donc étudié la possibilité d'un caractère amphiphile en utilisant la méthode d'Eisenberg qui représente l'hélice selon une projection axiale (Eisenberg, 1982). Chaque



LSA 18-34 EN-term



LSA 27-34

Figure 3.35: représentation d'Eisenberg

acide aminé est représenté par un vecteur dirigé depuis l'axe de l'hélice vers la position de l'acide aminé. La longueur du vecteur est fonction d'une mesure de l'hydrophobicité de l'acide aminé. Les acides aminés hydrophiles sont représentés par des vecteurs négatifs, dirigés à  $180^\circ$  de la position de l'acide aminé considéré. Les valeurs d'hydrophobicité utilisées sont celles que proposent Chothia. Une hélice amphiphile est caractérisée par le regroupement des résidus hydrophiles sur une face et des résidus hydrophobes sur l'autre face. Elle possède alors la propriété d'adopter une orientation privilégiée entre une phase polaire et une phase apolaire. Selon la représentation d'Eisenberg, ce caractère se traduit par le rassemblement dans un même demi-plan de tous les vecteurs représentant la contribution des acides aminés à l'hydrophobicité de la molécule.

Si on considère le peptide LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub> les vecteurs sont répartis sur tout le plan. Par contre le peptide LSA 27-34NH<sub>2</sub> présente une structure nettement amphiphile : tous les vecteurs sont situés d'un même côté (fig 3.35). Ce caractère amphiphile permet de stabiliser la structure hélicoïdale adoptée par des peptides plus grands contenant la séquence 27-34.

Nous nous sommes également intéressées au moment hydrophobe de la protéine LSA. Dans notre laboratoire a été informatisé un programme qui permet de déterminer un moment hydrophobe pour chaque segment de sept acides aminés consécutifs. Ces calculs

moment  
hydrophobe

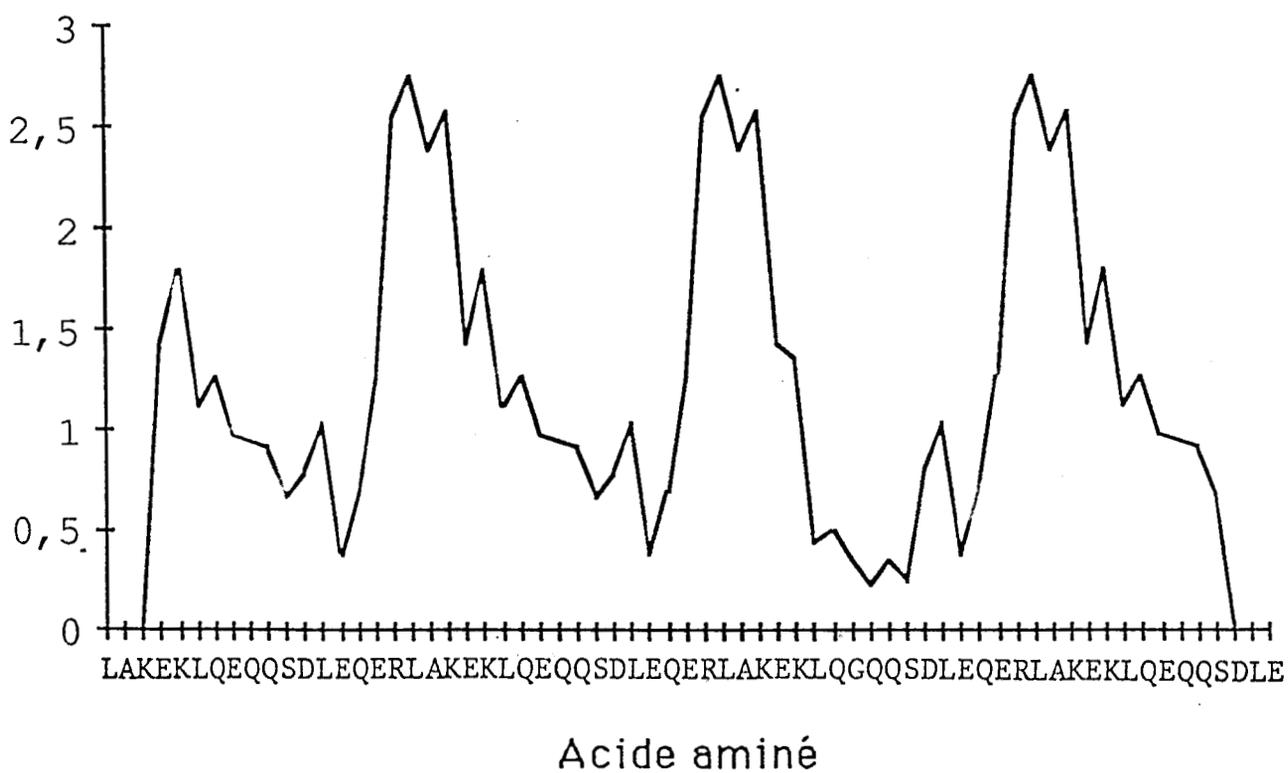


Figure 3.36: moment hydrophobe de la protéine LSA

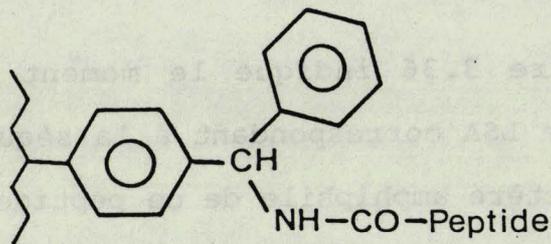
répétés le long de la chaîne peptidique permettent d'établir un profil d'hydrophobicité. Une séquence caractérisée par des valeurs nettement hydrophobes possède une forte probabilité de correspondre à une structure amphiphile. Ce programme complètera les études conformationnelles, à condition que la structure adoptée par le modèle étudié soit une hélice  $\alpha$ , ou aussi un feuillet plissé  $\beta$ .

La figure 3.36 indique le moment hydrophobe maximal de la protéine LSA correspondant à la séquence 27-34. Ceci accrédite le caractère amphiphile de ce peptide.

## 4.2. Synthèses et purifications des peptides

### 4.2.1. Résines utilisées

Pour éviter la présence d'une fonction C-terminale chargée négativement qui interférerait avec le dipôle hélicoïdal et déstabiliserait l'hélice, nous avons synthétisé les peptides LSA (-7)-34NH<sub>2</sub>, LSA 1-34NH<sub>2</sub>, LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub>, LSA 18-34 Gly N-termNH<sub>2</sub>, LSA 23-34NH<sub>2</sub>, LSA 27-34NH<sub>2</sub>, LSA 13-29NH<sub>2</sub> et LSA 23-29NH<sub>2</sub> sur une résine benzhydrylamine (Pietta, 1970). Ce type de résine (fig 3.37) assure une liaison d'ancrage du peptide sur la résine, qui est plus stable aux acidolyses par le TFA, que la liaison ester obtenue avec une résine chlorométhylée. La fixation du premier acide aminé est réalisée selon le protocole utilisé pour le reste de la synthèse, en l'occurrence le schéma Boc/TFA.



**Figure 3.37: résine benzhydrylamine**

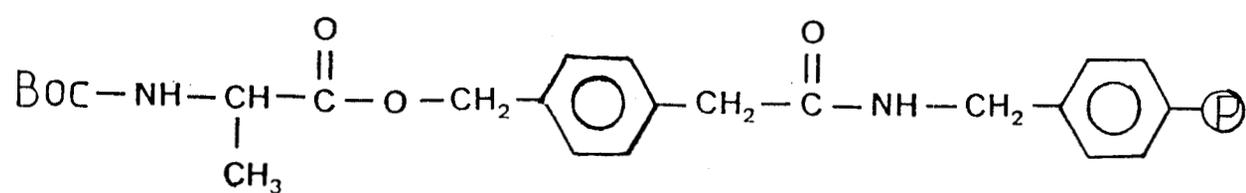
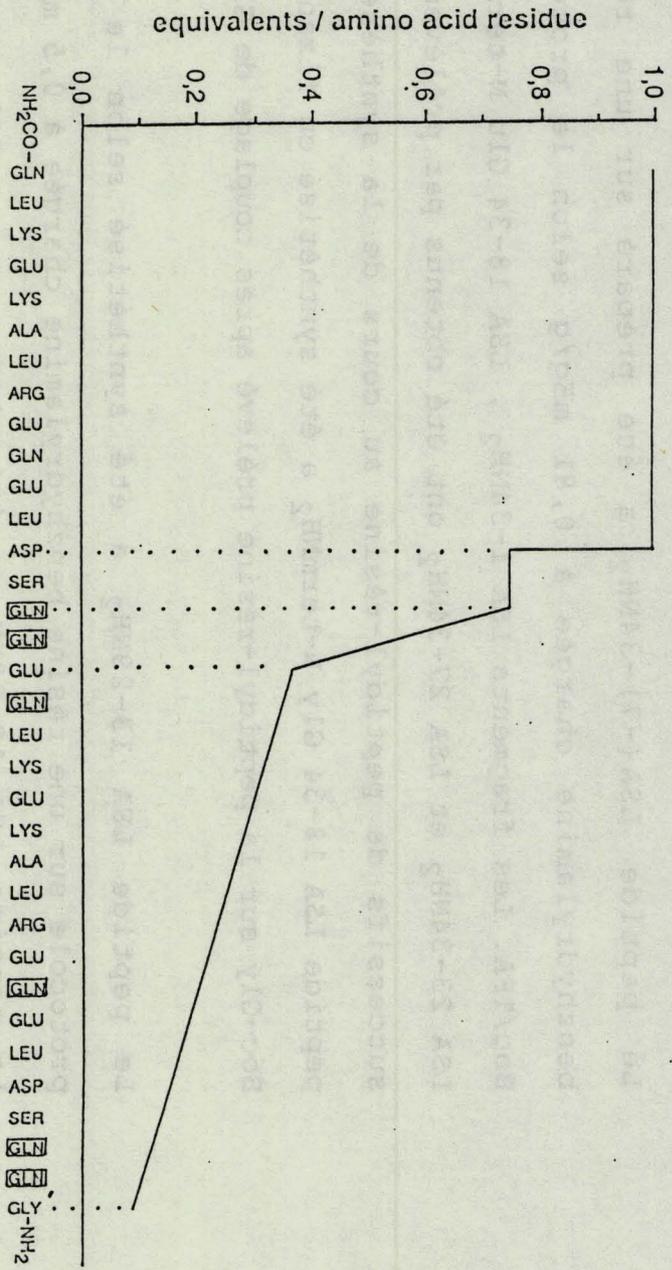


Figure 3.38: Boc-Ala-OCH<sub>2</sub>-Pam-résine

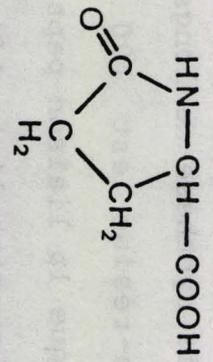
Le peptide LSA(-7)-34NH<sub>2</sub> a été préparé sur une résine benzhydrylamine chargée à 0,81 mEq/g selon le protocole Boc/TFA. Les fragments LSA 1-34NH<sub>2</sub>, LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub>, LSA 23-34NH<sub>2</sub> et LSA 27-34NH<sub>2</sub> ont été obtenus par prélèvements successifs de peptidyl-résine au cours de la synthèse. Le peptide LSA 18-34 Gly N-termNH<sub>2</sub> a été synthétisé en fixant une Boc-Gly sur la peptidyl-résine prélevé après couplage de Gln<sub>16</sub>.

Le peptide LSA 13-29NH<sub>2</sub> a été synthétisé selon le même protocole sur une résine benzhydrylamine chargée à 0,5 mEq/g. Le peptide LSA 18-29NH<sub>2</sub> a été obtenu par prélèvement de peptidyl-résine en cours de synthèse.

De manière à étudier un analogue inorganisé de LSA 13-29NH<sub>2</sub>, nous avons préparé le peptide avec une fonction carboxylique C-terminale LSA 13-29OH sur une résine aminoacyl-4-phénylacétamidométhyl copolystyrène 1% divinyl benzène ou Pam (Mitchell, 1976). Ce type de résine (fig. 3.38) est approprié pour la synthèse de longs peptides car la liaison peptidyl-OCH<sub>2</sub>-Pam-résine est 100 fois plus stable aux traitements acides que la liaison peptide-OCH<sub>2</sub>-résine (obtenue avec une résine chlorométhylée). Afin d'obtenir les peptides LSA 13-29OH et LSA 23-29OH nous avons utilisé une Boc-Ala-OCH<sub>2</sub>-Pam-résine chargée à 1,2 mEq/g.



**Figure 3.39: évolution de la synthèse récurrente**



**Figure 3.40: acide pyroglutamique**

#### 4.2.2 synthèses

Les synthèses ont toutes été réalisées selon le protocole classique Boc/TFA. Les chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels ont été protégées de la manière suivante:

Arg :	tos
Asp, Glu :	O-Bzl
Lys :	Cl-Z
Ser :	O-Bzl

Les couplages ont été effectués au moyen des agents de couplage DCC et HOBT avec un excès de 2.5 équivalents. Les couplages ont été contrôlés par la réaction colorée de Kaiser, et suivis d'une acétylation systématique après un test négatif.

Les peptides bruts ont été séparés de la résine par le fluorure d'hydrogène, en présence de p. crésol et de diméthyl sulfure à 0°C pendant une heure.

Les rendements de synthèse obtenus ne sont pas très élevés, notamment pour la série de peptides issue de la synthèse du LSA (-7)-34. L'analyse d'acides aminés sur les produits bruts a permis de suivre l'évolution de la synthèse (fig. 3.39).

Ces peptides contiennent un nombre relativement important de glutamine dont la principale réaction secondaire est la formation d'acide pyroglutamique (fig. 3.40) catalysée par des acides faibles (Dimarchi, 1982). Par conséquent, la chaîne

peptidique en cours d'élongation est bloquée, et la charge relative de la résine diminue.

Nous avons pu constater que la séquence Gln-Glu-Gln-Gln était particulièrement sensible. Nous avons observé une chute dramatique de la charge (0,4 mEq/résidu) après Gln<sub>17</sub>.

Le rendement devient catastrophique après couplage de la deuxième séquence de 17 acides aminés, c'est à dire après couplage de Gly<sub>1</sub>. La charge de la résine atteint la valeur de 0,11 mEq/g de résidu. Ce qui signifie que le peptide brut contient seulement 11% du produit attendu, les 89% restant correspondent à une large famille de fragments de taille différente et décroissante.

#### 4.2.3 Purifications

Si une gel-filtration de LSA(-7)-34NH<sub>2</sub> et LSA 1-34NH<sub>2</sub> sur TSK HW (40)S a permis d'éliminer les fragments de courte séquence, les peptides de poids moléculaire proche de celui des deux longs peptides ont été élués avec ces produits. Dans ces conditions, il n'était pas envisageable de poursuivre la purification pour étudier leur conformation, les contaminants étaient trop difficiles à séparer.

Par contre les autres peptides, de séquence inférieure ou égale

à 17 acides aminés, ont été purifiés par gel-filtration sur Biogel P2, TSK HW (40)S ou tris-acryl GF05 suivi d'une HPLC semi-préparative sur Nucleosil C18. Les peptides ont été obtenus avec un degré de pureté (94% à 99%) qui autorise la réalisation d'études conformationnelles. Les différents peptides ont été caractérisés par RP-HPLC, CCM et analyse d'acides aminés (fig. 3.41 à 3.49).

#### 4.3 Etudes de ciblage

Pour étudier le développement des schizontes intra-hépatiques, nous avons marqué à la fluorescéine les peptides correspondant au motif de répétition LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub> ainsi que deux sous-fragments LSA 23-34NH<sub>2</sub> et LSA 27-34NH<sub>2</sub> selon le protocole décrit précédemment (§ 2.3). Les peptides marqués ont été purifiés par chromatographie sur couche épaisse de silice.

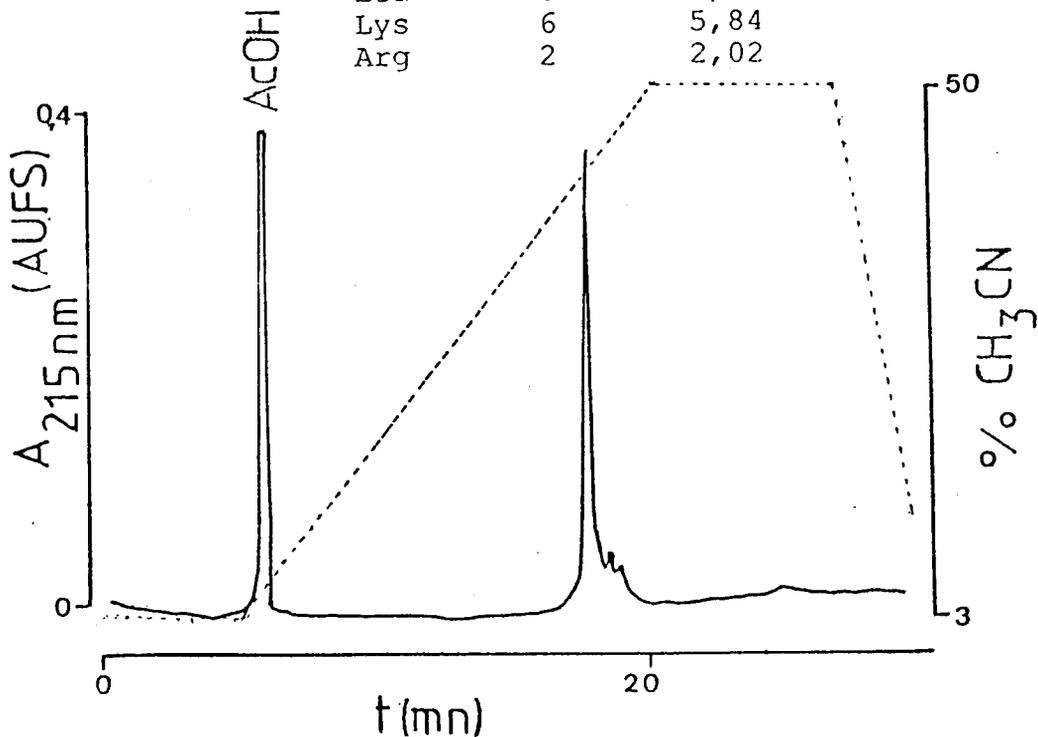
Les tests de ciblage réalisés par le Dr. P. Druilhe et son équipe n'ont pas mis en évidence de fixation spécifique des peptides à la surface des érythrocytes sains ou parasités.

#### 4.4 Etudes conformationnelles

Nous avons effectué ces études chez le Dr.A. Bracq au Centre de Biophysique Moléculaire au CNRS d'Orléans. Nous avons apprécié la conformation de tous les peptides synthétisés à l'exception

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	2	2,23
Ser	2	1,66
Glu	17	16,54
Gly	1	1,2
Ala	3	3,05
Leu	8	8,13
Lys	6	5,84
Arg	2	2,02



RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

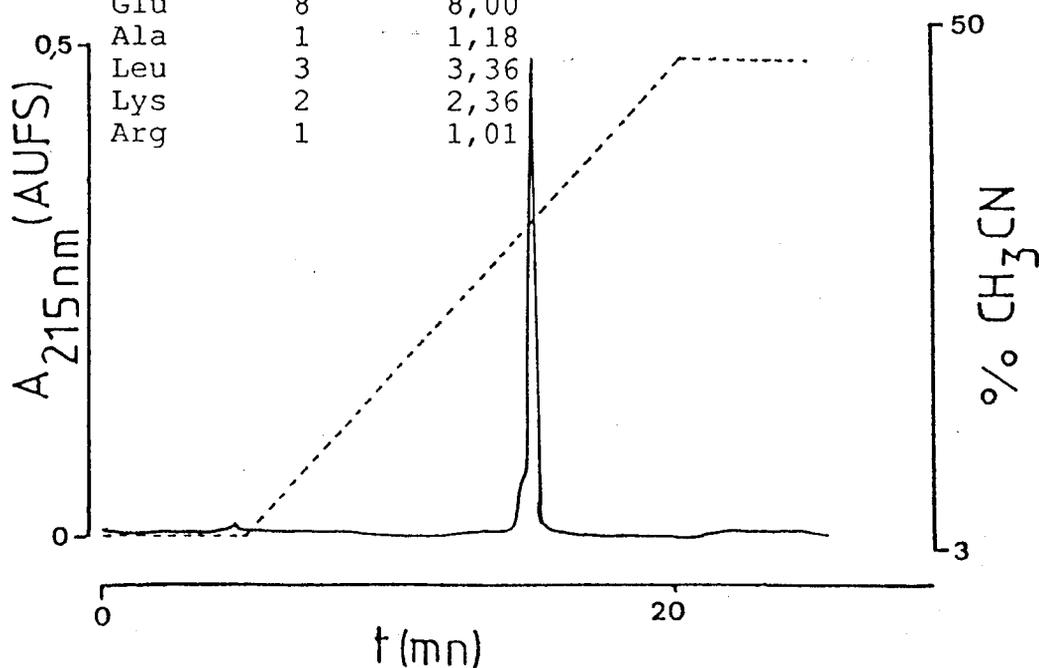
débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.41: caractérisation de LSA(-7)-34

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	1	0,96
Ser	1	0,66
Glu	8	8,00
Ala	1	1,18
Leu	3	3,36
Lys	2	2,36
Arg	1	1,01

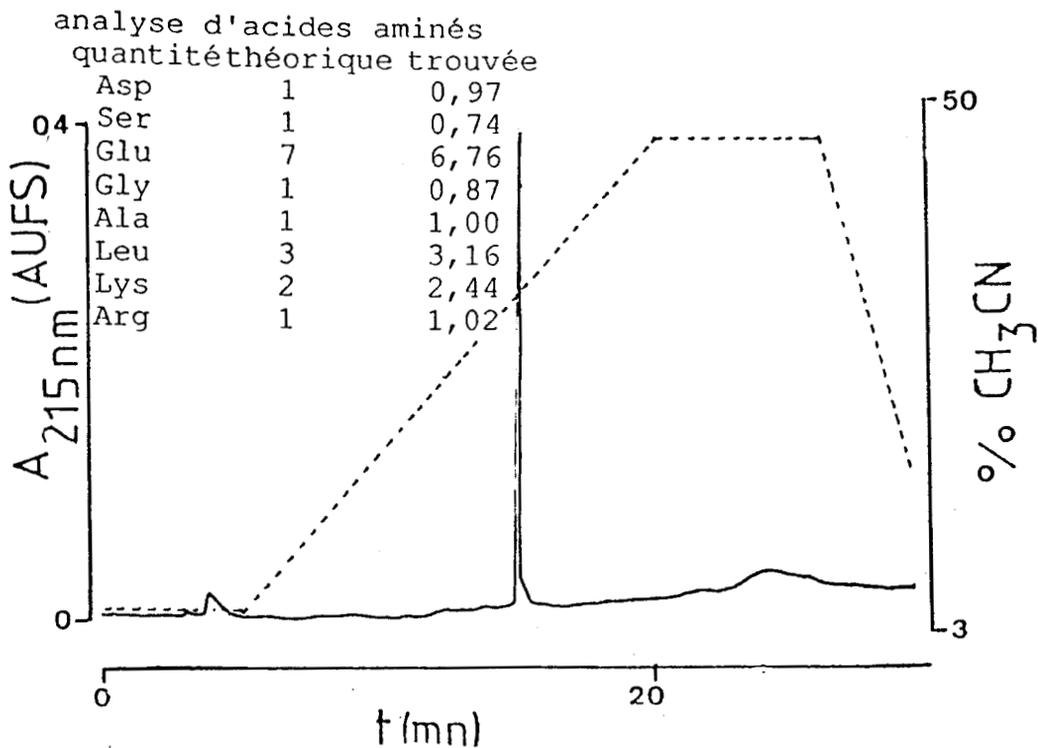


RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.42: caractérisation de LSA 18-34 Glu N-term

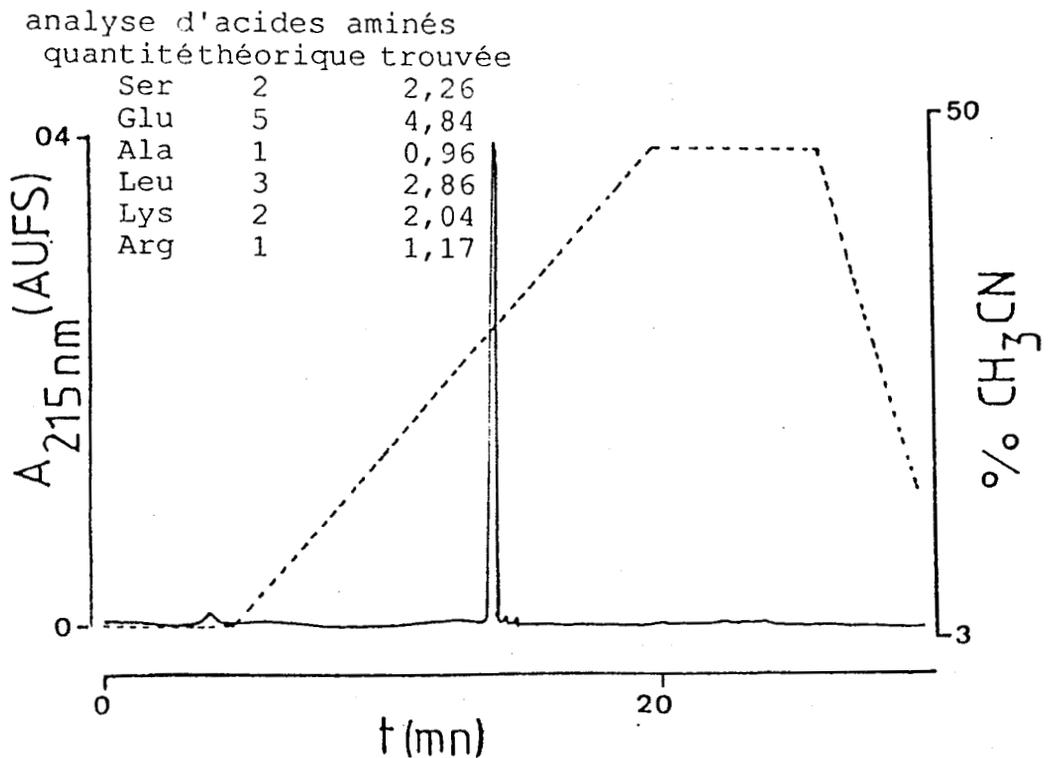


RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

**Figure 3.43: caractérisation de LSA 18-34 Gly N-term**



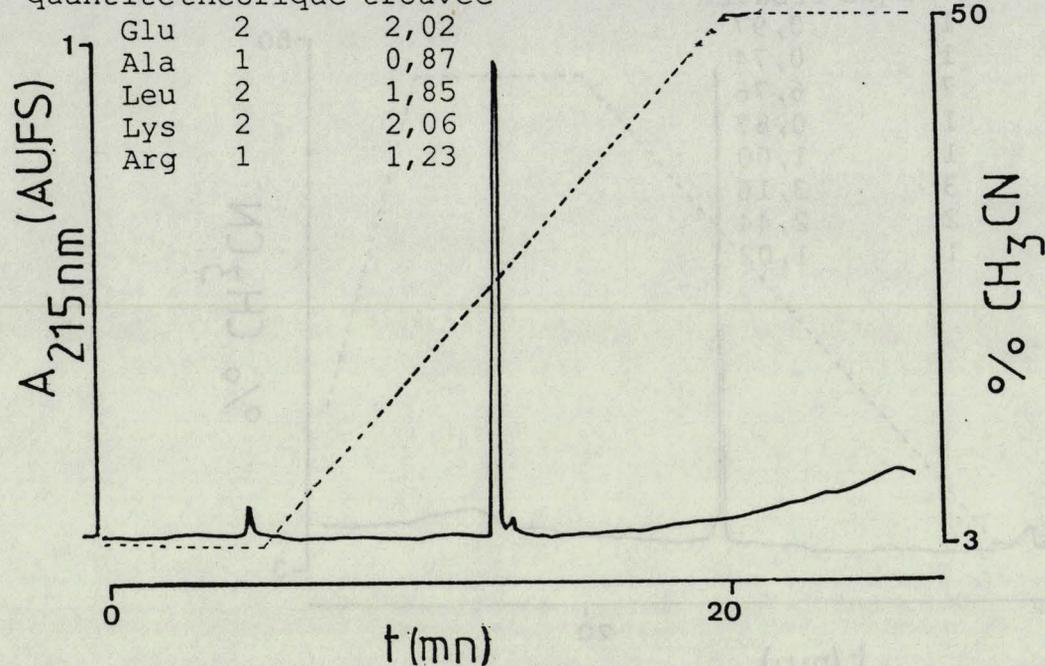
RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

**Figure 3.44: caractérisation de LSA 23-34**

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée



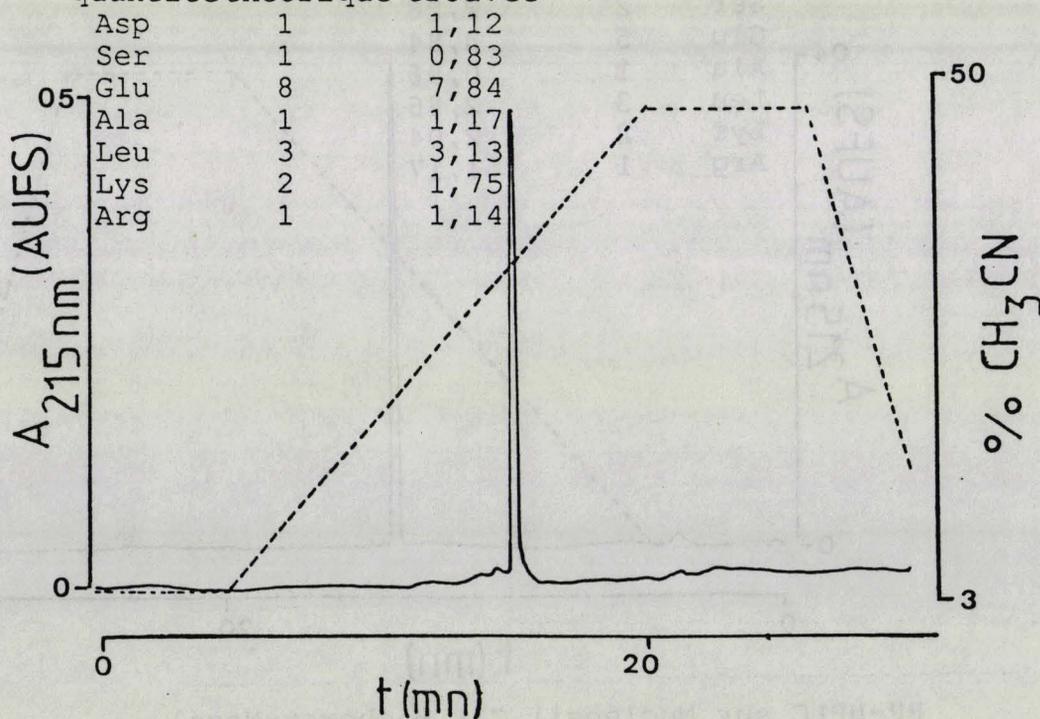
RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

**Figure 3.45: caractérisation de LSA 27-34**

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée



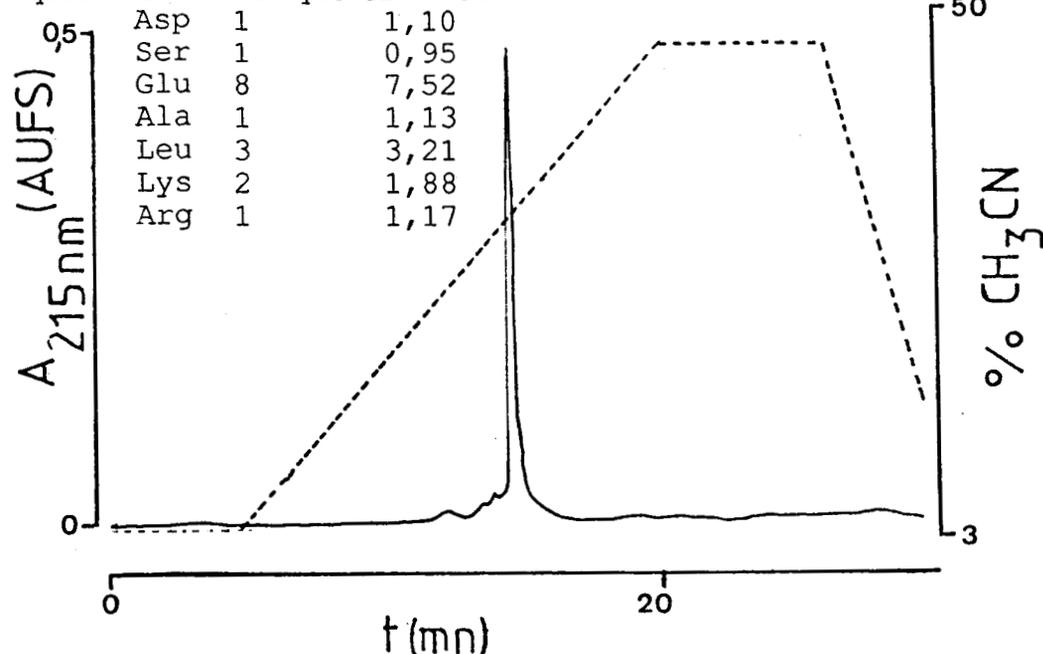
RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

**Figure 3.46: caractérisation de LSA13-290H**

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée



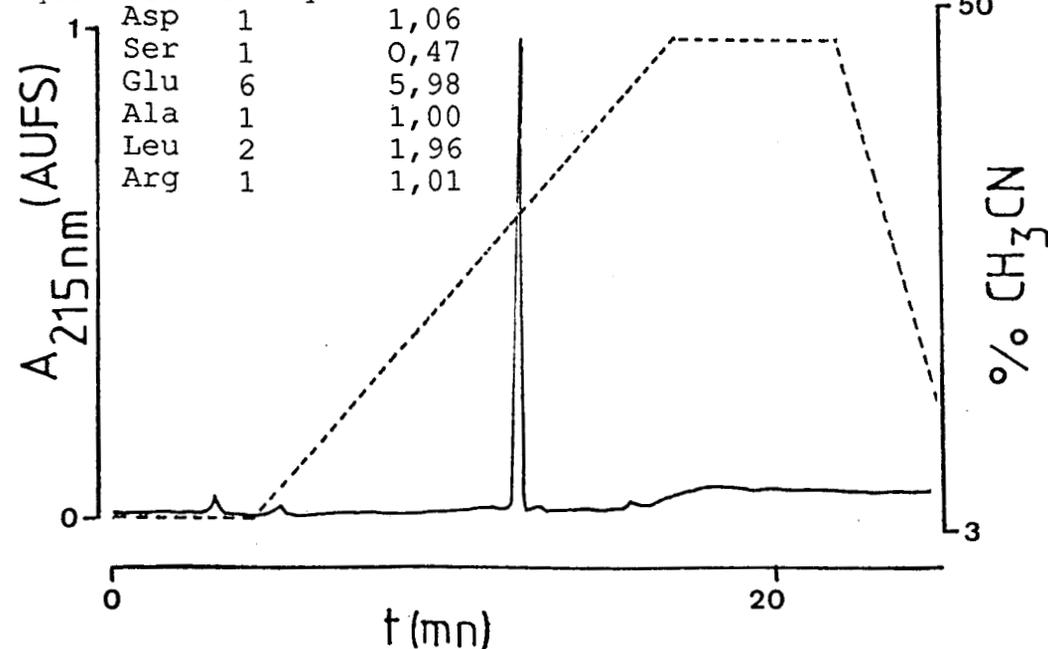
RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.47: caractérisation de LSA 13-29NH<sub>2</sub>

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée



RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

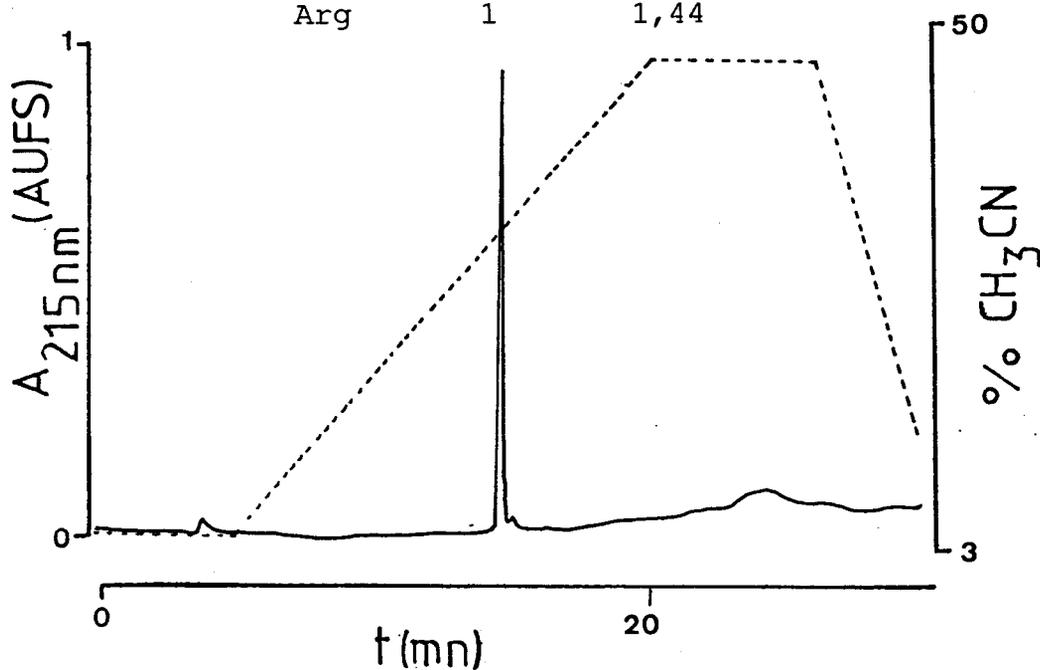
débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.48: caractérisation de LSA 18-29NH<sub>2</sub>

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Glu	3	2,71
Ala	1	1,00
Leu	2	1,86
Arg	1	1,44



RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

**Figure 3.49: caractérisation de LSA 23-290H**

de LSA(-7)-34NH<sub>2</sub> et LSA 1-34NH<sub>2</sub>, insuffisamment purifiés

Les peptides ont été convertis en sels d'hydrochlorides par gel-filtration ou lyophilisations successives dans HCl 0,1N.

Les concentrations, qui ont été calculées par analyse d'acides aminés quantitatives, varient entre 0,2 et 0,5 mg/ml. Les études ont été réalisées dans l'eau, NaCl 100mM ou le trifluoroéthanol (TFE 30%, 60%; 90%) dans des cuves de 0,1 ou 0,01 cm. Les résultats sont exprimés en terme d'ellipticité moléculaire  $[\theta]$ :

$$[\theta] = 3300 \cdot \Delta\epsilon \quad \text{avec} \quad \Delta\epsilon = \frac{h \cdot s}{c \cdot l}$$

- $[\theta]$  est exprimé en deg.dm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>.cm<sup>2</sup>
- h représente la hauteur du pic exprimée en mm
- s représente la sensibilité de l'appareil exprimée en mm<sup>-1</sup>
- c représente la concentration des liaisons peptidiques exprimée en moles/l
- l représente la hauteur de la cuve exprimée en cm
- $\Delta\epsilon$  représente la différence d'absorption entre les composants de la lumière polarisée circulaire droite et gauche transmise par le produit dichroïque.

Nous avons estimé le pourcentage d'hélicité des peptides en comparant leurs valeurs d'ellipticité moléculaire mesurée à 222 nm avec celles de polymères standards hélicoïdaux. Nous avons pris la valeur de  $[\theta]$  égal à -35700 deg.dm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>.cm<sup>2</sup>. Ces valeurs sont certainement sous-estimées, car à notre connaissance, aucune étude ne permet d'affirmer qu'un peptide hélicoïdal à

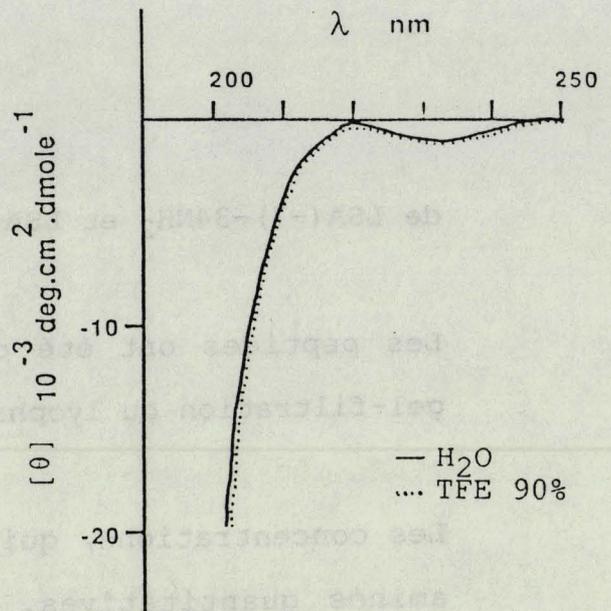
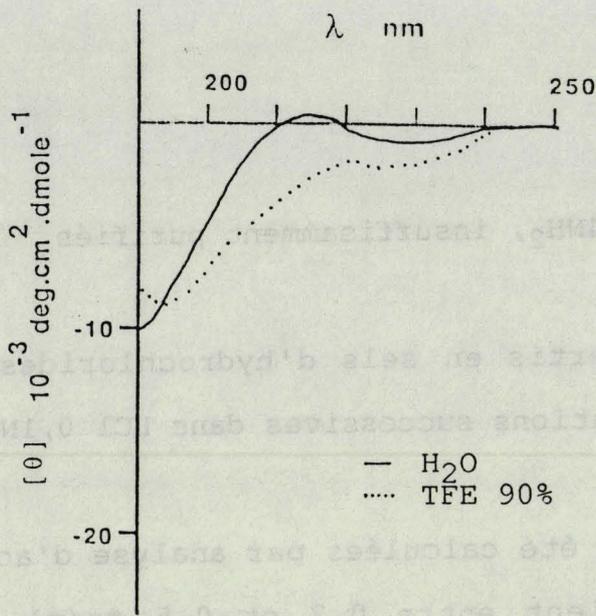


Figure 3.50: spectre dichroïque de LSA 27-34NH<sub>2</sub> Figure 3.51: spectre dichroïque de LSA 23-29OH

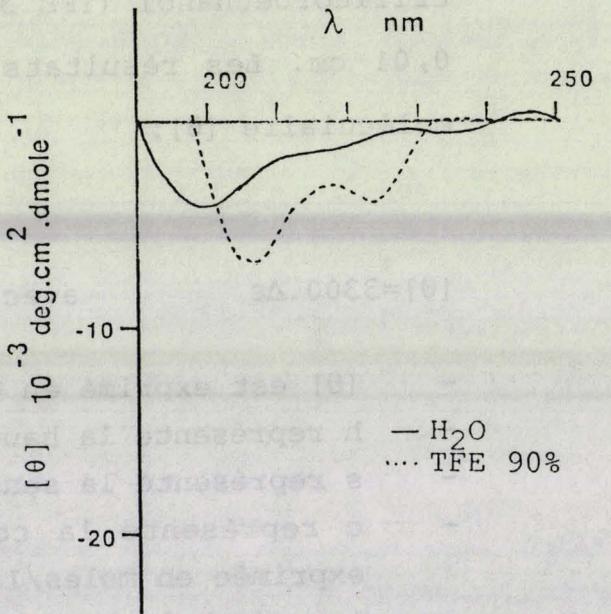
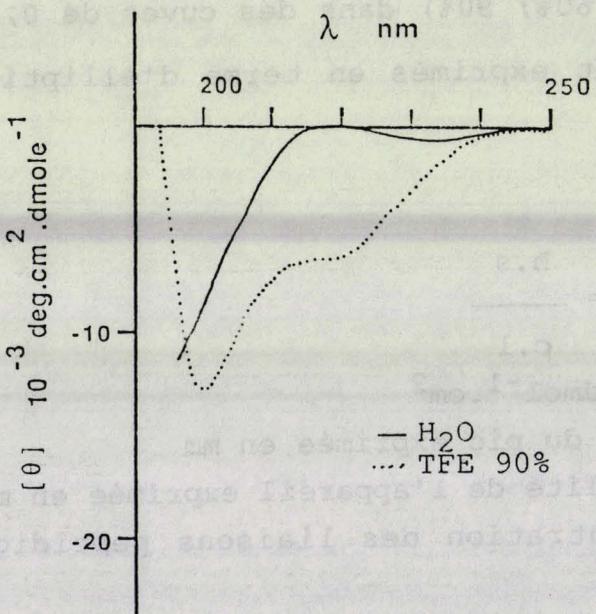


Figure 3.52: spectre dichroïque de LSA 23-34NH<sub>2</sub> Figure 3.53: spectre dichroïque de LSA 18-29NH<sub>2</sub>

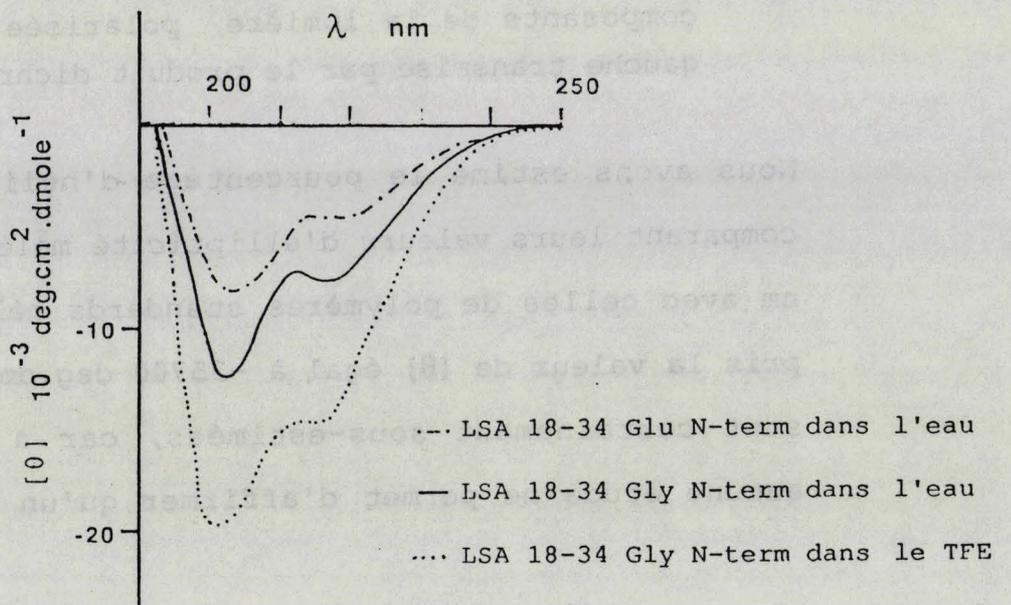


Figure 3.54: spectre dichroïque de LSA 18-34

100% présente les mêmes valeurs d'ellipticité moléculaire que celles de polymères hélicoïdaux standards.

Nous avons réalisé les études de dichroïsme circulaire dans l'eau. Nous avons tenté, sans résultat, de favoriser la structure hélicoïdale des peptides dans une solution de NaCl 100 mM, proche du milieu physiologique. Par contre, les spectres obtenus dans le TFE, inducteur de nucléation d'hélice, mettent en évidence une potentialisation de l'organisation qui ne dépend pas de la dilution de TFE.

Les plus petits fragments LSA 27-34NH<sub>2</sub> et LSA 23-29OH ne s'organisent ni dans les solutions aqueuses, ni dans le TFE (fig.3.50, 3.51).

Par contre les spectres des peptides LSA 23-34NH<sub>2</sub> et LSA 18-29NH<sub>2</sub> témoignent d'une organisation hélicoïdale significative dans le trifluoroéthanol (fig.3.52, 3.53). Ce résultat doit être sans doute attribué à la présence de la chaîne latérale chargée négativement de Glu près de l'extrémité N-terminale.

D'autre part, deux peptides de 17 acides aminés qui possèdent une fonction carboxamide C-terminale LSA 18-34 Gly N-termNH<sub>2</sub>. LSA et 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub> adoptent dans les solutions aqueuses une organisation qui est potentialisée dans le TFE. Nous avons détaillé leurs spectres, qui présentent une organisation hélicoïdale caractéristique, bien que partielle.

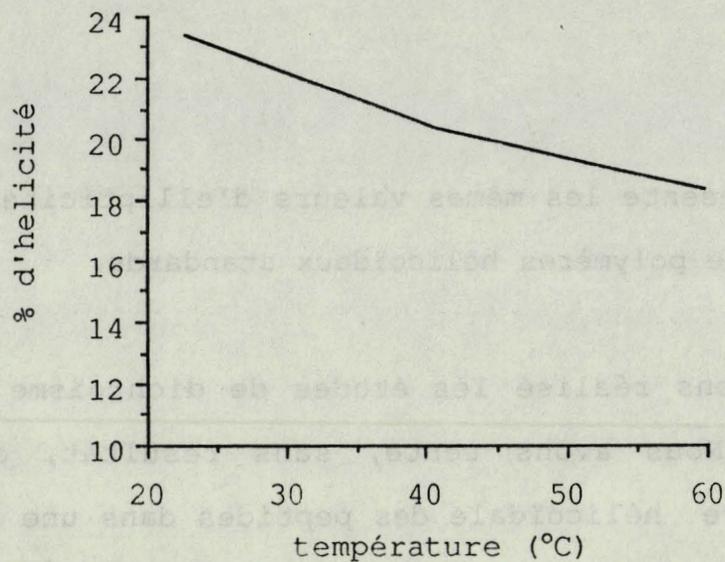


Figure 3.55: influence de la température

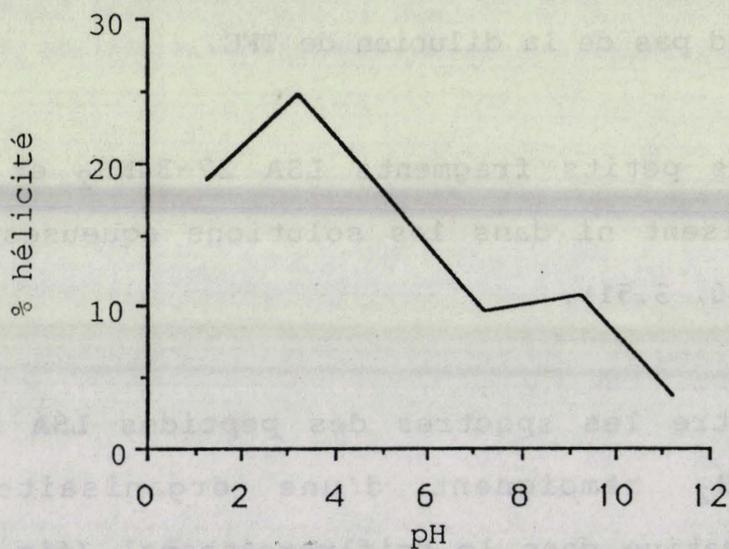


Figure 3.56: influence du pH

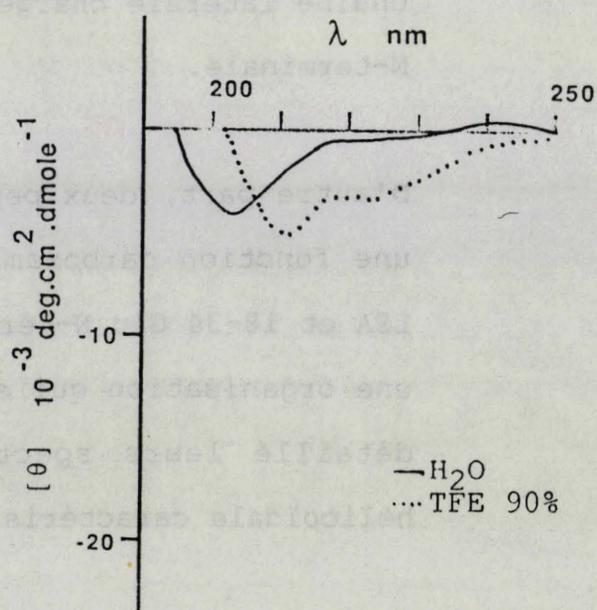
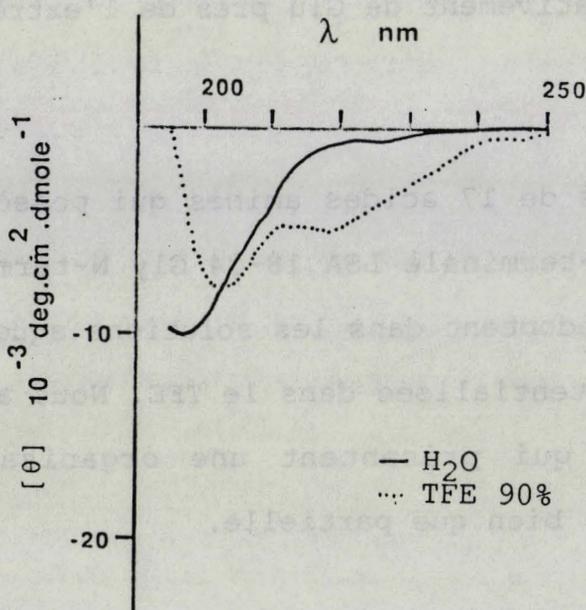


Figure 3.57: spectre dichroïque de LSA 13-29OH

Figure 3.58: spectre dichroïque de LSA 13-29NH<sub>2</sub>

Les études dichroïques dans l'eau, de LSA Glu N-term et Gly N-term présentent des spectres analogues (fig. 3.54):

- un minimum autour de 216 nm (transition  $n-\pi^*$  d'hélice  $\alpha$ )
- un minimum autour de 202 nm (transition  $\pi-\pi^*$  d'hélice  $\alpha$  et de "random coil")
- un cross-over près de 194 nm
- un pourcentage d'hélicité estimé à 23% pour le peptide 18-34 Glu N-term. et 20% pour le peptide LSA 18-34 Gly N-term.

Afin d'étudier les effets de stabilisation d'hélicité, nous avons estimé l'influence de la température et du pH sur l'organisation du peptide LSA 18-34 Gly N-term. La déstabilisation de la structure hélicoïdale est proportionnelle à l'élévation de température (fig.3.55). Par contre, la stabilisation de l'hélice  $\alpha$  est maximale à pH égal à 3 (fig.3.56).

Enfin, nous avons apprécié le comportement dichroïque des peptides LSA 13-29OH et LSA 13-29NH<sub>2</sub>. Si le peptide LSA 13-29OH apparaît totalement inorganisé dans l'eau (fig.3.57), le peptide LSA 13-29NH<sub>2</sub> semble présenter une amorce de structure hélicoïdale (fig.3.58). La moins bonne organisation de LSA 13-39NH<sub>2</sub> peut être imputée à la présence de deux lysines (en treizième et quinzième position) qui déstabilisent l'organisation hélicoïdale en interférant avec l'extrémité positive du dipôle hélicoïdal.

D'autre part, la perte totale de conformation du peptide LSA 13-290H est certainement liée à l'interférence de la charge négative de la fonction carboxylique C-terminale avec le dipole de l'hélice.

L'élucidation de la structure secondaire des peptides nous a permis de mieux éclairer les études biologiques, et d'estimer l'influence de la conformation des peptides sur leur antigénicité.

#### 4.5 Etudes immunologiques

Les études ont été réalisées par le Dr.P. Druilhe et son équipe dans le Service de Parasitologie du Pr. Gentilini à l'hôpital La Pitié-Salpêtrière. Nous rapportons leurs résultats qui permettent d'éclairer notre étude.

##### 4.5.1 Etude de l'antigénicité des peptides

L'antigénicité des différents peptides a été déterminée par ELISA indirect à l'aide de sérums d'individus habitant en zones endémiques. Ces sérums humains sont capables de reconnaître la protéine recombinante.

Les plus petits peptides fixés sur la plaque d'ELISA (LSA

23-29NH<sub>2</sub> et LSA 27-34NH<sub>2</sub>) ne sont pas reconnus par les sérums humains. Alors que les peptides de 12 acides aminés, LSA 18-29 NH<sub>2</sub> et 23-34 NH<sub>2</sub> sont reconnus par deux sérums sur 10. Les peptides plus longs sont reconnus par la plupart des sérums.

Pour améliorer la fixation des peptides sur les plaques de polystyrène nous avons couplé les peptides LSA 27-34NH<sub>2</sub>, LSA 23-34NH<sub>2</sub> et LSA 18-34EN-termNH<sub>2</sub> à la sérumalbumine bovine (BSA). En raison de l'importance relative du nombre de résidus acides de LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub> (5 résidus acides contre 3 résidus basiques), nous avons préféré coupler la BSA sur les fonctions amines du peptide par le glutaraldéhyde. Nous avons utilisé la même méthode de couplage de la BSA pour les deux peptides plus petits. Malheureusement le couplage à la BSA n'a pas permis d'améliorer la fixation des conjugués sur la plaque d'ELISA.

#### 4.5.2. Rôle des mutants Glu et Gly

Afin de compléter notre étude, nous avons voulu éclaircir le rôle des acides aminés mutants Glu ou Gly au niveau du système immunitaire, et définir leurs fonctions exactes.

Le Dr.P.Druilhe et A. Londono ont d'abord étudié la reconnaissance de LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub> et LSA 18-34 Gly N-termNH<sub>2</sub> par les sérums humains. Les études n'ont mis en évidence aucune différence majeure au niveau de l'antigénicité

de ces peptides.

Pour approfondir la question, l'inhibition de la liaison des sérums humains au LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub> par les peptides LSA Glu N-termNH<sub>2</sub> et LSA Gly N-termNH<sub>2</sub> a été testée. Les résultats sont similaires, quel que soit le sérum testé et quelle que soit la dilution de peptide utilisé. Ceci signifie que Gly<sub>1</sub> ou Glu<sub>18</sub> n'ont pas de signification particulière au niveau de la reconnaissance par les anticorps.

#### 4.5.3 Influence de l'organisation au niveau de l'antigénicité des peptides

Afin de mieux préciser l'épitope de la protéine LSA, différents peptides ont été testés par inhibition d'ELISA. Ce test a permis de mesurer l'inhibition de la liaison de sérums humains au peptide LSA(-7)-34 par ces peptides (fig. 3.59 et 3.60). Ces études ont montré que:

- LSA 23-29OH et LSA 27-34NH<sub>2</sub> ne sont pas inhibiteurs,
- LSA 23-34NH<sub>2</sub> et LSA 18-29NH<sub>2</sub> sont de faibles inhibiteurs
- LSA 13-29NH<sub>2</sub> inhibe avec une moins bonne efficacité la liaison des anticorps de sérums humains au peptide LSA(-7)-34NH<sub>2</sub>. Néanmoins le peptide carboxamide est meilleur inhibiteur que son analogue carboxylique, .
- LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub> est un bon inhibiteur des séra testés, à l'exception du sérum SHI3, dont la liaison au n'est inhibé que par le peptide LSA(-7)-34.

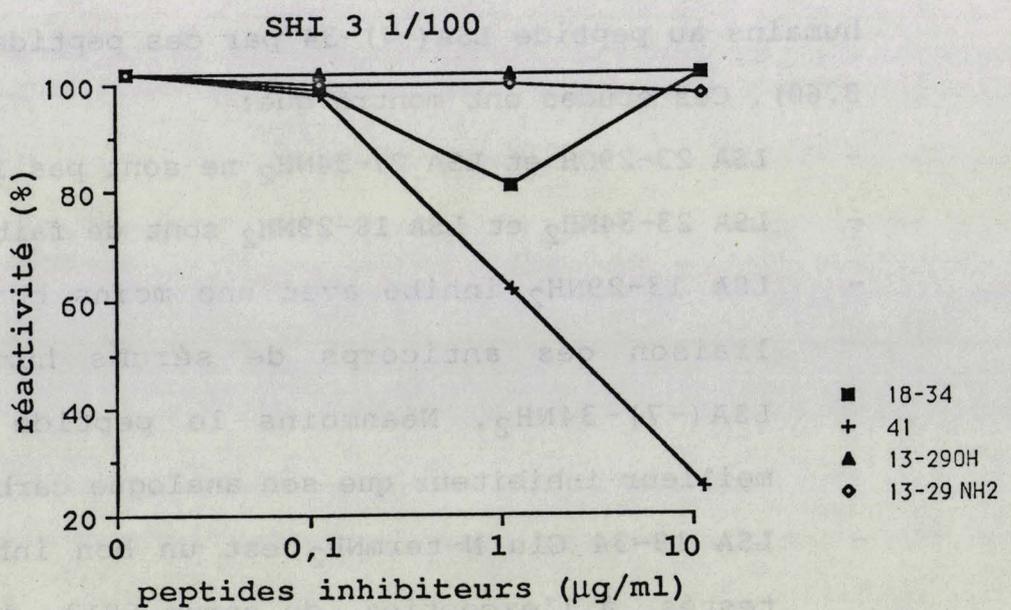
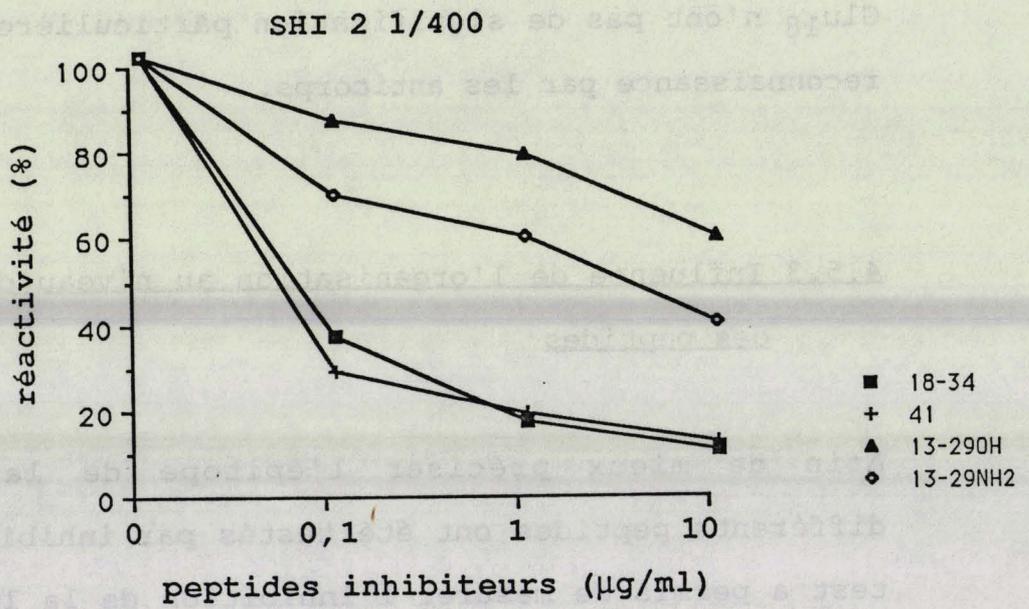
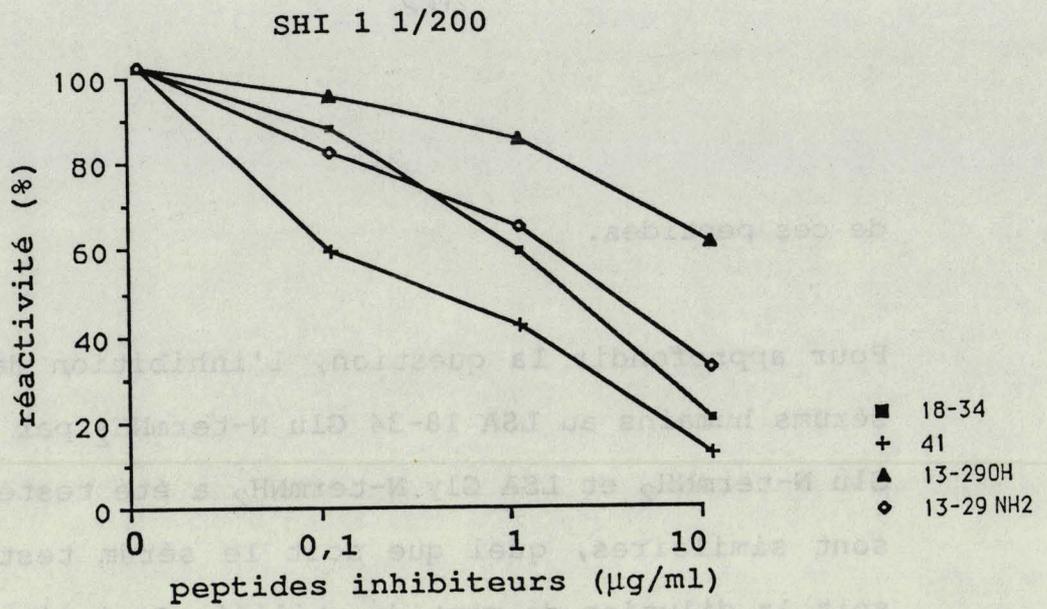


Figure 3.59: inhibition d'ELISA

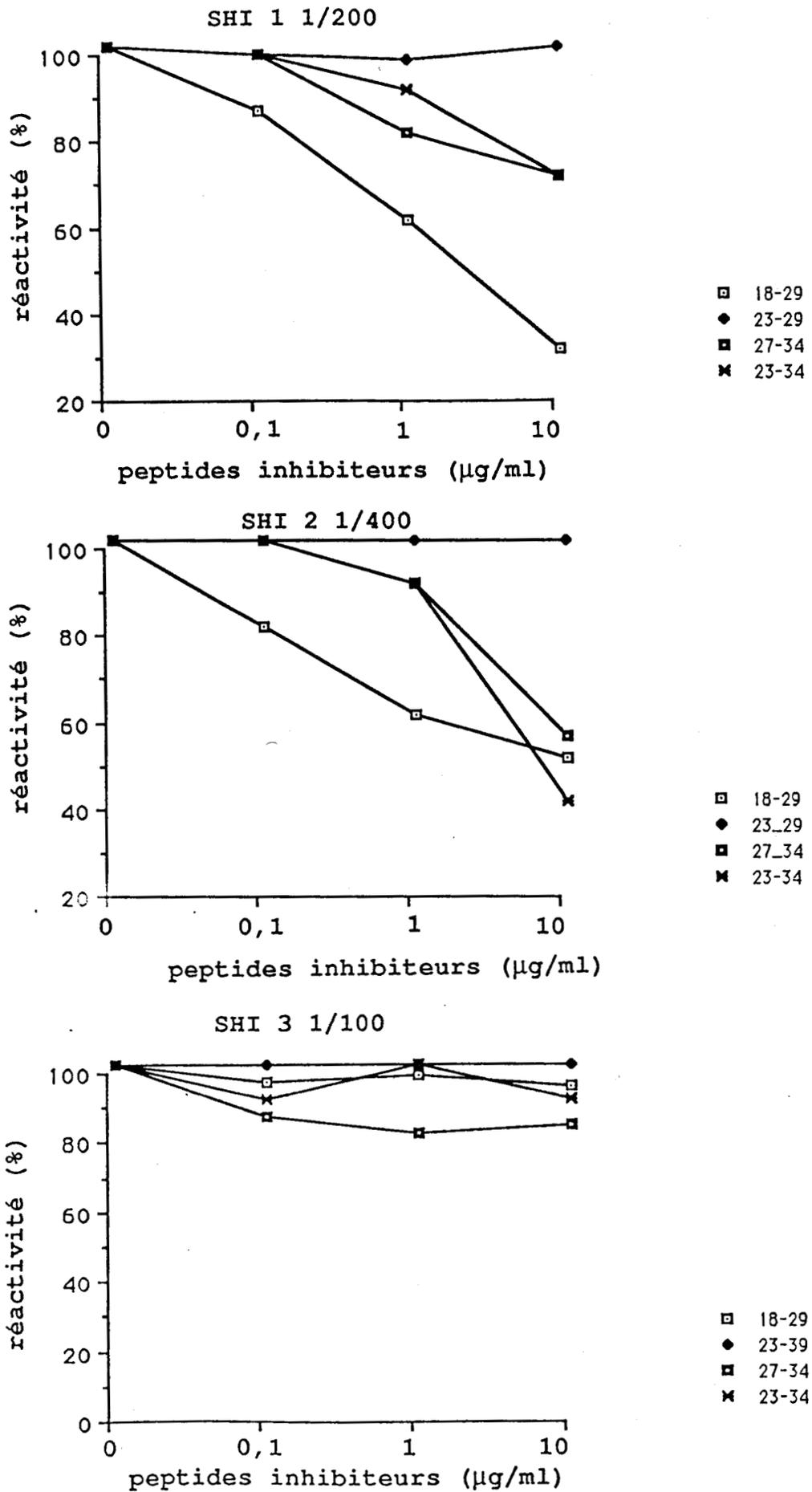


Figure 3.60: inhibition d'ELISA

Ces résultats suggèrent que le peptide LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub> contient un épitope dominant, reconnu partiellement par LSA 13-29NH<sub>2</sub>. La capacité d'inhibition de ces peptides semble être corrélée à leur organisation hélicoïdale dans l'eau, réelle ou potentielle. Ceci est confirmé par le fait que les sous-fragments LSA 23-34NH<sub>2</sub> et LSA 18-29NH<sub>2</sub> inorganisés sont dénués de toute propriété d'inhibition significative. Un argument supplémentaire, étayant cette hypothèse, est fourni par les résultats obtenus avec le peptide LSA 13-29OH. En effet, l'altération de l'extrémité C-terminale du peptide, entraînant une perte d'organisation, se traduit par une moins bonne réactivité que celle obtenue avec le peptide LSA 13-29NH<sub>2</sub>.

Cependant, nous ne pouvons écarter l'hypothèse d'un épitope conformationnel insuffisamment organisé dans le peptide LSA 13-29, qui pourrait expliquer les résultats du SHI6. Car il est toujours difficile d'attribuer la diminution de l'antigénicité d'un peptide de petite taille, soit à la perte d'une organisation hélicoïdale, soit à la délétion d'acides aminés qui forment une partie importante de l'épitope. Des éclaircissements pourraient être apportés par l'association du peptide LSA 13-29 à une séquence lui permettant de mieux s'organiser. Ce fragment, inducteur conformationnel, devrait posséder une structure et un rôle très éloignés de ceux de la protéine LSA.

Les anticorps humains développés naturellement semblent en fait

dirigés contre un épitope conformationnel, qui peut être reproduit par des peptides synthétiques. Il n'est pas indispensable que les peptides adoptent effectivement une structure hélicoïdale dans les solutions aqueuses proches des conditions physiologiques. Il suffit que les peptides possèdent un potentiel d'organisation qui pourra être exprimé lors de leurs inter-actions avec les anticorps.

#### 4.6 Conclusion

Nos travaux nous ont permis d'appréhender la nature de la protéine du stade hépatique, ainsi que les réactions immunologiques où elle est impliquée. Nous avons pu tirer un certain nombre d'enseignements à partir de nos résultats:

- la capacité de ciblage que nous avons suspectée pour les fragments de la protéine LSA n'a pas été observée,
- l'acide aminé mutant, Glu ou Gly, ne semble pas jouer de rôle primordial au niveau de la reconnaissance par le système immunitaire,
- l'importance de l'organisation carboxamide C-terminale des peptides sur l'organisation a été confirmée,
- les études de dichroïsme circulaire ont permis d'apprécier l'organisation hélicoïdale des peptides,
- bien que ne disposant pas de renseignement direct sur la structure protéique, nos études conformationnelles confirment les prédictions de Chou et Fasman et suggèrent l'existence d'une structure protéique probablement

hélicoïdale et fibrillaire, à la surface du parasite.

- un épitope conformationnel, correspondant au peptide LSA 18-34 Glu N-termNH<sub>2</sub>, et reconnu par les anticorps de sérums humains a été mis en évidence. Plus précisément, un épitope majeur est probablement localisé dans la partie C-terminale du peptide. En effet, c'est une zone amphiphile qui pourrait stabiliser la structure hélicoïdale des peptides de taille suffisamment longue pour être organisés. Pour compléter ces études, il serait intéressant de vérifier la corrélation entre immunogénicité et conformation.

La réalisation d'un vaccin efficace contre un stade spécifique présente de nombreuses difficultés. Un vaccin anti-malaria aura avantage à cibler plusieurs stades de développement du parasite.

##### 5. ELABORATION D'UN VACCIN HYBRIDE

Nous avons conçu un modèle qui associe le sporozoïte et la forme hépatique pour diriger la défense immunitaire contre les premiers stades de développement du parasite chez l'homme. L'objectif est de bloquer le développement du parasite, en le piégeant au stade de sporozoïte dès son entrée chez l'hôte, ou s'il échappe aux réactions de défense, bloquer le *Plasmodium* au stade hépatique avant la pénétration dans les érythrocytes. L'association dans

une structure hybride des épitopes B et T de stade différent permettra d'assurer une protection efficace et plus étendue.

Récemment Good a découvert à partir de calculs théoriques un épitope T sur la protéine CS: Th2R (Good, 1987; 1988). La séquence, capable de stimuler les lymphocytes T, correspond à un peptide de 17 acides aminés qui est localisé près de la zone répétitive de la protéine CS vers l'extrémité C-terminale. Ce peptide possède une probabilité non négligeable d'être organisé en hélice  $\alpha$ , selon les paramètres de Chou et Fasman, et de correspondre à une structure amphiphile caractéristique des épitopes T (De Lisi, 1985).

Nous avons conçu un vaccin hybride dans lequel cet épitope T est encadré par les épitopes B du sporozoïte et du stade hépatique. Nous espérons que la présence de l'épitope T naturel du sporozoïte pourrait induire une mémoire immunitaire. Notre objectif était de créer une réponse immunitaire dirigée non seulement contre les sporozoïtes mais aussi contre les stades hépatiques, et de restimuler les cellules immunocompétentes par le parasite dans les conditions naturelles d'immunisation. Nous ne savions pas au moment où nous avons élaboré le modèle si les peptides pouvaient correspondre à des épitopes T.

Parallèlement à nos études, Pattaroyo (1987) a réalisé des essais cliniques avec plusieurs antigènes peptidiques issus de protéines du stade érythrocytaire associés au tetrapeptide NANP dans un vaccin hybride.

une structure hybride des épitopes B et T de grande efficacité  
permettra d'assurer une protection efficace et plus élargie.

Récemment nous avons découvert à partir de calculs théoriques un  
épitope T sur la protéine GS: TH2R (Good, 1987; 1988). La  
séquence, capable de stimuler les lymphocytes T, correspond à un  
peptide de 17 acides aminés qui est localisé près de la zone  
réceptive de la protéine GS vers l'extrémité N-terminale. Ce  
peptide possède une probabilité non négligeable d'être organisé

NANPNANPNANP-SDKHIEQYLKIKNSIS-EKLQEQQSDLEQERLAKEKLEQEQQSDL

épitope B

TH2R

épitope B

sporozoïte

stade hépatique

Figure 3.61: peptide hybride

Nous avons conçu un vaccin hybride dans lequel est épitope T est  
encadré par les épitopes B du sporozoïte et du stade hépatique.  
Nous espérons que la présence de l'épitope T naturel dans  
sporozoïte pourra induire une mémoire immunitaire. Notre  
objectif était de créer une réponse immunitaire dirigée pas-  
sivement contre les sporozoïtes mais aussi contre les stades  
hépatiques et de restaurer les cellules immunocompétentes ex-  
istants dans les conditions naturelles d'infection. Nous  
ne savons pas au moment où nous avons élaboré le modèle si les  
peptides hybrides correspondants à des épitopes T  
Facilement à nos études, Rattarovo (1987) a réalisé des essais  
cliniques avec plusieurs antigènes peptidiques issus de protéines  
du stade érythrocytaire associées au tétrapeptide NANP dans un  
vaccin hybride.

### 5.1 Choix des séquences

La construction d'un vaccin hybride a répondu à plusieurs impératifs (fig. 3.61). Le peptide issu du LSA a été choisi de manière à encadrer la séquence LSA 18-34 qui correspond à un épitope conformationnel. Nous l'avons associé par liaison covalente à l'extrémité C-terminale de l'épitope Th2R de manière à potentialiser la structure hélicoïdale par effet coopératif. Nous avons accordé une importance particulière aux effets de stabilisation de l'hélice  $\alpha$  telle que l'amphiphilie et les interactions ioniques.

L'antigène synthétique issu de la protéine CS que nous avons choisi correspond à l'unité structurale répétée 4 fois (NPNA)<sub>4</sub>. Nous l'avons associée à l'extrémité N-terminale de l'épitope Th2R au moyen d'un lien NP qui sépare les 2 séquences, la proline étant commune aux deux peptides. Dans ces conditions, nous avons évité la répétition de la proline, qui rompt la structure hélicoïdale. Nous avons également préparé un vaccin hybride, 18-62, contenant l'épitope T et le fragment de la protéine LSA.

### 5.2 Synthèse et purifications

Le peptide 1-62 a été préparé sur une résine Pam (0,5 mM) au moyen du synthétiseur Applied Biosystem (430) selon le protocole Boc/TFA. Les chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels

sens de la synthèse



NANPNANPNANPSDKHIEQYLKKIKNSISEKLQEQSDLEQERLAKEKLQEQSDL

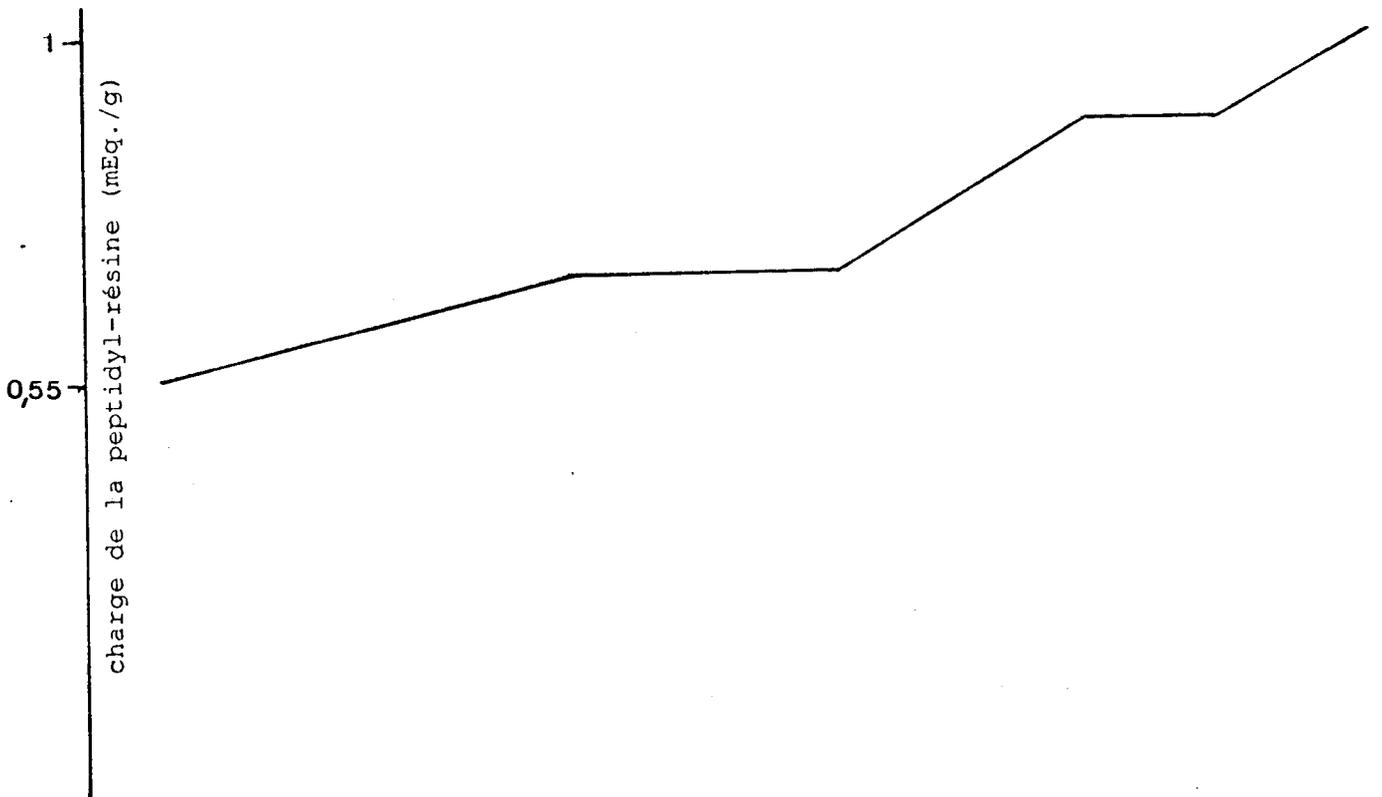


Figure 3.62: évolution de la synthèse

étaient protégées par les groupements ci-dessous

Arg, His : Z

Asp, Glu : O-Bzl

Lys : Cl-Z

Tyr : Br-Z

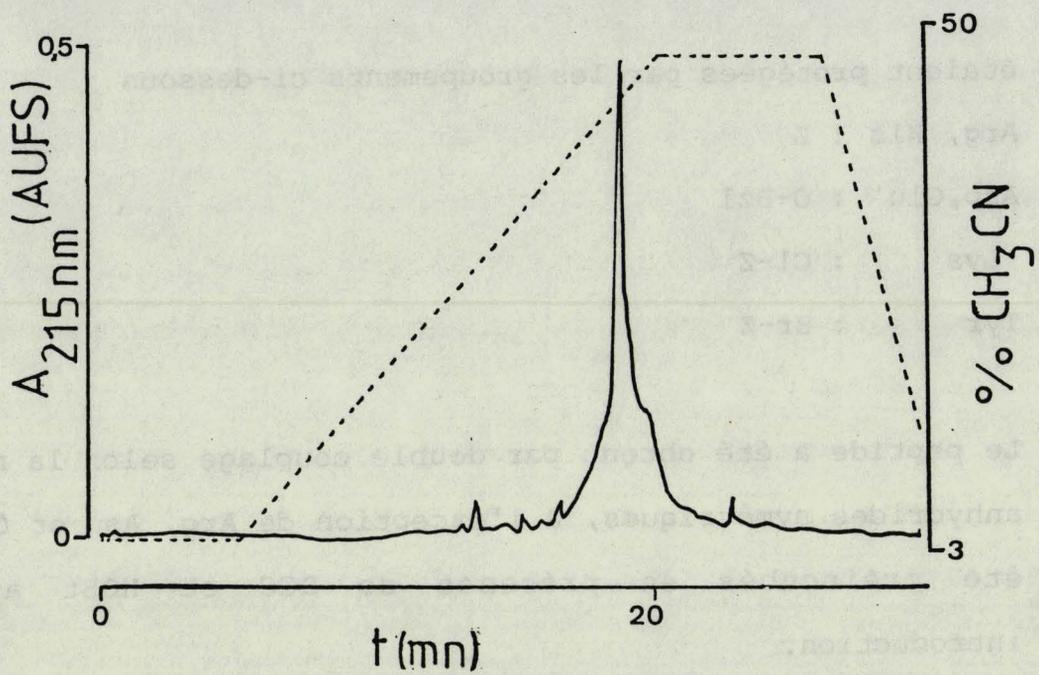
Le peptide a été obtenu par double couplage selon la méthode des anhydrides symétriques, à l'exception de Arg, Asn et Gln qui ont été préincubés en présence de DCC et HOBT avant leur introduction.

L'efficacité de chaque couplage a été contrôlée par le test quantitatif à la ninhydrine. Les rendements varient entre 98 et 99%.

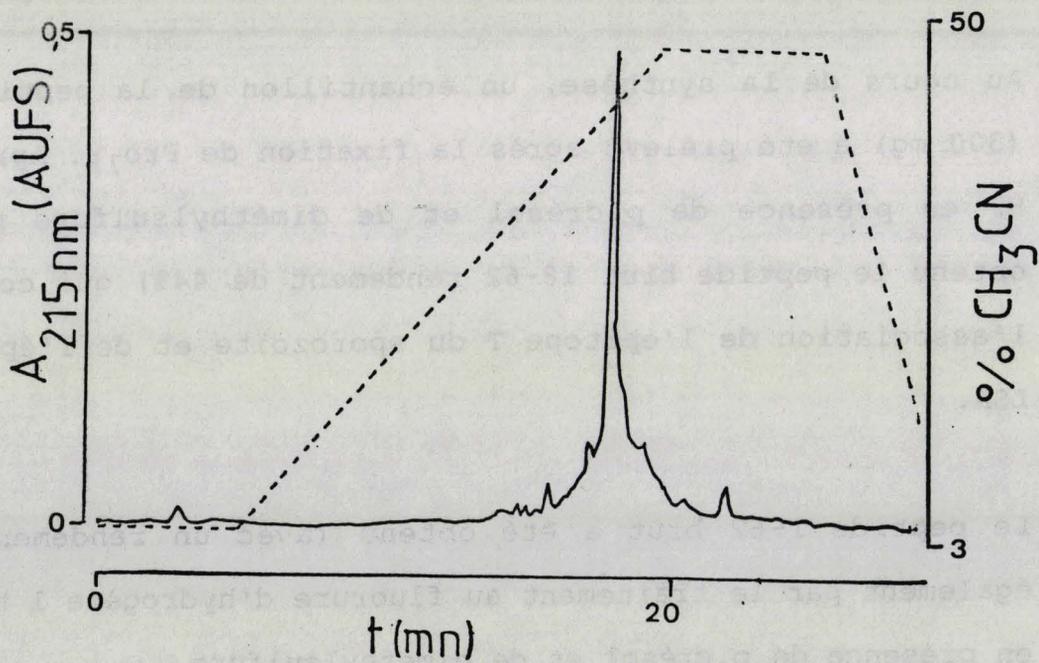
Au cours de la synthèse, un échantillon de la peptidyl-résine (300 mg) a été prélevé après la fixation de Pro<sub>18</sub>. Après coupure HF en présence de p.crésol et de diméthylsulfure nous avons obtenu le peptide brut 18-62 (rendement de 44%) qui correspond à l'association de l'épitope T du sporozoïte et de l'épitope B du LSA.

Le peptide 1-62 brut a été obtenu (avec un rendement de 27%) également par le traitement au fluorure d'hydrogène 1 heure à 0°C en présence de p.crésol et de diméthylsulfure.

L'analyse d'acides aminés sur le produit brut a permis de suivre l'évolution de la synthèse (fig. 3.62). Nous avons observé une



**Figure 3.63: RP-HPLC du peptide 1-62 brut**



**Figure 3.64: RP-HPLC du peptide 18-62 brut**

chute de rendement en quatre zones qui correspondent à des enchaînements de glutamines. Comme pour le peptide LSA 1-34, nous avons observé un blocage de la chaîne peptidique par formation d'acide pyroglutamique. La synthèse s'étant déroulée sans acétylation systématique, nous avons obtenu les peptides désirés contaminés par une large famille de peptides tronqués ou à délétion, ainsi que témoignent les larges pics obtenus par RP-HPLC des produits bruts (fig 3.63, 3.64).

Le peptide 1-62 a été purifié par gel-filtration sur TSK HW (40) S avec un rendement de 22%. La proportion importante de résidus acides a permis de poursuivre la purification du peptide par échange ionique sur résine DEAE (IBF) dans un tampon phosphate 0,05 molaire avec un rendement de 45%. Les conditions de purification ont été mises au point de manière à fixer les contaminants sur la résine, puis éluer le peptide.

Une gel-filtration sur Biogel P4 a suffi pour éliminer la majorité des contaminants du peptide 18-62 avec un rendement de 34%.

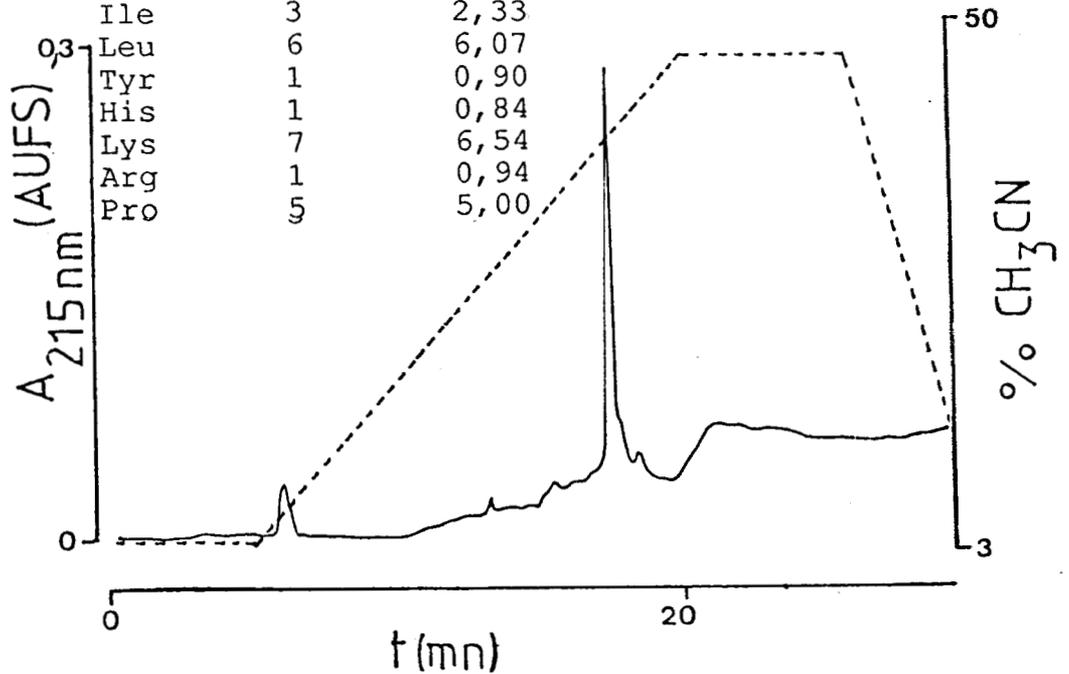
Les peptides purifiés ont été contrôlés par CCM, analyses d'acides aminés, microséquence et RP-HPLC (fig. 3.65, 3.66).

### 5.3 Etudes conformationnelles

L'organisation des peptides a été appréciée par dichroïsme

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	13	12,7
Ser	5	3,8
Glu	15	15,2
Ala	5	4,92
Ile	3	2,33
Leu	6	6,07
Tyr	1	0,90
His	1	0,84
Lys	7	6,54
Arg	1	0,94
Pro	5	5,00



RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

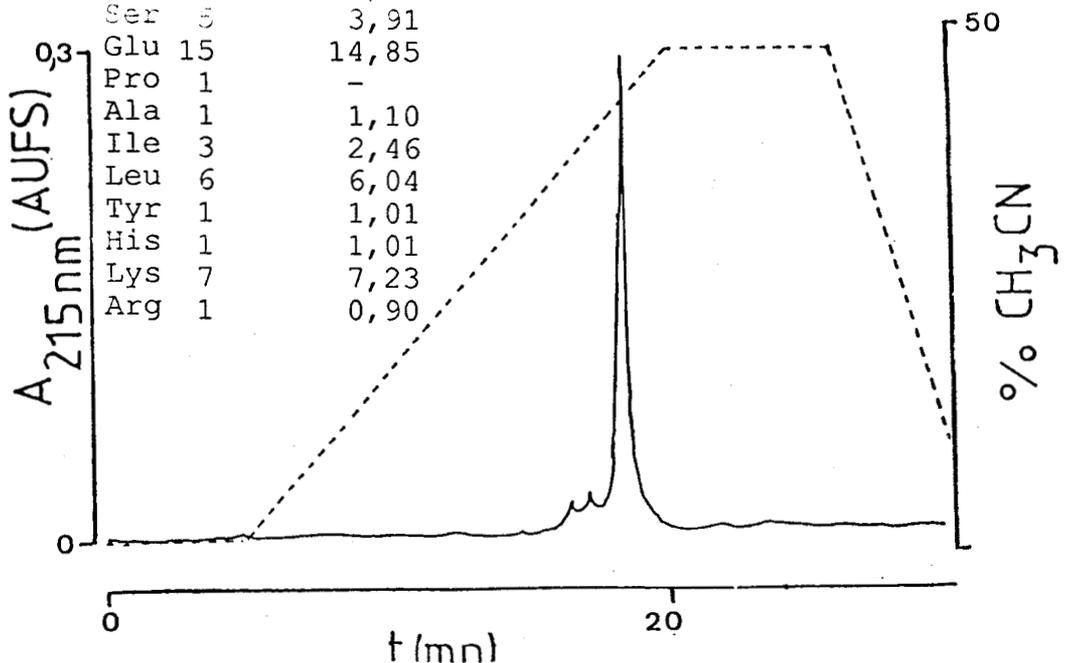
débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.65: caractérisation du peptide 1-62 purifié

analyse d'acides aminés  
quantité théorique trouvée

Asp	4	4,08
Ser	5	3,91
Glu	15	14,85
Pro	1	-
Ala	1	1,10
Ile	3	2,46
Leu	6	6,04
Tyr	1	1,01
His	1	1,01
Lys	7	7,23
Arg	1	0,90



RP-HPLC sur Nucléosil C18 Macherey-Nagel

débit = 1ml/mn

phase mobile: eau/acétonitrile/tampon phosphate à pH = 2,5

Figure 3.66: caractérisation du peptide 18-62 purifié

circulaire dans le Service du Dr A. Bracq à Orléans. Les études ont été réalisées dans des solutions de NaCl 100 mM et TFE. Les peptides avaient été préalablement transformés en chlorhydrates par élution sur une colonne de Sephadex G10 dans HCl 1/1000.

Les spectres des peptides 18-62 et 1-62 sont caractéristiques d'une organisation hélicoïdale dans les solutions aqueuses. La structure secondaire est amplifiée dans le TFE (fig. 3.67, 3.68).

Nous avons également estimé le pourcentage d'hélicité en prenant  $[\theta]_{222\text{nm}} = -35700 \text{ deg.dmole}^{-1}.\text{cm}^2$  (tableau 3.4).

Or seule la séquence 18-62 adopte une structure d'hélice  $\alpha$  dans le peptide 1-62. Nous en avons tenu compte dans nos calculs et avons évalué  $\theta_{222\text{nm}}$  sur 45 au lieu de 62 acides aminés. Dans ces conditions nous obtenons une estimation d'hélicité de 33% (contre 26%).

#### 5.4 préparation des conjugués

La taille des peptides hybrides (45 et 62 acides aminés) était suffisante pour s'affranchir de la molécule porteuse dans les protocoles d'immunisation. Néanmoins, nous avons voulu comparer les résultats immunologiques du peptide 1-62 libre ou associé par liaison covalente à une molécule porteuse.

Pour obtenir un conjugué chimiquement caractérisé et utilisable

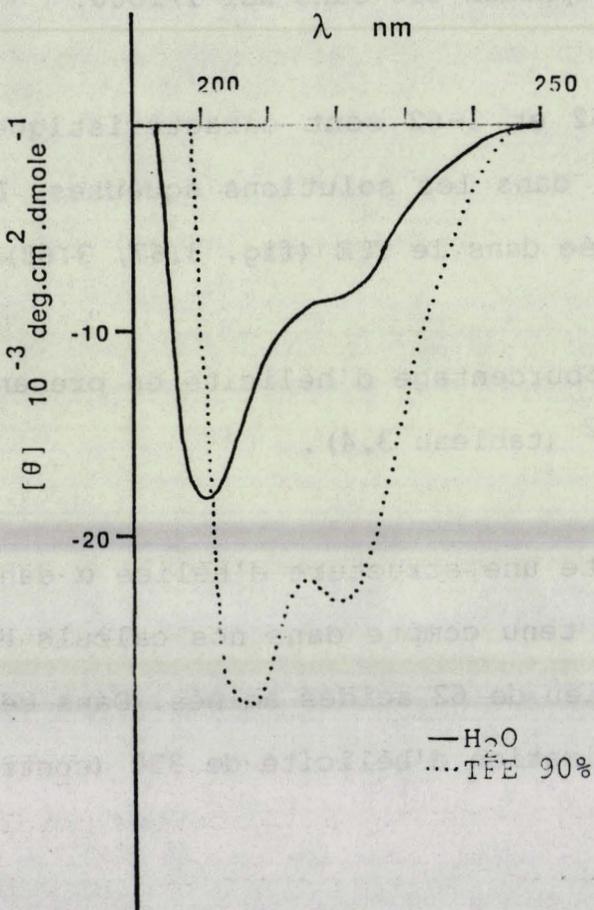


Figure 3.67: spectre dichroïque du peptide 1-62

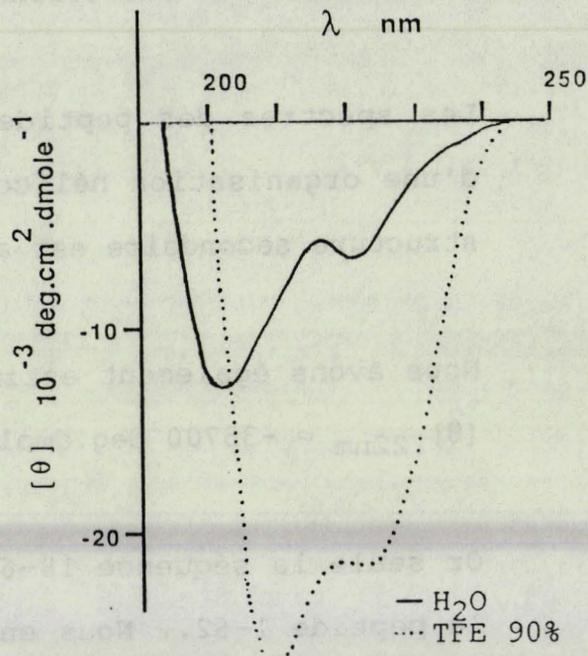


Figure 3.68: spectre dichroïque du peptide 18-62

en essais cliniques, nous avons couplé le peptide à l'anatoxine tétanique au moyen d'un réactif hétérobifonctionnel: l'ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide maléimido-caproïque (MCS).

A l'extrémité N-terminale du peptide 1-62, encore ancré sur la résine, nous avons ajouté une tertio-butyloxycarbone-cystéine dont la chaîne latérale était protégée par un groupement para-méthoxybenzyle. Après clivage par le fluorure d'hydrogène et purification sur TSK HW (40)S, le peptide a été réduit par le dithiothréitol pour obtenir les fonctions thiols libres, puis dessalé sur Sephadex G10.

Le peptide réduit a été ensuite couplé à l'anatoxine tétanique selon le protocole de Lee (1980). Nous avons préalablement activé la protéine par les groupements maléimido-caproïque. Nous avons veillé à maintenir le pH de la réaction à 6,6 pour éviter l'ouverture du cycle maléimidique. Le nombre de fonctions thiols fixées sur la protéine déterminé par la technique d'Ellman, le dosage de la protéine par la méthode de Lowry, ainsi que l'analyse d'acides aminés quantitative réalisée sur l'éluat de dialyse ont permis de quantifier le conjugué: 1,8 mg de peptide couplé par mg d'anatoxine tétanique.

Les essais d'immunisation, réalisés par le Dr. P. Druilhe et son équipe à l'Institut Pasteur de Paris, sont en cours de réalisation.

## 6. CONCLUSION

La grande diversité antigénique, liée aux spécificités de stade et d'espèce du parasite *P. falciparum* entrave considérablement la mise au point d'un vaccin efficace.

Dans un premier temps, nous avons exploré le motif répétitif de la protéine de surface CS. Bien que n'ayant pas élucidé le rôle de cette structure répétitive, nous avons contribué à son étude. Nous avons vérifié que les séquences  $(NANP)_n$  (avec  $n=4$  ou  $n=8$ ) n'étaient pas capables de cibler les récepteurs à la surface des hépatocytes. Les études conformationnelles ont permis d'apprécier la structure de coude  $\beta$  type 1 adoptée par la séquence NPNA. Ces résultats concordent avec l'antigénicité et l'immunogénicité des peptides qui contiennent au moins la séquence  $(NPNA)_2$ .

Pour améliorer la présentation de l'antigène peptidique, nous avons élaboré un modèle hydrophobe, chimiquement défini qui retarde la dispersion du peptide. Nous avons également associé un adjuvant selon une méthode qui permet de caractériser le conjugué. L'association du muramyldipeptide (MDP) à  $(NANP)_4$  et  $(NANP)_8$  n'a pas permis de stimuler la réponse immunitaire contre les peptides, ni contre la protéine. Des études immunopharmacologiques, entreprises sur ces conjugués et le MDP seul, n'ont pas mis en évidence de différence significative au niveau de la stimulation de l'immunité non spécifique. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'absence d'épitope T sur le

motif répétitif qui est incapable d'induire une mémoire immunitaire, pourtant nécessaire dans l'optique d'un vaccin.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressées à un antigène spécifique du stade hépatique, LSA. Dès que la séquence fut connue, grâce aux travaux de Marchand et al., nous avons recherché la structure minimale reconnue par le système immunitaire. L'estimation par dichroïsme circulaire de la structure d'hélice  $\alpha$  adoptée par les peptides suggère que la protéine possède probablement une organisation hélicoïdale et fibrillaire. Nous avons également apprécié l'influence de la structure secondaire sur l'antigénicité des peptides et avons mis en évidence l'existence d'un épitope conformationnel.

Enfin notre recherche d'un vaccin anti-malaria, sûr et efficace, s'est orienté vers l'association d'antigènes correspondant à des stades différents du parasite. Dans un vaccin hybride, nous avons couplé par liaison covalente des épitopes B du sporozoïte et du stade hépatique, ainsi que l'épitope Th2R du sporozoïte afin d'induire une mémoire immunitaire. Ceci permettra de sélectionner différentes populations cellulaires (impliquées dans la réponse immunitaire) qui pourront être rappelées dans les conditions naturelles d'infection.

## **CONCLUSIONS GENERALES**

L'élaboration de vaccins conventionnels est confrontée à des problèmes de production, d'éventuel retour à la virulence de l'organisme pathogène atténué... Afin de surmonter ces difficultés, la recherche actuelle s'oriente vers les vaccins synthétiques. S'inscrivant dans ce contexte, nos recherches se sont focalisées sur les principales étapes d'élaboration d'immunogènes synthétiques.

La sélection de peptides capables de susciter une réaction immunitaire, spécifique de la protéine native, est une étape cruciale. Des paramètres physico-chimiques et biologiques permettent d'orienter le choix. Au travers de la protéine VP2 du poliovirus, nous avons étudié différents critères physico-chimiques, qui prédisent les séquences peptidiques exposées à la surface de la protéine considérée. A l'aide d'un jeu de paramètres structuraux, nous avons repéré les zones hydrophiles, acrophiles, accessibles et mobiles, ainsi que les régions possédant une forte probabilité d'adopter une structure de coude  $\beta$ , généralement exposée. L'élucidation de la structure tridimensionnelle de la capsid du poliovirus nous a permis d'apprécier la bonne exposition à la surface de la protéine ainsi que l'étroite concordance des programmes prédictionnels, à l'exception de celui de Fraga. Néanmoins, l'efficacité de ces méthodes est limitée par l'absence de prise en considération de l'environnement protéique. Des séquences qui apparaissent bien exposées à la surface de la protéine VP2 isolée, se retrouvent en réalité enfouies au sein de la capsid, car la protéine VP2 est associée à d'autres protéines ainsi qu'à l'acide ribonucléique

messenger.

Après la sélection des peptides, leurs synthèses ont été réalisées au moyen de différentes stratégies (phase solide ou homogène) selon la nature des acides aminés à introduire et la quantité à fournir. Au cours de l'étude du *Plasmodium falciparum*, nous avons mis en uvre plusieurs protocoles de synthèse (Boc/TFA, fmoc/pipéridine) et avons également synthétisé des peptides par couplage de fragments.

Les peptides purs obtenus ne sont que des réactifs de laboratoire qu'il faut transformer et caractériser en produits pharmaceutiques à usage clinique. Nous avons élaboré plusieurs immunogènes synthétiques destinés à la vaccination anti-malaria, afin d'induire la production d'anticorps pouvant neutraliser le sporozoïte au début de l'infection, avant que ce dernier ne pénètre dans les hématies. Ce vaccin interromprait ainsi le lien entre le moustique, hôte intermédiaire, et l'homme, hôte définitif. Nous nous sommes intéressées aux deux premiers stades de développement du parasite, à savoir le sporozoïte et le stade hépatique récemment découvert. Différents modèles ont été préparés afin de potentialiser l'immunogénicité et améliorer la présentation de l'antigène par association à une molécule porteuse (sérum albumine bovine, anatoxine tétanique), un adjuvant (muramyldipeptide), ou un acide hydrophobe.

Au cours de notre travail, nous avons accordé une importance particulière à la structure secondaire des immunogènes étudiés.

Des études conformationnelles ont montré que le tétrapeptide répétitif Asn-Pro-Asn-Ala de la protéine CS du sporozoïte adopte une structure de coude  $\beta$  type 1, tandis que les fragments de la protéine LSA du stade hépatique sont partiellement organisés en hélice  $\alpha$  dans l'eau. Lors de la reconnaissance des antigènes peptidiques par le système immunitaire, nos études ont souligné l'importance de leur conformation, réelle ou potentielle, qui peut être exprimée au cours de la liaison avec les anticorps.

Cependant, le motif répétitif de la protéine CS du sporozoïte s'est révélé être un pauvre immunogène. Ces résultats sont sans doute liés à l'absence d'épitope T. Pour conférer une mémoire immunitaire, nous avons alors préparé un vaccin hybride qui associe des épitopes T et B du sporozoïte, correspondant à des séquences différentes de la protéine. Nous y avons également couplé par liaison covalente un peptide issu de la protéine LSA afin d'assurer une protection plus large et tenter de surmonter le problème du polymorphisme antigénique. Ce type d'approche offre une nouvelle stratégie de vaccination qui tend à se développer actuellement.

Ces travaux témoignent du succès grandissant de l'utilisation des peptides en vaccination synthétique. La synthèse peptidique est un outil efficace qui nous a permis de déterminer les épitopes ou les structures minimales actives reconnus par les différentes populations cellulaires impliquées dans la réaction immune. Par ailleurs, la dissection sub-moléculaire permet d'approfondir les

mécanismes des réactions immunologiques et faciliter la conception de futurs vaccins.

## **MATERIELS ET METHODES**

## 1. Méthodes générales

### 1.1. Fixation du premier acide aminé sur une résine chlorométhylée (méthode de Gisin)

Le tertio-butyloxycarbonyl-amino-acide est mis en solution dans un mélange éthanol/eau (4/1), auquel est ajoutée une solution aqueuse d'hydroxyde de césium 10%, jusqu'à l'obtention d'un pH égal à 7.

Le sel de césium du tertio-butyloxycarbonyl-amino-acide, séché par distillation azéotropique au moyen d'un mélange benzène et éthanol (EtOH), est repris dans le DMF (Gold Label). Après avoir ajouté la résine chlorométhylée, le mélange est maintenu sous agitation à 50°C pendant 24 heures.

La résine est alors filtrée et lavée par les solvants suivants:

DMF	3 x 2'
DMF/H <sub>2</sub> O (1/1)	3 x 2'
DMF/EtOH (1/1)	3 x 2'
EtOH	3 x 2'
méthanol (MeOH)	3 x 2'

### 1.2. Détermination de la charge des peptidyl-résines par le dosage des chlorures libérés dans les filtrats de lavage (méthode de Charpentier-Vohlard)

A un volume des filtrats mesuré précisément, nous avons ajouté:

- 25 ml d'AgNO<sub>3</sub> 0,05N
- 10 ml d'HNO<sub>3</sub> 6N
- 5 ml de nitrobenzène
- 1 ml d'une solution d'alun de fer ammoniacal

Ensuite, nous avons effectué un dosage retour par une solution de KSCN 0,05N.

**par dosage des chlorures fixés sur la résine chlorométhylée**

100 à 200 mg de résine pesée avec précision sont mises en solution dans 5 ml de pyridine, et chauffées à reflux pendant deux heures. Après addition de 30 ml d'AcOH 50%, on dose les chlorures libérés par la méthode de Charpentier-Vohlard.

**par la technique de Gisin à l'acide picrique**

Après déprotection et neutralisation, 100 à 200 mg de résines pesées avec précision subissent le traitement suivant:

CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 x 2'
DIEA 5%	3 x 2'
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 x 2'
IPrOH	2 x 2'
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3 x 2'
acide picrique 0,1M	3 x 2'
dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 x 2'
DIEA 5%	3 x 2' *
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 x 2' *
IPrOH	2 x 2'
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3 x 2'

Les filtrats, marqués du symbole \*, sont recueillis et dosés

spectrophotométriquement. La densité optique mesurée à 362 nm (picrate de DIEA:  $\epsilon_{\max} = 15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}$ ) permet de calculer la charge par gramme de peptidyl-résine.

### 1.3.Elongation de la chaîne peptidique

Les solutions d'agents de couplage DCC et HOBT ont été préparées à l'avance pour 10 couplages. L'HOBT, recristallisé dans le méthanol, est dissous dans le DMF Gold Label et conservé à l'abri de la lumière. La DCC a simplement été dissoute dans l'éther éthylique, filtrée sur coton, puis séchée.

**Stratégie BOC/TFA:** le greffage des acides aminés est réalisé selon le protocole suivant:

<b>déprotection</b>	CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	2 x 2'
	TFA 50% dans CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	1 x 2'
		1 x 30'
	CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	3 x 2'
<b>test de Kaiser ou Christensen</b>		
<b>neutralisation</b>	DIEA 5% dans CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	3 x 2'
	CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	3 x 2'
<b>couplage</b>		
<b>lavages après couplage</b>	DMF	3 x 2'
	CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	3 x 2'
<b>test de Kaiser ou Christensen</b>		

Si le test est toujours positif après plusieurs couplages, les fonctions amines libres sont bloquées par acétylation selon le protocole suivant:

- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2 x 2'
- AcOAc 5% dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 x 10'  
contenant 2,5% DIEA
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3 x 2'

**Stratégie Fmoc/pipéridine (couplage de fragments**

**Fmoc-NANP)**

<b>déprotection</b>	CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	2 x 2'
	DMF	2 x 2'
	pipéridine/DMF (1/1)	1 x 2'
		1 x 30'
	DMF	3 x 2'
	H <sub>2</sub> O/dioxane (1/2)	3 x 5'
	DMF	2 x 2'
	CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	3 x 2'
<b>couplage</b>	Fmoc-NANP+ DCC + HOBT dans DMF	
<b>acétylation</b>	AcOAc 5% dans DMF + 1% DIEA	
	DMF	2 x 2'
	CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	3 x 2'

**1.4. Couplage de l'acide aminé**

**par esters préactivés d'HOBT:** une solution de 2,5 Eq. de DCC dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> préalablement refroidie à 0°C est ajoutée à une solution, refroidie également à 0°C, de 2,5 Eq. de BOC-amino-acide et 2,5 Eq. d'HOBT dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et DMF. Après agitation 10 mn à 0°C, la dicyclohexyle-urée (DCU) formée est éliminée par filtration, et l'ester d'HOBT est ajouté à 1 Eq. de peptidyl-résine.

**par anhydride symétrique:** une solution de 2,5 Eq. de DCC dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , refroidie à  $0^\circ\text{C}$ , est ajoutée à une solution préalablement refroidie à  $0^\circ\text{C}$  de 5 Eq. de BOC-amino-acide dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Après incubation 10 mn à  $0^\circ\text{C}$ , la DCU est éliminée par filtration, le filtrat est évaporé sous vide et repris dans le DMF avant d'être introduit dans le réacteur contenant 1 Eq. de peptidyl-résine.

### 1.5 Contrôles après déprotections et couplages

#### **Dosage qualitatif des fonctions amines primaires**

A quelques milligrammes de peptidyl-résine (5 à 10 mg), sont ajoutés 3 gouttes des réactifs suivants:

- A: 80 g de phénol dans 20 ml d'éthanol
- B: 2 ml d' une solution de KCN 0,001M dans 100 ml de pyridine distillée
- C: 500 mg de ninhydrine dans 10 ml d'éthanol

Après incubation à  $110^\circ\text{C}$  pendant 5 minutes, l'observation de la couleur bleue des grains de résine et de la solution indique la présence de fonctions amines primaires libres (le test est positif). Par contre , une solution restée jaune ainsi que les grains incolores témoignent de l'absence de fonctions amines réactives (test négatif). Le test doit être positif après déprotection, et négatif après couplages qui peuvent être répétés si la réaction se révèle incomplète.

#### **Dosage quantitatif à la ninhydrine des fonctions amines primaires**

Ce test nécessite la préparation des solutions A,B et C décrites

précédemment. Le protocole varie suivant les concentrations d'amines à doser.

**Concentration d'amine comprise entre 0 et 0,1  $\mu$ moles:**

2 à 5 mg de peptidyl-résine, pesés précisément, sont introduits dans un tube de verre. 0,1 ml de la solution A et 0,025 ml de la solution B sont ajoutés. L'ensemble est chauffé à 100°C pendant 10 minutes puis refroidit sous courant d'eau froide.

Après addition de 1 ml d'éthanol à 60% dans l'eau, le mélange est filtré au travers de laine de verre et lavé deux fois par 0,2 ml d'une solution 0,5M de chlorure de tétraéthylammonium.

Les filtrats recueillis sont portés à 2 ml par de l'éthanol à 60% dans l'eau. L'absorbance de l'échantillon est mesurée à 570 nm.

**Concentration d'amine comprise entre 0,1 et 2  $\mu$ moles:**

Une même quantité de résine est traitée de façon similaire par les solutions A et B avant d'être diluée par 2 ml d'éthanol à 60%. Le mode opératoire est ensuite identique à celui indiqué ci-dessus jusqu'à l'étape de filtration où la résine est lavée deux fois 0,5 ml de la solution 0,5 M de chlorure de tétraéthylammonium. Les filtrats recueillis sont portés à 25 ml par de l'éthanol à 60%.

La charge de la résine se déduit de la mesure photométrique au moyen de la formule:  $DO = \epsilon l C$

DO = absorbance

$\epsilon$  = coefficient d'extinction à 570 nm soit  $1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}$ ,

l = longueur de la cellule (= 1cm),

C = concentration (mole/L)

**Dosage qualitatif des fonctions amines secondaires par le test de Christensen (après déprotection ou couplage sur une proline)**

A quelques grains de peptidyl-résine, sont ajoutés:

- 200  $\mu$ l d'acétone
- 50  $\mu$ l d'une solution saturée de 2,3,5,6-tétrachloro-1,4-benzoquinone (chloranil) dans le toluène.

Après agitation à température ambiante pendant 5 minutes, on observe la coloration grains de peptidyl-résine. Les grains ont une couleur bleu-verte dans une solution restée jaune si des fonctions amines secondaires sont présentes (test positif). Par contre, l'absence de coloration révèle la disparition de fonctions amines secondaires libres (test négatif).

1.6. Libération du peptide de la résine par le fluorure d'hydrogène

**forte concentration de fluorure d'hydrogène ou "high HF"**

La coupure est réalisée dans une installation en téflon, située sous une hotte ventilée. Le fluorure d'hydrogène gazeux est congelé dans un premier réacteur au moyen d'azote liquide. Après liquéfaction par réchauffement à la température ambiante, l'HF est distillé dans un deuxième réacteur où se trouvent la peptidyl-résine, le para-crésol et éventuellement le diméthylsulfure (10 ml d'HF/1g de peptidyl-résine/1 ml d'anisole ou para-crésol/1 ml de diméthyl-sulfure). Après agitation 1 h à 0°C, le fluorure d'hydrogène est chassé sous vide. La résine est

ensuite lavée à l'éther éthylique, puis par des solutions aqueuses d'acide acétique (5 à 50%) afin de solubiliser le peptide qui est séparé de la résine par filtration. Les filtrats recueillis sont lyophilisés.

**faible concentration de fluorure d'hydrogène ou "low HF"**

La déprotection et le clivage du peptide sont réalisés avec une faible concentration de fluorure d'hydrogène: 2,5 ml d'HF/1g de peptidyl-résine/1 ml de para-crésol/6,5 ml de diméthyl-sulfure. Après agitation sous vide deux heures à 0°C, le fluorure d'hydrogène est évaporé. Le peptide est soumis éventuellement à un deuxième traitement par 90% d'HF s'il contient des acides aminés protégés par des groupements résistants: Arg(tos), Arg(NO<sub>2</sub>), Asp(c-hex), Cys(4-MeBzl), ou encore Tyr(2,6-Cl-Bzl) qui est partiellement déprotégé par "low HF".

1.7 Analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale

**hydrolyse en phase liquide**

A 1 mg de peptide, on ajoute dans un tube à hydrolyse 1 ml d'eau distillée et 1 ml d'HCl concentré. Puis l'hydrolyse est effectuée à 110°C sous vide pendant 24 ou 72 heures si le peptide contient un enchainement d'acides aminés hydrophobes.

**hydrolyse phase gaz**

Une solution de 10 nmoles de peptide est déposée dans un tube de verre et placé dans un dessiccateur. Sous la plaque de céramique, un bécher contient 2 ml d'HCl 5,6N et 0,14 ml d'acide

thioglycolique. Le dessiccateur est ensuite mis sous vide et placé dans une étuve à 110°C pendant 24h.

### **hydrolyse sur résine**

On ajoute 1 ml d'HCl 12 N et 1 ml d'acide propionique à 1 mg de peptidyl-résine et on chauffe sous vide 2h. à 130°C ou 1h. à 160°C.

### **Analyse d'acides aminés**

après hydrolyse acide totale, l'échantillon est analysé sur un appareil Beckman system 7300. Les acides aminés sont quantifiés après séparation sur une colonne échangeuse d'ions et détection post-colonne par coloration à la ninhydrine.

### 1.8 Chromatographie sur couche mince

Les solutions peptidiques sont déposées sur:

- silice sur plaque d'aluminium
- cellulose sur plaque de verre.

Après migration dans un système de solvants appropriés, les plaques sont révélées par un réactif à la ninhydrine (spécifique des fonctions amines), puis par la technique de Reindel-Hoppe (révélateur des liaisons peptidiques). Les peptides contenant l'arginine sont révélés spécifiquement par le réactif de Sakaguchi. Le réactif d'Ehrlich permet de révéler les peptides

possédant du tryptophane.

**Révélation à la ninhydrine:**

les plaques sont révélées par une solution de:

- ninhydrine : 1 g
- éthanol : 375 ml
- acide acétique : 75 ml
- collidine : 15 ml

puis chauffées 3' dans l'étuve à 110°C.

**Révélation par le réactif de Reindel-Hoppe**

Après décoloration par hypochlorite de sodium à 8% et acidification par l'acide acétique 20%, les plaques sont séchées 75" à 110°C puis révélées par un mélange à volume égal des solutions suivantes:

- 25g de tétraméthyl-diaminodiphenylméthane dans 500 ml d'acide acétique 20%
- 5% iodure de potassium dans l'eau distillée.

**Réactif de Sakaguchi**

- $\alpha$ -naphtol 0,1% dans l'éthanol absolu
- NaOCl 0,53% dans l'eau

La plaque est aspergée par la solution d' $\alpha$ -naphtol, puis séchée à l'air avant d'être révélée par la solution de NaOCl. Les peptides contenant de l'arginine prennent une couleur orangée.

**Réactif d'Ehrlich**

- (1) p.diméthylaminobenzaldéhyde 10% dans l'acide chlorhydrique

concentré

(2) acétone

La plaques est introduite dans une cuve saturée par le mélange des solutions (1) et (2) (1/4; v/v). Une tache pourpre indique la présence de tryptophane.

### 1.9 Couplage sur une molécule porteuse

#### 1.9.1. Préparation de la protéine porteuse

Les protéines porteuses que nous avons utilisées au laboratoire sont la sérum albumine bovine (BSA) et l'anatoxine tétanique (AT). La BSA et l'AT dont les séquences sont connues contiennent respectivement 57 et 103 résidus lysine, ce qui fait avec la fonction amine N-terminale un total de 850 et 660 nEq  $\text{NH}_2$  par mg de protéine. Ces chiffres purement théoriques ne tiennent pas compte des résidus lysine enfouis dans la molécule et qui n'interviendront pas dans la réaction de couplage. Du fait que l'AT est partiellement formylée bloquant ainsi un certain nombre de fonctions  $\text{NH}_2$ .

La BSA sous forme de poudre est solubilisée dans un tampon au pH approprié pour la réaction de couplage. L'AT et le KLH déjà en solution, sont tout d'abord dialysés sur membrane PM 10 contre le tampon de couplage, puis le dialysat récupéré est dosé en protéine selon la technique de Lowry.

### 1.9.2. Réactions de couplage

#### 1.9.2.1 Couplage au moyen du glutaraldéhyde

Cette réaction qui met en jeu les fonctions  $\text{NH}_2$  du peptide à coupler et de la protéine porteuse est réalisée avec un excès de 3 mEq  $\text{NH}_2$  du peptide pour 1mEq  $\text{NH}_2$  de la protéine porteuse.

Le peptide et la protéine porteuse en solution sont mis en contact avant d'ajouter le glutaraldéhyde en solution aqueuse à 2,5%. La quantité totale de glutaraldéhyde additionnée sur une période de 8 jours correspond à 2 fois le nombre de mEq  $\text{NH}_2$  mis en jeu par la protéine porteuse. La réaction est stoppée par dialyse sur membrane YM5 contre du sérum physiologique. L'ultrafiltration permet l'élimination des sels et réactifs (glutaraldéhyde ou peptide) n'ayant pas réagi. Afin de calculer le rendement de couplage, l'éluat récupéré est soumis à une hydrolyse acide totale suivie d'une analyse d'acides aminés.

#### 1.9.2.2. Couplage avec l'ester 6-maléimidocaproïque N-hydroxysuccinimide

##### **Activation de l'acide maleimidocaproïque par l'hydroxysuccinimide**

Les réactifs sont ajoutés mole à mole soit :

17,5 mg d'acide maleimidocaproïque et 10 mg d'hydroxysuccinimide dissous dans du DMF d'une part et

18 mg de dicyclohexylcarbodiimide dissous dans du DMF d'autre part sont placés à 0°C pendant 10 minutes.

Les deux solutions sont ensuite réunies et laissées sous incubation pendant 1 à 2 heures à 0°C et une nuit à température ambiante.

#### **Fonctionnalisation de l'anatoxine tétanique (AT)**

Après élimination du précipité de dicyclohexylurée par centrifugation, l'ester est additionné avec un excès de 20 à la protéine porteuse préalablement dialysée contre un tampon phosphate 0,1M pH 6,6 (soit 17 mg d'AT).

Après 24h d'incubation le mélange est repris par le même tampon phosphate et dialysé sur membrane YM 10 contre ce tampon jusqu'à élimination de l'ester n'ayant pas réagi.

La quantité de protéine récupérée est évaluée par un dosage de Lowry. La capacité de fixation des cystéines par la protéine est évaluée par un dosage d'Ellman.

#### **Réduction des résidus cystéine du peptide**

Le peptide sous forme disulfure est réduit par 10 excès de dithiothréitol dans un tampon phosphate 0,1M pH 8-9. La réduction peut être contrôlée par HPLC analytique. Le peptide sous forme SH reste stable en milieu réducteur ou en milieu acide.

Le peptide réduit est séparé de l'excès de dithiothréitol par filtration sur gel Séphadex G25 dans l'acide acétique à 5%. Des précautions telles que la lyophilisation sous azote doivent être prises pour éviter l'oxydation du peptide.

**Réaction de couplage**

Le peptide sous forme réduite est ajouté, avec un excès de 3 mEq SH, à la protéine porteuse activée. La réaction de couplage se déroule à pH 7, une nuit à température ambiante. Elle est stoppée par dialyse sur membrane YM5.

1.10. Dosage du taux de protéine (Lowry)

L'étalon est constitué d'une solution de BSA à 1mg/ml. Les points de la gamme étalon sont 10 - 25 - 50 - 75 - 100 µg.

Chaque point de la gamme étalon, chacun des échantillons et le "blanc" sont contenus dans un volume de 100 µl.

Dans chaque tube 1ml du mélange suivant est ajouté:

- 1 volume d'une solution de carbonate 20% (200 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> par litre)
- 1 volume de la solution
 

CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	2g
Tartrate Na et K	4g
eau qsp	1l
- 2 volumes de NaOH 0,8N (32g par litre)
- 2 volumes d'H<sub>2</sub>O
- 2 volumes de sérum physiologique.

Après incubation de 10 minutes à l'obscurité, on ajoute dans chaque tube 0,5 ml de réactif de Folin<sup>®</sup> dilué au 1/6<sup>ème</sup>.

Après incubation de 30 minutes à l'obscurité, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 750 nm.

### 1.11. Dosage des fonctions thiols (Ellman)

Cette méthode permet de vérifier la réduction du peptide, ou le dosage de la consommation de cystéine par la protéine activée.

L'étalon est constitué d'une solution de chlorhydrate de cystéine-SH  $2 \cdot 10^{-3}M$  préparée extemporanément avec de l'eau dégazée et saturée en azote (35,04 mg/100 ml).

Les points de la gamme se situent entre 0 et 200 nM de Cys-SH sous un volume de 100 $\mu$ l.

Pour évaluer la consommation de cystéine par la protéine activée, 200 nM de Cys-SH sont ajoutées à 250 nM de protéine activée. A chaque échantillon à doser et aux points de la gamme sont ajoutés:

- 300  $\mu$ l de tampon Tris 0,2M pH 8,2 [24,2 g/l de Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane ajusté au pH 8,2 par HCl 1N].
- 20  $\mu$ l d'une solution de 5-5' dithiobis (2 nitrobenzoic acid) (79,2 mg/20ml d'éthanol).
- méthanol qsp 2 ml

Après trente minutes, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 412 nm. La différence de DO entre le point à 200 nM de la gamme étalon et l'échantillon de la protéine activée permet de calculer la consommation de cystéine et donc le nombre de résidus lysine / Mole de protéine activée.

## 2.Synthèse des peptides

Le Pr. P. Marcincal et le Dr. J-C Gesquière ont élaboré un programme informatique d'aide à la synthèse (SAS ou synthesis aid system). Il permet d'attirer l'attention de l'opérateur sur les éventuelles difficultés qu'il rencontrera. Nos présentons ci-dessous des extraits de ce cahier de laboratoire:

S.A.S.

Synthesis Aid System

REFERENCE DE LA SEQUENCE A SYNTHETISER: POLIO VP2 TYP1 14  
158

NOMBRE D'AMINO-ACIDES: 14 INDICE FICHER: 109

LA SEQUENCE A SYNTHETISER EST:

TYR-GLN-ASN-ALA-ASN-PRO-GLY-GLU-LYS-GLY-GLY-THR-PHE-THR-

LA SYNTHESE S'EFFECTUE SELON L'ORDRE:

THR-PHE-THR-GLY-GLY-LYS-GLU-GLY-PRO-ASN-ALA-ASN-GLN-TYR-

NOM DE L'OPERATEUR : CHRISTINE

RESINE UTILISEE: CHLOROMETHYLE LOT :

THR est deja sur la resine-son poids est inclus dans celui figurant ci-apres  
Poids de resine utilise: 3(gramme); charge: .57(m.eq) exces utilise: 2.5

POIDS DE PEPTIDE BRUT ATTENDU: .85 par g de resine  
soit 2.55 g pour cette synthese

Poids de DCC pour chaque couplage avec exces=1 : 352.26 mg

Poids de DCC pour chaque couplage avec exces=2.5 : 880.65 mg

Poids de HOBT hydrate pour chaque couplage avec exces=1 : 261.63 mg

Poids de HOBT hydrate pour chaque couplage avec exces=2.5 : 654.075 mg

NUMERO DU SYNTHETISEUR UTILISE :

TYPE D'AGITATION : PAR SHAKER

Acide amine a incorporer numero 14 : THR=119.1 DATE:

Deja incorpore sous forme Boc (O-Bzl)THR

Acide amine a incorporer numero 13 : PHE=165.2 DATE:

Vous travaillez avec le :

**BOC PHE**

Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif

POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 1132.87 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LO

AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT

PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: KAISER :

RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: KAISER :

ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 3.252 g

Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.526 meq/g

REMARQUES :

Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) : .276 meq/g  
 REMARQUES :

Poids theorique de BOC peptidyl resine en fin de synthese: 6.203 g

**TRAITEMENT PAR HF**

La coupure HF doit s'effectuer en presence de:  
 Resol: 1g/10ml de HF/1g de resine

Nombre de groupes resistants a HF:

- Am: 0
- Ap: 0
- Ar: 0

Poids total theorique de peptide brut : 2.537 g

Poids theorique par g de peptidyl-resine obtenue : .409 g

Poids theorique de peptide totalement deprotege : 2.537

Poids par gramme de peptidyl resine a couper : .409

**RENSEIGNEMENTS DIVERS**

Poids moleculaire du peptide: 1483.6  
 Fonctions ionisables-La sequence comporte:

- ARG: 0
- ASP: 2
- GLU: 2
- HIS: 0
- LYS: 1

**CONTAMINANTS PREVISIBLES**

En dehors de problemes majeurs, restent les contaminants imprevisibles .....

**ANALYSE D'ACIDES AMINES APRES HYDROLYSE**

E 4 Aminoacides	Calculé	ANALYSE 1		ANALYSE 2		ANALYSE 3		ANALYSE 4
		HT...heures	Trouve	HT...heures	Trouve	HT...heures	Trouve	HT...heures
A	1							
G	0							
P	2							
S	0							
U	2							
Y	3							
S	0							
E	0							
C	0							
S	1							
H	0							
E	1							
O	1							
R	0							
R	2							
P	0							
R	1							
L	0							

## 2.1 Synthèse des peptides issus de la protéine VP2 du poliovirus

### 2.1.1 Peptide 38-61

Le peptide 38-61 a été synthétisé manuellement sur une résine chlorométhylée, que nous avons estérifiée par le sel de césium de Boc-Cys(acm)-résine (0,35 mEq./g). L'élongation du peptide a été réalisée selon la stratégie Boc/TFA. Nous avons débuté la synthèse sur 2g de N $\alpha$ -Boc-acm-Cys-résine

AA	protection des chaînes latérales	méthodes de couplage	couplages	acétylation
24	Cys	Acm	DCC/HOBt	
23	Ala		DCC/HOBt	600'
22	Ala		DCC/HOBt	120'
21	Val		DCC/HOBt	600'
20	Asp	O-Bzl	DCC/HOBt	120'
19	Pro		DCC/HOBt	600'
18	Glu	O-Bzl	DCC/HOBt	120' 60'
17	Thr	O-Bzl	DCC/HOBt	180'
16	Pro		DCC/HOBt	120'
15	Gln		DCC/HOBt	30' 30'
14	Asp	O-Bzl	DCC/HOBt	120'
13	Val		DCC/HOBt	120' 60'
12	Pro		DCC/HOBt	120' 60'
11	Asn		DCC/HOBt	60' 60'
10	Ala		DCC/HOBt*	120' 120'
9	Glu	O-Bzl	DCC/HOBt	120' 60'
8	Ser	O-Bzl	DCC/HOBt	620' 60'
7	Asp	O-Bzl	DCC/HOBt	620'
6	Arg	tos	DCC/HOBt	180' 120'
5	Leu		DCC/HOBt	620'
4	Tyr	diCl-Bzl	DCC/HOBt	240'
3	Glu	O-Bzl	DCC/HOBt	620'
2	Pro		DCC/HOBt	120' 60' 120'
1	Trp		DCC/HOBt	620' 120' 120'

DCC/HOBt\* : préincubation 10' à 0°C

Nous avons obtenu en fin de synthèse 2,97g de peptidyl-résine

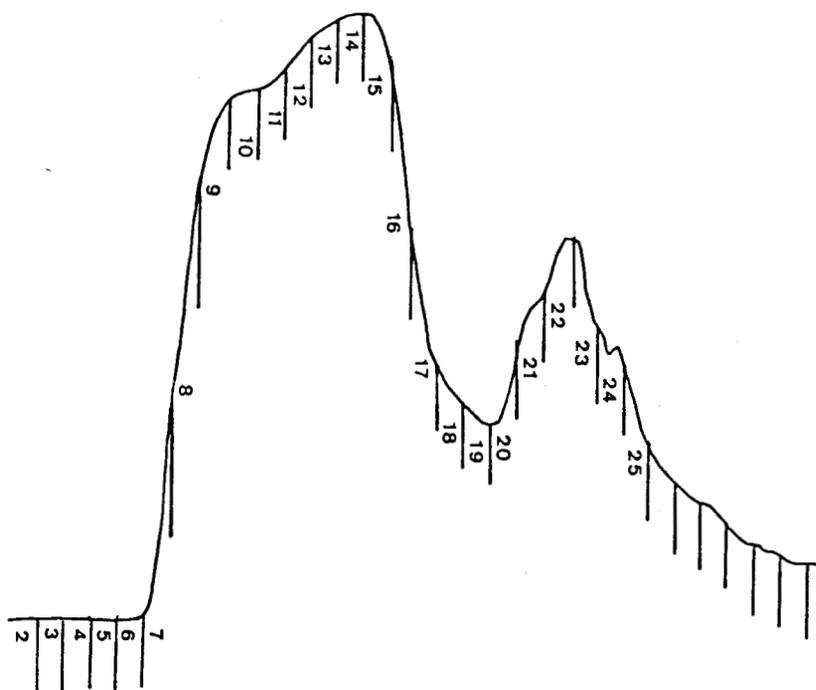


Figure 4.1: chromatogramme d'enregistrement de gel-filtration sur GF 05 du peptide 38-61

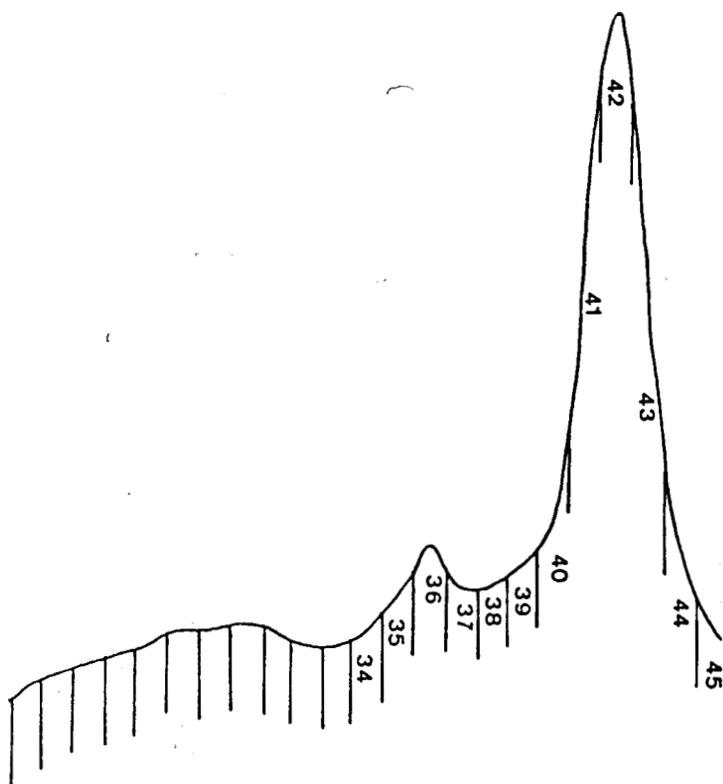


Figure 4.2: chromatogramme d'enregistrement de gel-filtration sur Biogel P4 du peptide 38-61

(rendement=35%). Après la coupure "high HF" (90%) de 1g de peptidyl-résine à 0°C en présence de 10% d'anisole et 5% d'éthyle méthyle sulfure, 403 mg de peptide brut ont été libérés.

Après lyophilisation, le peptide brut a été alors purifié par gel-filtration sur une résine de tris acryl GF05 (IBF), éluée avec AcOH 5%. La détection du peptide à la sortie de la colonne est réalisé par lecture de l'absorbance à 230 nm (fig.4.1). Les tubes collectés ont été contrôlés par RP-HPLC et chromatographie sur couche mince. Les tubes 12 à 14 sont rassemblés et lyophilisés pour donner 23 mg de peptide pur à 73% avec un rendement de 21%.

Nous avons également déposé 57 mg de peptide brut sur une colonne de Biogel P4 fine, éluée avec AcOH 5% (fig.4.2). Nous avons obtenu 13 mg de peptide pur à 84% avec un rendement de 22%.

poids	résine	dimensions	$\lambda$	éluant	débit	rendement	fractions	pureté
152 mg	GF 05	2,5x100cm	230 nm	AcOH 5%	12ml/h	21%	42-44	73%
57 mg	P4	1,5x100cm	240 nm	AcOH 5%	8ml/h	22%	41-43	84%

CCM dans chloroforme/méthanol/ammoniaque (5/5/1) : Rf = 0,77

2.1.2 Peptide 72-88

Le peptide a été synthétisé manuellement sur une Boc-Asp(O-Bzl)-résine (0,55 mEq./g), selon le protocole Boc/TFA. Après couplage du tryptophane, nous avons déprotégé les acides aminés suivants en présence d'un scavenger: l'éthane dithiol.

2g de résine fonctionnalisée par l'acide aspartique nous ont permis d'obtenir en fin de synthèse 2,53g de peptidyl-résine (rendement : 39%).

	AA protection des chaînes latérales	méthodes de couplage	couplages				acétylation
17	Asp O-Bzl						
16	Arg tos	DCC/HOBt	120'	300'			+
15	Leu	DCC/HOBt	600'	120'			
14	Ala	DCC/HOBt	600'	240'			+
13	Asp O-Bzl	DCC/HOBt	120'				
12	Pro	DCC/HOBt	600'				
11	Leu	DCC/HOBt	240'	30'			
10	Lys Cl-Z	DCC/HOBt	300'				
9	Trp	DCC/HOBt	600'				
8	Trp	DCC/HOBt	120'				
7	Trp	DCC/HOBt	120'				
6	Gly	DCC/HOBt	120'				
5	Arg tos	DCC/HOBt	620'				
4	Ser O-Bzl	DCC/HOBt	120'	60'	60'		
3	Glu O-Bzl	DCC/HOBt	620'				
2	Lys Z	DCC/HOBt	360'	620'	120'	620'	
1	Thr O-Bzl	DCC/HOBt	120'	620'	620'	120'	120' 120'

La coupure de 1g de peptidyl-résine, au fluorure d'hydrogène (90%), en présence d'anisole et éthyle méthyle sulfure, a permis de libérer 333 mg de peptide brut.

Nous avons purifié ce peptide par gel-filtration. Nous avons déposé 107 mg au sommet d'une colonne de Biogel P2 fine, éluée

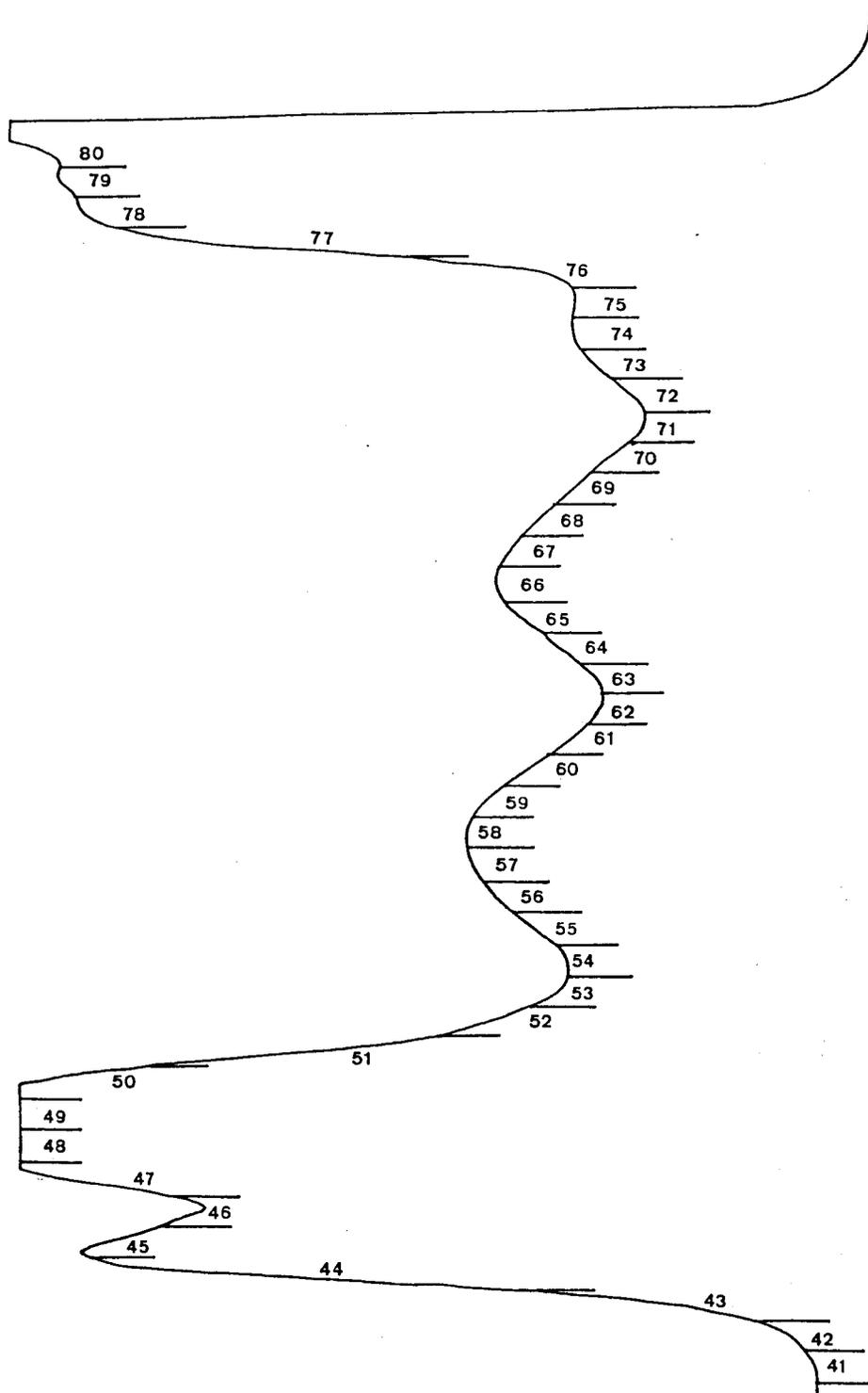


Figure 4.3: chromatogramme d'enregistrement de gel-filtration sur Biogel P4 du peptide 72-88

avec AcOH 5%. Le chromatogramme (fig.4.3) obtenu a mis en évidence deux pics principaux, correspondant aux tubes 44-48 et 79-80 qui, de manière surprenante, présentaient après lyophilisation le même temps de rétention par RP-HPLC sur Nucléosil C18 et également la même composition en acides aminés après hydrolyse acide totale. Nous avons attribué ce phénomène à l'association du peptide sur lui-même par liaisons hydrophobes. Par conséquent, il était élué le premier sur la colonne de Biogel P2 (fractions 44-48). Ensuite était élué le peptide attendu correspondant à la fraction 79-80.

poids	gel	dimensions	$\lambda$	éluant	débit	rendement	fractions
107mg	P2	2,5x100cm	235nm	AcOH 5%	11ml/h	9%	44-48
						6,5%	79-80

CCM dans:

butanol/acide acétique/acétate d'éthyle/eau (1/1/1/1)	Rf=0,13
pyridine/acide acétique/eau (10/6/3)	Rf=0,83

### 2.1.3. Peptide 145-158

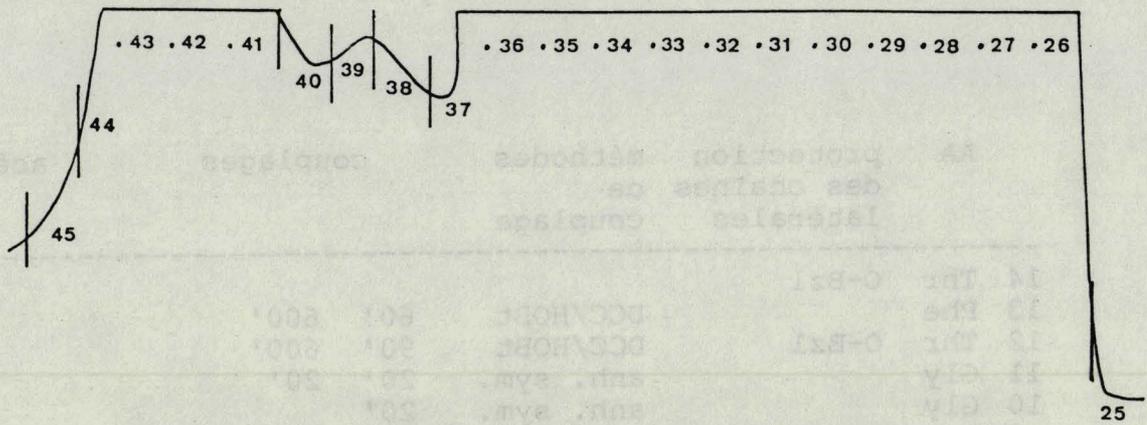
Le peptide 145-158 a été synthétisé semi-automatiquement sur 3g de résine fonctionnalisée par la Boc-tyrosine(2,6-diCl-Bzl) et chargée à 0,57 mEq./g, selon le protocole Boc/TFA utilisé pour les peptides précédents.

	AA	protection des chaînes latérales	méthodes de couplage	couplages			acétylation
14	Thr	O-Bzl					
13	Phe		DCC/HOBt	60'	600'		
12	Thr	O-Bzl	DCC/HOBt	90'	600'		
11	Gly		anh. sym.	20'	20'		
10	Gly		anh. sym.	20'			
9	Lys	Cl-Z	DCC/HOBt	120'			
8	Glu	O-Bzl	DCC/HOBt	60'	30'		
7	Gly		anh. sym.	15'	20'		
6	Pro		anh. sym.	60'			
5	Asn		DCC/HOBt*	30'	30'	600' 90'	+
4	Ala		DCC/HOBt	60'			
3	Asn		DCC/HOBt*	30'	60'		
2	Gln		DCC/HOBt*	30'			
1	Tyr	diCl-Bzl	DCC/HOBt	60'	60'	60'	

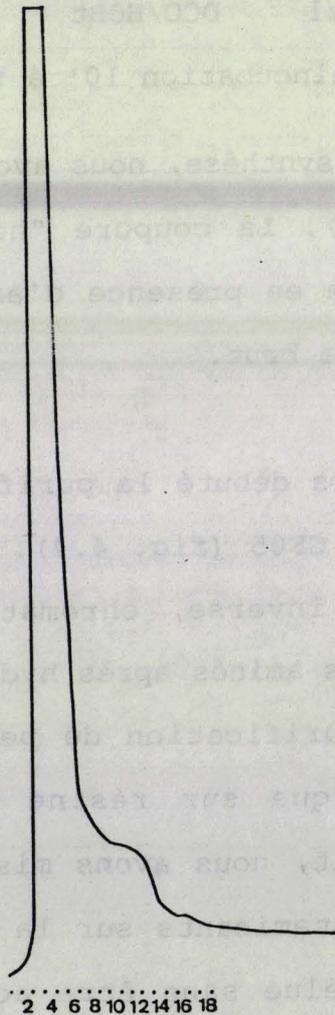
DCC/HOBt\* : préincubation 10' à 0°C

A la fin de la synthèse, nous avons obtenu 5g de peptidyl-résine (rendement=62%). La coupure "high HF" effectuée sur 2,5g de peptidyl-résine en présence d'anisole nous a permis d'obtenir 1,58g de peptide brut.

Nous avons alors débuté la purification par une gel-filtration sur tris-acryl GF05 (fig. 4.4). Le produit a été contrôlé par HPLC en phase inverse, chromatographie sur couche mince et analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale. Nous avons poursuivi la purification du peptide par une chromatographie d'échange ionique sur résine CM tris-acryl, échangeuse de cations. En fait, nous avons mis au point les conditions pour retenir les contaminants sur la résine, tandis que le produit attendu était élué sans être accroché. Le protocole le plus satisfaisant a été une élution sous des conditions isocratiques,



**Figure 4.4: chromatogramme d'enregistrement de gel-filtration sur GF 05 du peptide 145-158**



**Figure 4.5: chromatogramme d'enregistrement d'échange ionique sur CM tris-acryl du peptide 145-158**

l'éluant étant l'acétate d'ammonium 0,01M sous un pH de 3,9 (fig. 4.5) Il n'a pas été nécessaire d'éluer sous un gradient de pH ou de force ionique. Le peptide pur à 85% a été identifié par analyse d'acides aminés, et son homogénéité a été vérifiée par chromatographie sur couche mince et HPLC en phase inverse.

pooids gel	dimensions	éluant	$\lambda$	débit	rdt	fractions	pureté
350mg GF05	2,5x100cm	AcOH 5 %	237nm	12,5ml/h	30%	28-36	78%
75mg CM trisacryl	1,5x18cm	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 0,01M pH=3,9	240nm	15ml/h	24%	3-4	85%

CCM dans :

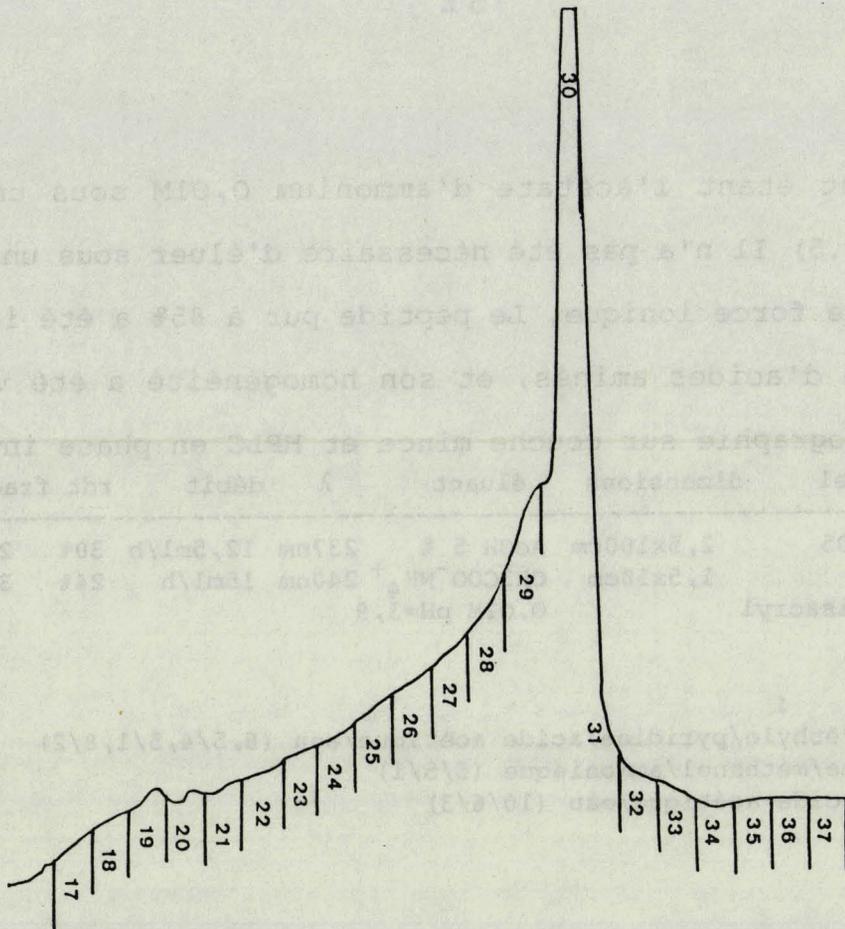
acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (6,5/4,5/1,8/2)	Rf=0,53
chloroforme/méthanol/ammoniaque (5/5/1)	Rf=0,18
pyridine/acide acétique/eau (10/6/3)	Rf=0,71

#### 2.1.4 Peptide 162-174

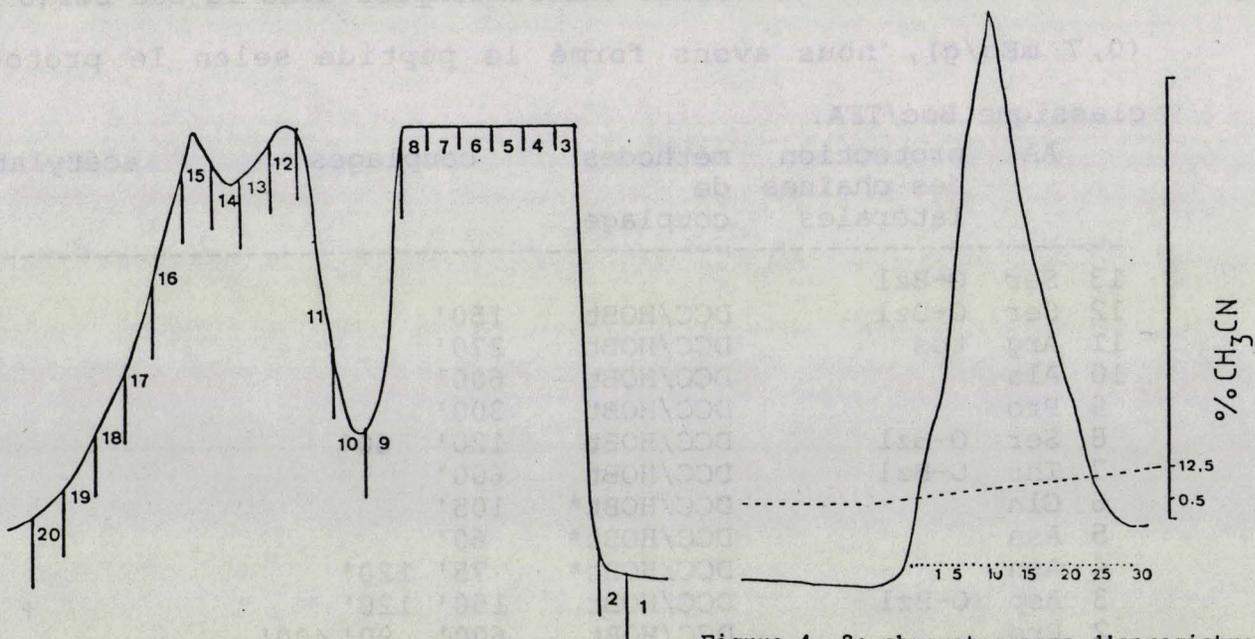
Le peptide 162-174 a été synthétisé manuellement. Après estérification de la résine chlorométhylée avec la Boc-Ser(O-Bzl) (0,7 mEq/g), nous avons formé le peptide selon le protocole classique Boc/TFA.

AA	protection des chaînes latérales	méthodes de couplage	couplages		acétylation
13 Ser	O-Bzl				
12 Ser	O-Bzl	DCC/HOBt	150'		
11 Arg	tos	DCC/HOBt	270'		
10 Ala		DCC/HOBt	600'		
9 Pro		DCC/HOBt	300'		
8 Ser	O-Bzl	DCC/HOBt	120'	60'	
7 Thr	O-Bzl	DCC/HOBt	600'		
6 Gln		DCC/HOBt*	105'		
5 Asn		DCC/HOBt*	60'		
4 Asn		DCC/HOBt*	75'	120'	
3 Asp	O-Bzl	DCC/HOBt	150'	120'	+
2 Pro		DCC/HOBt	600'	90' 400'	
1 Thr	O-Bzl	DCC/HOBt	120'	120' 90'	

DCC/HOBt\* : préincubation 10' à 0°C



**Figure 4.6: chromatogramme d'enregistrement de gel-filtration sur Biogel P4 du peptide 162-174**



**Figure 4. 8: chromatogramme d'enregistrement de purification sur ODS M9 du peptide 162-174**

**Figure 4.7 : chromatogramme d'enregistrement d'échange ionique sur CM 52 du peptide 162-174**

Nous avons démarré la synthèse peptidique sur 3g de résine fonctionnalisée, et avons obtenu 5,19g de peptidyl-résine en fin de synthèse (rendement=57%). Nous avons clivé 2,5g de peptidyl-résine par le fluorure d'hydrogène en présence d'anisole, et avons libéré 873 mg de peptide brut.

La gel-filtration sur Biogel P2 fine fut la première purification. Le chromatogramme obtenu (fig. 4.6) met en évidence une fuite en avant du peptide, attribuée sans doute à l'existence d'un équilibre d'associations intermoléculaires. Les tubes 21-27 correspondant à cette fuite en avant ont été rassemblés et lyophilisés pour donner 70 mg de peptide pur. Les tubes 28-30 qui correspondaient au pic principal ont été collectés et lyophilisés. Nous avons obtenu 120 mg de peptide pur ainsi que l'analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale le confirme.

poids gel	dimensions	éluant	$\lambda$	débit	rendement	fractions	
300mg	P2	2,5x80cm	AcOH 5%	222nm	11ml/h	23% 40%	21-27 28-30

Nous avons poursuivi la purification de la fraction 21-27 par échange ionique (fig. 4.7) sur carboxyméthylcellulose CM 52 (Whatman) et celle de la fraction 28-30 par chromatographie de partition en phase inverse (fig. 4.8) sur une colonne de silice greffée par une phase apolaire en C18 (Partisil, ODS M9, Whatman).

poids gel	dimensions	éluant	débit	$\lambda$	rendement	pureté	fractions
60mg	CM 52	1,5x13cm CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 0,01M à 0,05M pH=4,3	18,4ml/h	218nm	33%	84%	1-8
70mg	ODS M9	2,5x20cm TFA 1/1000 0,5 à 12,5%	34ml/h	223nm	33%	83%	8-17

Cette dernière technique de purification sur ODS M9 est une méthode de purification beaucoup plus rapide que les chromatographies de gel-filtration ou d'échange ionique.

CCM dans :

pyridine/acide acétique/eau (1/1/1) : Rf=0,6  
butanol/acide acétique/eau(16/6/3) : Rf=0,22

#### 2.1.5. Peptide 232-247

La synthèse du peptide 232-247 a été effectuée semi-automatiquement. Nous avons utilisé 2,3g de résine fonctionnalisée une Boc-proline (0,49 mEq./g). La chaîne peptidique s'est allongée selon le protocole Boc/TFA suivant:

AA	protection des chaînes latérales	méthodes de couplage	couplages		acétylation
16	Pro				
15	Ile	O-Bzl	DCC/HOBt	600'	30'
14	Glu	O-Bzl	DCC/HOBt	90'	
13	Pro		DCC/HOBt	600'	
12	Ser	O-Bzl	DCC/HOBt	120'	30'
11	Ser	O-Bzl	DCC/HOBt	600'	
10	Glu	O-Bzl	DCC/HOBt	105'	
9	Ser	O-Bzl	DCC/HOBt	600'	
8	Val		DCC/HOBt	120'	
7	Phe		DCC/HOBt	120'	
6	Asn		DCC/HOBt*	30'	30' 30'
5	Leu		DCC/HOBt	120'	

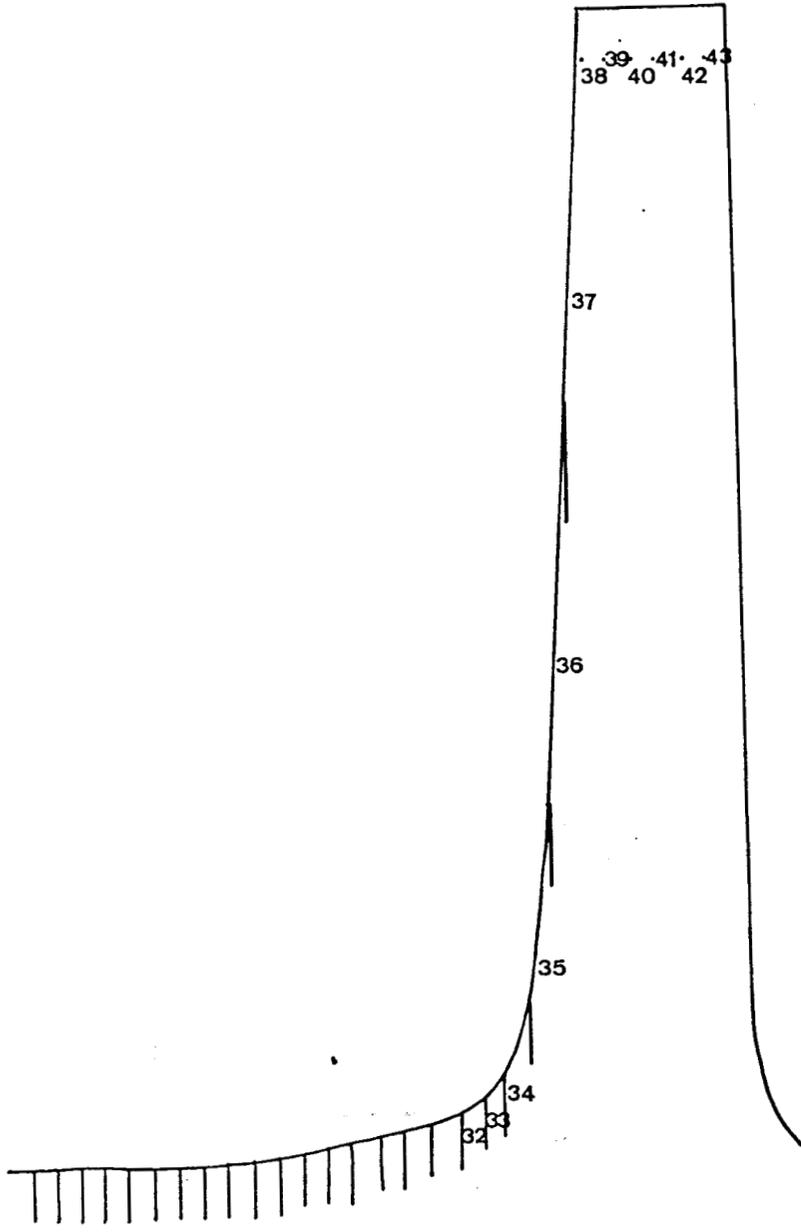


Figure 4.9: gel-filtration sur Biogel P4 du peptide 232-247

4 Pro	DCC/HOBt	120'	120'	120'	
3 Ala	DCC/HOBt	120'	600'		+
2 Leu	DCC/HOBt	120'	920'	60'	
1 Pro	DCC/HOBt	920'	120'	60'	920'

DCC/HOBt\* : préincubation 10' à 0°C

En fin de synthèse, nous avons obtenu 3,5 g de peptidyl-résine (rendement=50%). Après la coupure "high HF" sur 2 g de peptidyl-résine, en présence de para-crésol, nous avons récupéré 456 mg dans l'acide acétique 5% et 51 mg dans l'acide acétique 50%.

Une purification par gel-filtration (Biogel P4 fine) du peptide brut a suffi pour obtenir une pureté supérieure à 80% (fig. 4.9).

poids	gel	dimensions	éluant	$\lambda$	débit	rendement	fractions	pureté
200mg	P4	2,5x100cm	AcOH 5%	232nm	17ml/h	47%	36-41	84%

CCM dans acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau(5/5/1/3) : Rf=0,89

## 2.2 peptides issus de la protéine du circumsporozoïte

### 2.2.1. Préparation de (NANP)<sub>8</sub> et ses sous-fragments par synthèse récurrente totale en phase solide

Nous avons réalisé manuellement, selon la stratégie Boc/TFA, la synthèse de (NANP)<sub>8</sub> sur 10g de résine chlorométhylée fonctionnalisée par la Boc-proline (0,49 mEq./g). Les sous-fragments ont été obtenus par prélèvements successifs de la peptidyl-résine au cours de la synthèse.

AA	méthodes de couplage	couplages		acétylation			prélèvements
32	Pro						
31	Asn	DCC/HOBt*	30' 30'				
30	Ala	DCC/HOBt	300' 300'				
29	Asn	DCC/HOBt*	45' 30'	180'			0,4g
28	Pro	DCC/HOBt	600'				
27	Asn	DCC/HOBt*	30' 60'	600'	30'		
26	Ala	DCC/HOBt	120' 60'				
25	Asn	DCC/HOBt*	60' 60'				0,25g
24	Pro	DCC/HOBt	180'				
23	Asn	DCC/HOBt*	60' 60'				
22	Ala	DCC/HOBt	600'				
21	Asn	DCC/HOBt*	60'				0,9g
20	Pro	DCC/HOBt	600'				
19	Asn	DCC/HOBt*	600' 60'				
18	Ala	DCC/HOBt	600' 300'	60'			
17	Asn	DCC/HOBt*	60' 60'				2g
16	Pro	DCC/HOBt	120' 600'	60'			
15	Asn	DCC/HOBt*	30' 30'				
14	Ala	DCC/HOBt	240' 600'	60'			
13	Asn	DCC/HOBt*	240' 60'				0,75g
12	Pro	DCC/HOBt	120' 120'	60' 600'	360'	60'	
11	Asn	DCC/HOBt*	30' 120'	30'			
10	Ala	DCC/HOBt	600' 45'				
9	Asn	DCC/HOBt*	45'				0,45g
8	Pro	DCC/HOBt	180' 600'	120'			
7	Asn	DCC/HOBt*	30' 210'	120'	120'	30'	+
6	Ala	DCC/HOBt	120' 120'				
5	Asn	DCC/HOBt*	120'				0,2g
4	Pro	DCC/HOBt	120' 360'	120'			
3	Asn	DCC/HOBt*	90' 120'	120'			+
2	Ala	DCC/HOBt	120' 600'				+
1	Asn	DCC/HOBt*	120'				

DCC/HOBt\* : préincubation 10' à 0°C

Ensuite les peptides sont purifiés par gel-filtration:

peptide	poids	gel	dimensions	éluant	λ	débit	rendement	pureté
(NANP)	100mg	G15	2,5x35cm	AcOH 5%	234nm	10ml/h	67%	93%
(NANP) <sub>2</sub>	80mg	G15	2,5x35cm	AcOH 5%	237nm	10ml/h	46%	99%
(NANP) <sub>3</sub>	150mg	GF05	2,5x80cm	AcOH 5%	237nm	12ml/h	35%	98%
(NANP) <sub>4</sub>	380mg	P4	2,5x80cm	AcOH5%	243nm	6ml/h	47%	97%
(NANP) <sub>5</sub>	101mg	P4	1,5x80cm	AcOH5%	232nm	8ml/h	32%	89%
(NANP) <sub>6</sub>	60mg	P4	1,5x80cm	AcOH5%	242nm	10ml/h	25%	81%

(NANP) <sub>7</sub>	53mg P4	1,5x80cm	AcOH5%	235nm	5ml/h	21%	75%
(NANP) <sub>8</sub>	76mg P6	1,5x100cm	AcOH5%	242nm	4ml/h	40%	95%

## Contrôles par CCM

peptide	solvant 1	solvant 2	solvant3
(NANP)	Rf=0,22		
(NANP) <sub>2</sub>	Rf=0,15	Rf=0,64	Rf=0,48
(NANP) <sub>3</sub>	Rf=0,3		
(NANP) <sub>4</sub>	Rf= 0,5	Rf=0,2	
(NANP) <sub>5</sub>		Rf=0,46	
(NANP) <sub>6</sub>	Rf=0,35	Rf=0,6	
(NANP) <sub>7</sub>	Rf=0,12	Rf=0,91	
(NANP) <sub>8</sub>	Rf=0,25	Rf=0,75	

solvant 1 : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau ( 5/5/1/3)

solvant 2 : chloroforme/méthanol/ammoniaque (5/5/1)

solvant 3 : butanol/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (1/1/1/1)

2.2.2 Synthèse de NANP en phase homogène

**I, Z-Asn (Mbh)** : Z-Asn (20g; 75,11mmoles) a été dissous dans 220 ml d'AcOH glacial au bain-marie. Le 4,4'-diméthoxybenzhydrol (18,35g, 5,11mmoles) a été ajouté ainsi que 0,37 ml d'acide sulfurique concentré (König,1970). Après avoir laissé sous agitation une nuit, nous avons versé le milieu réactionnel dans 550 ml d'eau, une suspension blanche se forme. Après filtration et séchage sous vide sur anhydride phosphorique, le produit est dissous dans l'acétate d'éthyle au bain-marie (40°C). Ensuite, la phase organique est lavée par l'eau dans une ampoule à décanter, puis évaporée sous vide. Le résidu blanc, collé sur les parois du ballon, est trituré dans l'éther éthylique et recristallisé dans le tétrahydrofurane. Nous avons obtenu 23,56g (rendement=63,7%) de produit pur

litt:  $F^{\circ}=176-180^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]=2,43^{\circ}$ ;  $c=2$ , DMF

obs:  $F^{\circ}=171-172^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]=2,39^{\circ}$ ;  $c=2$ , DMF;

CCM dans butanol/acide acétique/eau (3/1/1):  $R_f = 0,87$

butanol/pyridine/acide acétique/eau (30/10/3/12):  $R_f = 0,75$

**II, H-Asn(Mbh): I** (23g; 46,7mmoles) est mis en suspension dans 270 ml d'acide acétique et 50 ml d'eau. Puis on fait passer un courant d'hydrogène pendant 3h. en présence de Pd/C 5%. Après élimination du catalyseur par filtration, la solution est évaporée sous trompe à eau puis sous vide poussé. Le résidu huileux est trituré dans l'acétate de sodium 0,5M. Après recristallisation dans l'éther éthylique, des cristaux blancs sont obtenus (16,23g, 97%) et caractérisés

litt:  $F^{\circ}=215-217^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]=9,75^{\circ}$ ;  $c=2$ , AcOH

obs:  $F^{\circ}=219-220^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]=8,86^{\circ}$ ;  $c=2$ , AcOH

CCM dans butanol/acide acétique/eau (3/1/1):  $R_f = 0,58$

butanol/pyridine/acide acétique/eau (30/10/3/12):  $R_f = 0,54$

**III, Nps-Asn(Mbh), CHA: II** (10g; 27,9mmoles) est dissous dans 38 ml de dioxane et 15 ml de soude 2N. Nps-Cl (5,27g, 27,9mmoles) est ajouté par petites portions en maintenant le pH égal à 8 (König, 1970). Après agitation 1h, sont ajoutées 300 ml d'eau ainsi que l'acide citrique QS pH=3. Des précipités jaunes apparaissent qui sont repris dans l'acétate d'éthyle (3x150ml). Les phases organiques réunies sont lavées par l'eau, séchées sur le sulfate de magnésium. La cyclohexylamine (CHA, 27,9mmoles) est alors ajoutée jusqu'à l'obtention de précipités jaunes qui sont

filtrés et lavés par l'acétate d'éthyle. Nous avons obtenu 10,73g (rendement=62%) de produit pur

litt:  $F^{\circ}=182-184^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]= -29,8^{\circ}$ ;  $c=1$ , DMF

obs:  $F^{\circ}=182-184^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]= -27,6^{\circ}$ ;  $c=1$ , DMF

CCM dans: acétate d'éthyle/méthanol (2/1):  $R_f = 0,28$

butanol/méthanol(30/10/3/12):  $R_f = 0,45$

#### IV Nps-Asn (Mbh) -Pro-OBzl

III (10g; 16,11 mmoles) est traité dans l'acétate d'éthyle par une solution de  $\text{KHSO}_4$  5% pour obtenir l'acide libre correspondant (Spangenberg, 1971). Les phases organiques, lavées par l'eau sont séchées sur le sulfate de magnésium, évaporées sous vide, et séchées sous vide sur anhydride phosphorique.

IV(a) par la méthode des anhydrides mixtes: Nps-Asn (Mbh) -OH (6,2g; 11,88 mmoles) est dissous dans 60 ml de DMF Gold Label, neutralisé par la N-méthyl-morpholine (1,3ml; 11,7 mmoles) et refroidi à  $-15^{\circ}\text{C}$ . Le chloroformiate d'isobutyle (1,5 ml; 11,5 mmoles) est ajouté à la solution. Après agitation à  $-15^{\circ}\text{C}$  pendant 15', une solution de Pro-OBzl (2,87g, 11,88 mmoles) préalablement dissoute dans 23 ml de DMF Gold Label, neutralisée par la N-méthyl-morpholine (1,3 ml; 11,6 mmoles) et refroidie à  $-10^{\circ}\text{C}$  est ajoutée à la solution d'anhydride mixte. On a laissé sous agitation 30' à  $-10^{\circ}\text{C}$ , puis une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu est lavé 3 fois avec  $\text{NaHCO}_3$  M, trois fois à l'eau, trois fois avec  $\text{KHSO}_4$  M, et trois fois à l'eau. Après trituration dans l'éther de pétrole, le produit brut est séché, puis purifié par chromatographie sur colonne de silice 60 (0,2-0,5mm ; 35-70 mesh Merck) dans un mélange de solvants benzène/acétonitrile/eau (100/300/4). On obtient une pâte (3,61g, rendement=43,5%)

$[\alpha]= -14^{\circ}$ ;  $c=1$ , acétonitrile

CCM dans benzène/acétonitrile/eau (400/100/1): Rf = 0,44  
 acétate d'éthyle/méthanol (2/1): Rf = 0,58

**IV(b) par la méthode des esters N-hydroxysuccinimidiques**

Nps-Asn(Mbh)-OSu est préparé à partir de Nps-Asn(Mbh)-OH (2g; 3,8 mmoles) et HOSu (437mg; 3,8mmoles) qui sont dissous dans 30 ml de DMF Gold Label et refroidi à 4°C. La DCC (782mg; 3,8mmoles) est ajoutée. Après agitation une nuit à 4°C, la DCU est filtrée et le solvant est évaporé sous vide. La DCU résiduelle est éliminée par triturations successives dans l'acétonitrile. Le produit pur est obtenu par recristallisation dans l'isopropanol chaud (1,57g; rendement=65%)

Ensuite Pro-OBzl (605mg; 2,5mmoles) est dissous dans 20 ml de DMF Gold Label et neutralisé par la N-méthyl-morpholine (0,358ml; 3,25mmoles). La solution de Pro-OBzl est ajoutée au Nps-Asn(Mbh)-Osu. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Les opérations suivantes sont effectuées selon le protocole IV(a). 822mg (rendement=47%) de produit pur est obtenu

$[\alpha] = -13,3^\circ$ ; c=1, acétonitrile

CCM dans: butanol/ammoniaque (85/15): Rf = 0,87  
 acétate d'éthyle (2/1): Rf = 0,52

**V HBr, H-Asn(Mbh)Pro-OBzl: IV (a)** (3,61g; 5,15mmoles) est dissous dans 35 ml de DMF Gold Label. L'indole (464mg; 3,97mmoles) est d'abord ajouté, puis le bromhydrate de pyridine (636mg; 3,97mmoles) (Sakarellos, 1976). Après agitation pendant 90', le DMF est évaporé sous vide poussé. Le résidu est trituré

dans l'éther isopropylique, une pâte jaune est obtenue (2,48mg; rendement=77%)

CCM dans: butanol/ammoniaque (85/15): Rf = 0,31  
acétate d'éthyle/méthanol (5/1): Rf = 0,11

#### **VI Nps-Ala-Asn(Mbh)-Pro-OBzl**

**VI(a)** par la méthode des anhydrides mixtes: Nps-Ala-OH (668mg; 2,76mmoles), obtenue à partir de Nps-Ala-OH, DCHA (Zervas, 1963) par la méthode de Spangenberg (1971), est dissous dans 12 ml de DMF Gold Label, neutralisé par la (0,3ml; 2,76mmoles) et refroidi à -15°C. L'anhydride mixte au chloroformiate d'isobutyle, préparé dans le DMF Gold Label, est couplé avec **V** (1,73g; 2,76mmoles) en présence de N-méthyl-morpholine. le produit est obtenu en opérant comme il est décrit pour la préparation de **IV(a)**. Nous avons trituré dans l'éther isopropylique (871mg, rendement=41%, F°=156-160,5°C)

[ $\alpha$ ]=-48,8°; c=1, acétonitrile

CCM dans: butanol/ammoniaque (85/15): Rf = 0,51  
acétate d'éthyle/méthanol (5/1): Rf = 0,63  
benzène/acétonitrile/eau (100/100/1): Rf = 0,65

#### **VI(b) par la méthode des esters N-hydroxysuccinimidiques:**

Nps-Ala-Osu (44mg; 0,13mmoles) est couplé avec **V** (75mg; 0,12mmoles) dans le DMF comme il est décrit dans **IV(b)** en présence de N-méthyl-morpholine. Après trituration dans l'eau, nous avons obtenu un produit jaune (92mg, rendement=84,1%, F°=156,5-160°C, [ $\alpha$ ]=-47,9°; c=1, acétonitrile).

CCM dans: butanol/ammoniaque (85/125): Rf = 0,59

acétate d'éthyle/méthanol (5/1): Rf = 0,66

benzène/acétonitrile/eau (100/100/1): Rf = 0,59

**VII HBr, H-Ala-Asn (Mbh) -Pro-Obzl:** à partir de **VI** (725mg; 0,94mmoles), on procède comme pour **V** (rendement=111%)

CCM dans: benzène/acétonitrile/eau (100/100/1): Rf = 0,65

butanol/ammoniaque (85/15): Rf = 0,6

**VIII Boc-Asn (Mbh): II** (6g; 16,74mmoles) est dissous au bain-marie dans 50 ml de dioxane, 17ml de NaOH N et 17ml d'eau. On refroidit à 0°C et on ajoute le pyrocarbonate de tertio-butyle (3,7g; 16,96mmoles) (Moroder, 1976). Le pH est maintenu à 8-9. Après 3 heures de réaction, nous avons dilué le milieu réactionnel dans l'eau et ajouté KHSO<sub>4</sub> 5% QS pH=2-3. Le produit a été extrait par l'acétate d'éthyle. Les phases organiques ont été lavées par l'eau, puis évaporées sous vide et séchées. Recristallisation dans tétrahydrofurane/éther de pétrole (obt:4,6g, rendement=60%)

F°=144-147°C, [α]=3,92°; c=2, DMF

CCM dans: butanol/acide acétique/eau (3/1/1): Rf = 0,89

butanol/pyridine/acide acétique/eau(30/10/3/12): Rf = 0,70

**IX Boc-Asn (Mbh) -Ala-Asn (Mbh) -Pro-OBzl**

**par la méthode des anhydrides mixtes:** à partir de **VII** (190mg; 0,27mmoles) et **VIII** (150mg; 0,33mmoles), on procède selon le protocole de IV(a), précipitation dans méthanol/éther éthylique (rendement=20%)

F°=156-158°C,  $[\alpha] = -35,6^\circ$ ; c=1, acétonitrile

CCM dans: butanol/ammoniaque (85/15): Rf = 0,78

acétate d'éthyle/méthanol (5/1): Rf = 0,83

**X TFA, Asn-Ala-Asn-Pro-OBzl: IX** (348mg; 0,33mmoles) est dissous dans 24 ml de TFA/anisole (10/1), puis laissé sous agitation à température ambiante pendant 3h. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu est repris par l'eau. La phase aqueuse a été abondamment lavée à l'acétate d'éthyle et l'éther éthylique avant d'être lyophilisée. Le tétrapeptide a été purifié par gel-filtration sur Séphadex G10.

CCM dans: butanol/acide acétique/eau (3/1/1): Rf = 0,13

butanol/pyridine/acide acétique/eau (30/10/3/12): Rf = 0,29

analyse d'acides aminés théorique: Asp:2 Ala:1 Pro:1  
observée: Asp:2,29 Ala:0,93 Pro:0,85

Au cours de l'hydrolyse, les chaînes latérales carboxamides de Asn et Gln sont converties en fonction carboxyliques correspondant respectivement à Asp et Glu,

### 2.2.3 Synthèse de Fmoc-NANP

4,5ml d'une solution de NANP (1,08g; 2,29mmoles) dans Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> M est ajoutée goutte à goutte au chloroformiate de 9-fluorénylméthylloxycarbonyle, Fmoc-Cl (1,18g; 4,58 mmoles), dissous dans 3 ml de dioxane. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation une heure à 0°C et 10 heures à température ambiante. Nous l'avons dilué dans 70 ml d'eau glacée et lavé par

l'éther éthylique. L'acide chlorhydrique concentré est ajouté QS pH=2; se forment un précipité blanc qui est extrait par le butanol.

recristallisation dans l'hexane: obtenu 1,04g (rendement=72%)

[a]<sub>D</sub> = -40,6° (c=2,06; DMF).

CCM dans chloroforme/méthanol/ammoniaque (5/5/1)	Rf = 0,62
butanol/pyridine/acide acétique/eau (1/1/1/1)	Rf = 0,88
acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (8/5/1/3)	Rf = 0,55

## 2.3 Peptides issus de la protéine du stade hépatique LSA

### 2.3.1 Peptide LSA (-7)-34NH<sub>2</sub> et ses sous-fragment

Le peptide (-7)-34 NH<sub>2</sub> a été synthétisé sur le Beckman 990b , sur 4g de résine benzhydrylamine chargée à 0,81 mEq./g, selon le protocole Boc/TFA. Les sous-fragments 1-34 NH<sub>2</sub>, 17-34E N-term et G N-termNH<sub>2</sub>, 23-34 NH<sub>2</sub> ainsi que 27-34 NH<sub>2</sub> ont été prélevés au cours de la synthèse.

AA	protection des chaînes latérales	méthodes de couplage	couplages		acét. prélèv.
34	Gln	DCC/HOBT*	15'	30'	+
33	Leu	anh. sym.	30'	30'	+
32	Lys	Cl-Z	DCC/HOBT	620'	+
31	Glu	O-Bzl	DCC/HOBT	120'	+
30	Lys	Cl-Z	DCC/HOBT	620'	+
29	Ala		DCC/HOBT	120'	+
28	Leu		DCC/HOBT	240' 60'	+
27	Arg	tos	DCC/HOBT	240' 60' 120' 120' 620' 120'	+
26	Glu	O-Bzl	DCC/HOBT	120' 120' 620' 120'	+
25	Gln		DCC/HOBT*	45' 45'	+
24	Glu	O-Bzl	anh. sym.	30' 45'	+
23	Leu		DCC/HOBT	620' 620' 120' 120'	+
22	Asp	O-Bzl	DCC/HOBT	120' 120' 620'	+
21	Ser	O-Bzl	DCC/HOBT	120'	+

0,67g

0,33g

20	Gln		DCC/HOBt*	30'	30'			+	
19	Gln		DCC/HOBt*	30'	30'	15'	30'	+	0,5g
18	Glu	O-Bzl	anh. sym.	30'	30'	30'			
18'	Gly		DCC/HOBt	15'	15'	20'	15'	15'	±
17	Gln		DCC/HOBt*	30'	60'	30'		+	
16	Leu		anh. sym.	60'				+	
15	Lys	Cl-Z	DCC/HOBt	620'				+	
14	Glu	O-Bzl	DCC/HOBt	120'				+	
13	Lys	Cl-Z	DCC/HOBt	620'				+	
12	Ala		DCC/HOBt	120'				+	
11	Leu		DCC/HOBt	620'				+	
10	Arg	tos	DCC/HOBt	120'	620'			+	
9	Glu	O-Bzl	DCC/HOBt	120'				+	
8	Gln		DCC/HOBt*	60'	60'			+	
7	Glu	O-Bzl	anh. sym.	60'	60'			+	
6	Leu		DCC/HOBt	120'	120'			+	
5	Asp	O-Bzl	DCC/HOBt	620'	120'			+	
4	Ser	O-Bzl	DCC/HOBt	120'	120'			+	
3	Gln		DCC/HOBt*	60'	60'	60'		+	
2	Gln		DCC/HOBt*	60'	120'			+	
1	Gly		anh. sym.	30'	60'			+	0,42g
-1	Gln		DCC/HOBt	30'				+	
-2	Leu		anh. sym.	120'	120'	120'		+	
-3	Lys	Cl-Z	DCC/HOBt	120'	620'			+	
-4	Glu	O-Bzl	DCC/HOBt	620'	620'	620'		+	
-5	Lys	Cl-Z	DCC/HOBt	120'	120'			+	
-6	Ala		DCC/HOBt	120'	60'			+	
-7	Leu		DCC/HOBt	620'	120'			+	

Après coupure "high HF", les peptides ont été purifiés par gel-filtration suivie d'une HPLC semi-préparative:

peptide	poids	gel	dimensions	éluant	λ	débit	rendement	pureté
LSA 27-34	108mg	TSK HW(40)S	2,5x70cm	AcOH 5%	240nm	7,2ml/h	47%	98%
LSA 23-34	105mg	GF 05	2,5x80cm	AcOH 5%	236nm	10,5ml/h	70%	97%
	47mg	C18	2,6x40cm	TFA1/1000 CH <sub>3</sub> CN	220nm	3ml/mn	22%	97%
LSA 18-34	65mg	TSK HW(40)S	2,5x70cm	AcOH 5%	238nm	9,6ml/h	76%	57%
G N-term	30mg	C18	2,6x40cm	TFA1/1000 CH <sub>3</sub> CN	220nm	3ml/mn	20%	98%
LSA 18-34	208mg	GF 05	2,5x80cm	AcOH 5%	236nm	12ml/h	28%	69%
E N-term	45mg	C18	2,6x40cm	TFA1/1000 CH <sub>3</sub> CN	215nm	3ml/mn	11%	94%
LSA 1-34	70mg	TSK HW(40)S	2,5x100cm	AcOH 5%	240nm	15ml/h		
LSA(-7)-34	80mg	TSK HW(40)S	2,5x100cm	AcOH 5%	238nm	14,2ml/h		

2.3.2. Synthèse de LSA 13-29 OH et LSA 23-29 OH

Les peptides ont été synthétisés semi-automatiquement sur une Boc-OCH<sub>2</sub>-pam-Ala-résine (1,2 mEq./g) selon le protocole classique Boc/TFA:

AA	protection des chaînes latérales	méthodes de couplage	couplages			acét. prélèv.
17	Ala	DCC/HOBt				
16	Leu	DCC/HOBt	60'	120'	120'	
15	Arg	tos	120'			
14	Glu	O-Bzl	90'	120'	120'	
13	Gln	DCC/HOBt*	30'	60'		
12	Glu	O-Bzl	120'	120'		+
11	Leu	DCC/HOBt	120'			+
10	Asp	O-Bzl	120'	90'		+
9	Ser	O-Bzl	120'	60'		
8	Gln	DCC/HOBt*	30'	30'		+
7	Gln	DCC/HOBt	30'	45'	60'	+
6	Glu	O-Bzl	60'	120'	120'	+
5	Gln	DCC/HOBt*	45'	60'		+
4	Leu	DCC/HOBt	120'	120'		+
3	Lys	Cl-Z	120'	120'		+
2	Glu	O-Bzl	120'	120'		+
1	Lys	Z	120'	120'		+

0,8g

Après coupure "high HF", les peptides ont été purifiés par gel-filtration, suivie d'une HPLC semi-préparative:

peptide	poids pureté	gel	dimensions	éluant	débit	rendement
LSA13-29OH	250mg	TSKHW(40)S	2,5x100cm	AcOH 5%	236 nm 12ml/h	16% 96%
LSA23-29OH	70mg	P2	1,5x70cm	AcOH 5%	226nm 6ml/h	37% 33%
	50mg	C18	2,6x40cm	TFA1/1000 CH <sub>3</sub> CN	220nm 3ml/mn	10% 97%

### 2.3.3. Peptides LSA 13-29NH<sub>2</sub> et LSA 23-29NH<sub>2</sub>

Les peptides, ancrés sur une résine benzhydrylamine (0,5 mmoles), ont été élaborés sur le synthétiseur automatique, Applied Biosystem 430, selon la stratégie Boc/TFA. A la fin de la synthèse, les peptides ont été libérés et déprotégés par "high HF", puis purifiés par gel-filtration et HPLC semi-automatique:

peptide pureté	poids	gel	dimensions	éluant		débit	rendement	
LSA13-29NH <sub>2</sub>	145mg	TSK HW(40)S	2,5x100cm	AcOH 5%	225nm	8ml/h	14%	98%
							42%	80%
LSA18-29NH <sub>2</sub>	250mg	P2	2,5x100cm	AcOH 5%	230nm	9ml/h	46%	75%
	30mg	C18	2,6x40cm	TFA1/1000 CH <sub>3</sub> CN	220nm	1ml/mn	27%	99%

### 2.3.4. élaboration des peptides hybrides

Le peptide 1-62 a été formé sur le synthétiseur automatique Applied Biosystem 430. La synthèse a démarré sur une Boc-Leu-OCH<sub>2</sub>-Pam-résine (0,5mmoles). Le peptide 18-62 a été obtenu par prélèvement de la peptidyl-résine au cours de la synthèse.

Après coupure "high HF", les peptides ont été purifiés par gel-filtration, suivi d'une chromatographie d'échange ionique:

peptide rendement	poids	gel	dimensions	éluant	$\lambda$	débit	
1-62	82mg	TSK HW(40)S	1,5x40cm	HCl1/1000	235nm	13,5ml/h	23%
	10mg	DEAE	1,5x12cm	Tampon PO4 0,01m, NaCl	240nm	12ml/h	44,4%
18-62	79mg	TSK HW(40)S	1,5x40cm	AcOH 5%	242nm	11ml/h	34%

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- S. ALEY, M. BATES, J. TAM, M. HOLLINGDALE  
 Synthetic peptides from the circumsporozoite proteins of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi* recognize the human hepatoma cell line Hep 62-A16 *in vitro*  
 J. Exp. Med, (1986), 164, 1915-1922
- A. ALLISON  
 Vaccine technology: adjuvants for increased efficacy  
 Biotechnology, (1987), 5, 1041-1045
- G. ANDERSON, J. ZIMMERMAN, F. CALLAHAN  
 The use of esters of N-Hydroxysuccinimide in peptide synthesis  
 J. Am. Chem. Soc, (1964), 86, 1839-1842.
- G. ANDERSON, J. ZIMMERMAN, F. CALLAHAN  
 A reinvestigation of the mixed carbonic anhydride method of peptide synthesis  
 J. Am. Chem. Soc, (1967), 89, 5012-501
- ARNON, MARON, SELA, ANFINSEN  
 Antibodies reactive with nature lysosyme elicited by a completely synthetic antigen  
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1971), 68, 7, 1450-1455
- F. AUDIBERT, G. PRZEWLOCKI, C. LECLERC, M. JOLIVET, H. GRAS-MASSE, A. TARTAR, L. CHEDID  
 Enhancement by Murabutide of the immune response to natural and synthetic HBs Antigens  
 Infect. Immunity, (1984), 45, 261-266
- F. AUDIBERT, M. JOLIVET, H. GRAS-MASSE, A. TARTAR, L. CHEDID  
 Construction of antimicrobial polyvalent synthetic vaccines active in saline  
 Moderne Approaches to Vaccine, Cold Spring Harbor, (1985)
- F. AUDIBERT, M. JOLIVET, L. CHEDID, J.E. ALOUF, P. BOQUET, P. RIVAILLE, O. SIFFERT  
 Active antitoxic immunization by a diphtheria toxin synthetic oligopeptide  
 Nature, (1981), 289, 593-594
- F. AUDIBERT, L. CHEDID, P. LEFRANCIER, J. CHOAY  
 Distinctive adjuvantivity of synthetic analogs of mycobacterial water-soluble components  
 Cell. Immunol, (1976), 21, 243-249
- W. BALLOU, J. ROTHBARD, R. WIRTZ, D. GORDON, J. WILLIAMS, R. GORE, I. SCHNEIDER, M. HOLLINGDALE, R. BEAUDOIN, W. MALOY, L. MILLER, W. HOCKMEYER  
 Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*  
 Science, (1985), 228, 996-999

- W. BALLOU, J. SHERWOODS, F. NEVA, D. GORDON, R. WIRTZ, G. WASSERMAN, C. DIGGS, S. HOFFMAN, M. HOLLINGDALE, W. HOCKMEYER, I. SCHNEIDER, J. YOUNG, P. REEVE, J. CHULAY  
Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine  
The Lancet, (1987), 1, 1277-1281
- D. BELLET, J. M. BIDART, M. JOLIVET, A. TARTAR, J. CAILLAUD, M. OZTURIC, M. STRUGO, F. AUDIBERT, H. GRAS-MASSE, M. ASSICOT, C. BOHUON  
A monoclonal antibody against a synthetic peptide is specific for the free native human chorionic gonadotropin b-subunit  
Endocrinology, (1984), 115, 330-335
- J. BITTLE, R. HOUGHTEN, H. ALEXANDER, T. SHINNICK, J. SUTCLIFFE, R. LERNER, D. KOWLANDS, F. BROWN  
Protection against foot and mouth disease by immunisation with a chemically synthesised peptide predicted from the nucleotide sequence  
Nature, (1982), 298, 30-33
- M. BODANSKI  
Practice of peptide synthesis  
Springer-Verlag, (1984), p 20
- B. BROOKS, R. PASTOR, F. CARSON  
Theoretically determined three-dimensional structure for the repeating tetrapeptide unit of the circumsporozoite coat protein of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*  
Proc. Natl. Acad. Sci USA, (1987), 84, 4470-4474
- C. CARELLI, F. AUDIBERT, J. GAILLARD, L. CHEDID  
Immunological castration of male mice by a totally synthetic vaccine administered in saline  
Proc. Natl. Acad. Sci, USA, (1982), 79, 5392-539
- B. CASTRO, J.R. DORMOY, G. EVIN, C. SELVE  
BOP, hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium  
Tetrahedron Letters, (1975), 14, 1219-1222
- L. CHEDID, F. AUDIBERT, G. PRZEWLOCKI, E. BEACHEY, H. GRAS-MASSE, A. TARTAR  
Antibody responses elicited by a polyvalent vaccine containing synthetic diphtheric, streptococcal and hepatitis peptides coupled to the same carrier  
Biochem. Biophys. Res. Comm, (1983), 117, 908-915
- L. CHEDID, M. PARANT, F. PARANT, F. AUDIBERT, P. LEFRANCIER, J. CHOAY, M. SELA  
Enhancement of certain biological activities of muramyl dipeptide derivatives after conjugation to a multi-poly-(DL-alanyl)-poly-(L-lysine) carrier  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1979), 76, 6557-6561

- L. CHEDID, F. AUDIBERT, P. LEFRANCIER, J. CHOAY, E. LEDERER  
Modulation of the immune response by a synthetic adjuvant and analogs  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1976), 73, 2472-2475
- C. CHEUNG, A. SHAW, J. LEBAN, L. PERRIN  
Cloning and expression in *Escherichia coli* of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites  
EMBO, (1985), 4, 1007-1012
- C. CHEUNG, M. WAKI, M. AHMAD, J. MEIENHOFER, E. LUNDELL, J. HAUG  
a- Preparation and properties of N<sup>a</sup>-9-fluorenyl methyloxycarbonylamino acids bearing tert-butyl side chain protection  
Int. J. Peptide Protein Res, (1980), 15, 59-66
- C. CHEUNG, A. FELIX, J. JIMENEZ, J. MEIENHOFER  
b- Solid-phase peptide synthesis of somatostatin using mild base cleavage of b- N<sup>a</sup>-9-fluorenyl methyloxycarbonylamino acids  
Int. J. Peptide Protein Res, (1980), 15, 485-494
- C. CHOTHIA  
The nature of the accessible and buried surfaces in proteins  
J. Mol. Biol., (1976), 105, 1-14
- Y. CHOU, G. FASMAN  
Conformational parameters for amino acids in helical,  $\beta$ -sheet and random coil regions calculated from proteins  
Biochemistry, (1974), 13, 211-221
- M. CHOW, R. YABROV, J. BITTLE, J. HOGLE, D. BALTIMORE  
Synthetic peptides from four separate regions of the poliovirus type 1 capsid protein VP1 induce neutralizing antibodies  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985), 82, 910-914
- T. CHRISTENSEN  
A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase synthesis using chloranil  
Acta Chemica Scandinavia, (1979), B 33, 763-766
- A. COCHRANE, F. SANTORO, V. NUSSENZWEIG, R. GWADZ, R. NUSSENZWEIG  
Monoclonal antibodies identify the protective antigens of sporozoites  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1982), 79, 5651-5655
- R. COPPEL, A. COWMAN, K. LINGELBACH, G. BROWN, R. SAINT, D. KEMP, R. ANDERS  
Isolate-specific S-antigen of *Plasmodium falciparum* contains a repeated sequence of eleven amino acid  
Nature, (1983), 306, 751-756

T. CREIGHTON

Stability of  $\alpha$ -helices  
Nature, (1987), 326, 547-548

V. de la Cruz, A. Lal, T. McCutchan

Sequence variation in putative functional domains of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*  
J. Biol. Chem. (1987), 262, 11935-11939

J. DAME, J. WILLIAMS, T. Mc CUTCHAN, J. WEBER, R. WIRTZ,  
W. HOCKMEYER, W. MALOY, J. HAYNES, I. SCHNEIDER, D. ROBERTS,  
G. SANDERS, E. REDDY, C. DIGGS, L. MILLER

Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*  
Science, (1984), 225, 593-599

G. DELGIUDICE, J. COPPER, J. MERINO, A. VERDINI, A. PESS, A. TOGNA, H. ENGERS, G. CORRADIN, P. LAMBERT

The antibody response in mice to carrier-free synthetic polymers of *Plasmodium falciparum* circumsporozoites repetitive epitope is I-A<sup>b</sup> restricted: possible implication for Malaria vaccine  
J. Immunol, (1986), 137, 2952-1955

C. DELISI, J. BERZOFSKY

T-cell antigenic sites tend to be amphiphatic structures  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985), 82, 7048-7052

R. DERNICK, J. HEVKESHOVEN, M. HILBRIG

Induction of neutralizing antibodies by all three structural poliovirus polypeptides  
Virol, (1985), 130, 243-246

R. DIMARCHI, J. TAM, S. KENT, R. MERRIFIELD

Weak acid catalyzed pyrrolidone carboxylic acid formation from glutamine during solid phase peptide synthesis  
Int. J. Peptide Protein Res, (1982), 19, 88-93

H. DROBECQ, J. M. BERNARD, C. CARELLI, H. GRAS-MASSE,  
A. TARTAR, P. LEFRANCIER

Improved synthesis of the conjugate between LH-RH and MDP : a totally synthetic vaccine  
Proceedings of the 18th European Peptide Symposium, (1985), 443-446

D. EICHINBER, D. ARNOT, J. TAM, V. NUSSENZWEIG, V. ENEA

Circumsporozoite protein of *P. berghei* gene cloning and identification of the immunodominant epitopes  
Mol. Cell. Biol, (1986), 6, 965-968

D. EISENBERG, R. WEISS, T. TERWILLIGER

The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1984), 81, 140-144

- D. EISENBERG, R. WEISS, T. TERWILLIGER  
The helical hydrophobic moment : a measure of the amphiphilicity of a helix  
Nature, (1982), 299, 371-374
- F. ELLOUZ, A. ADAM, R. CIOBARU, E. LEDERER  
Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives  
Biochem. Biophys-Res-Comm., (1974), 59, 1317-1325
- E. EMINI, B. JAMESON, E. WIMMER  
Identification of a new neutralization antigenic site on poliovirus coat protein VP2  
Journal of Virol., (1984), 52, 2, 719-721
- E. EMINI, E. WIMMER, B. JAMESON, J. BONIN, D. DIAMOND  
Neutralization antigenic sites of poliovirus and peptide induction of neutralizing antibodies synthetic antigen  
Ann. Sclavo, (1984), 2, 139-146
- E. EMINI, B. JAMESON, E. WIMMER  
Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides  
Nature, (1983), 304, 699-703
- V. ENEA, J. ELLIS, F. ZAVALA, D. ARNOT, A. ASAVANICH, A. MASUDA, I. QUAKYI, R. S. NUSSENZWEIG  
DNA cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene: amino-acid sequence of the repetitive epitope  
Science, (1984), 225, 628-630
- V. ENEA, D. ARNOT, E. SCHMIDT, A. COCHRANE, R. GWADZ, R. NUSSENZWEIG  
Circumsporozoite gene of *Plasmodium cynomologi* (Gombach): cDNA cloning and expression of the repetitive circumsporozoite epitope  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1984), 81, 7520-7524
- E. ENGVALL, P. PERLMANN  
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Essay, ELISA  
III. Quantification of specific antibodies by Enzyme-Labeled-Anti-Immunoglobulin in Antigen Coated tubes  
J. of Immunol, (1972), 109, 129-135
- B. ERICKSON, R. MERRIFIELD  
Acid stability of several benzylic protecting groups used in solid phase peptide synthesis. Rearrangement of O-Benzyl Tyrosine to 3-Benzyl Tyrosine  
J. Am. Chem. Soc., (1973), 95, 3750-3756
- B. ERICKSON, R. MERRIFIELD  
Use of Chlorinated Benzyloxycarbonyl protected groups to eliminate N branching at Lysine during Solid-Phase Peptide Synthesis  
J. Am. Chem. Soc., (1973), 95, 3757-3763

- D. EVANS, P. MINOR, G. SCHILD, J. ALMOND  
Critical role of an eight amino acid sequence of VP1 in neutralization of poliovirus type 3  
*Nature*, (1983), 304, 459-462
- J. FAVAROLO, R. COPPEL, L. CORCORAN, S. FOOTE, G. BROWN, R. ANDERS, D. KEMPS  
Structure of the RESA gene of *Plasmodium falciparum*  
*Nucl. Acids. Res.*, (1986), 14, 8265-8277
- T. FIESER, J. TAINER, H. GEYSEN, R. HOUGHTEN, R. LERNER  
Influence of protein flexibility and peptide conformation on reactivity of monoclonal anti-peptide antibodies with a protein  $\alpha$ -helix  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1987), 84, 8568-8572
- S. FRAGA  
Theoretical prediction of protein antigenic determinant from amino acid sequences  
*Can. J. Chem.*, (1982), 60, 2606-2610
- M. GALINSKI, D. ARNOT, A. COCHRANE, J. BARNWELL, R. NUSSENZWEIG, V. ENEA  
The circumsporozoite gene of the *Plasmodium cynomolgy* complex  
*Cell*, (1987), 48, 311-319
- J. GARNIER, D. J. OSGUTHORPE, B. ROBSON  
Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of the globular protein  
*J. Mol. Biol.*, (1978), 120, 97-120
- K. GIBSON, H. SHERAGA  
Predicted conformations for the immunodominant region of the circumsporozoite protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1986), 83, 5649-57
- B. F. GISIN  
The preparation of Merrifield-resins through total esterification with Cesium salts.  
*Helv. Chim. Acta.*, (1972), 56, 1476
- G. GODSON, J. ELLIS, P. SVEC, D. SCHLESWGER, V. NUSSENZWEIG  
Identification and chemical synthesis of a tandemly repeated immunogenic region of *Plasmodium knowlesi* circumsporozoite protein  
*Nature*, (1983), 305, 29-31
- M. GOOD, J. BERZOFSKY, W. MALOY, Y. HAYASHI, N. FUJII, W. HOCKMEYER, L. MILLER  
Genetic control of the immune response in mice to a *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine  
*J. Exp. Med.*, (1986), 164, 655-660

- M. GOOD, W. MALOY, M. LUNDE, H. MARGALIT, J. CORNETTE, G. SMITH,  
B. MOSS, L. MILLER, J. BERZOFSKY  
Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope  
on malaria circumsporozoite protein.  
Science, (1987), 235, 1059-1062
- D. HERRINGTON, D. CLYDE, G. LOSONSKY, M. CORTESIA, J. MURPHY,  
J. DAVIS, S. BAQAR, A. FELIX, E. HEIMER, D. GILLESSEN, E. NARDIN,  
R. NUSSENZWEIG, V. NUSSENZWEIG, M. HOLLINGDALE, M. LEVINE  
Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria  
vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoite  
Nature, (1987), 328, 257-259
- S. HOFFMAN, L. CANNON, J. BERZOFSKY, W. MAJARIAN, J. YOUNG,  
W. MALOY, W. HOCKMEYER  
*Plasmodium falciparum* : sporozoite boosting of immunity due to a  
T-cell epitope on a sporozoite vaccine  
Exp. Parasitol, (1987), 64, 64-70
- J. HOGLE  
Preliminary studies of crystals of poliovirus type 1  
J. Mol. Biol, (1982), 160, 663-668
- J. HOGLE, M. CHOW, D. FILMAN  
Three dimensional structure of Poliovirus at 2.9 Å Resolution  
Science, (1985), 229, 1358-1365
- M. HOLLINGDALE, F. ZAVALA, R. NUSSENZWEIG, V. NUSSENZWEIG  
Antibodies to the protective antigen of *Plasmodium berghei*  
sporozoites prevent entry into cultured cells  
J. of Immunol, (1982), 128, 1929-1930
- T. HOPP  
Immunogenicity of a synthetic HBs Ag peptide : enhancement by  
conjugation to a fatty acid carrier  
Mol. Immunol, (1984), 21, 13-16
- T. HOPP  
Protein antigen conformation: folding patterns and predictive  
algorithms; selection of antigenic and immunogenic peptides  
Anal. Sclavo, (1984), 2, 47-60
- T. HOPP, K. WOODS  
A computer program for predicting protein antigenic determinants  
Mol. Immunol, (1983), 20, 483-489
- T. HOPP, K. WOODS  
Prediction of protein antigenic determinants from amino acid  
sequences  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1981), 78, 3824-3828
- J. JANIN  
Surface and inside volumes in globular proteins  
Nature, (1979), 277, 491-492

- M. JOLIVET, F. AUDIBERT, E. BEACHEY, A. TARTAR, H. GRAS-MASSE,  
L. CHEDID  
Epitope specific immunity elicited by a synthetic streptococcal  
antigen without carrier or adjuvant  
Biophys. Biochem. Res. Comm., (1983), 117, 359-366
- E. KAISER, R. COLESCOTT, C. BOSSINGER, P. COOK  
Color test for detection of free terminal amino groups in the  
solid phase synthesis of peptides  
Analytical Biochemistry, (1970), 34, 595-598
- P. KARPLUS, G. SCHULZ  
Prediction of chain flexibility in proteins  
Naturwissenschaften, (1985), 72, 212-213
- R. KENNEDY, R. HENKEL, D. PAULETTI, J. ALLAN, T. LEE, M. ESSEX,  
G. DREESMAN  
Antiserum to a synthetic peptide recognizes the HTLV-III envelope  
glycoprotein  
Science, (1986), 231, 1556-1559
- N. KITAMURA, B. SEMLER, P. ROTHBERG, G. LEIRSEN, C. ADLER,  
A. DORNER, E. EMINI, R. HANECAK, J. LEE, S. Van Der WERF,  
C. ANDERSON, E. WIMMER  
Primary structure, gene organization and polypeptide expression of  
polyovirus RNA  
Nature, (1981), 291, 547-553
- H. KLOSTERMEYER, E. SCHWERTNER  
Abspaltung säurelabiler Aminoschutzgruppen durch Pyridiniumsalze.  
Z.Naturforsch. (1973), 28b, 334-338
- J. KOCHAN, H. PERKINS, J. RAVETCH  
Atandemly repeated sequence determines the binding domain for an  
erythrocyte receptor binding protein of *Plasmodium falciparum*  
Cell, (1986), 44, 689-696
- W. KONIG, R. GEIGER  
Eine neue amid-schutz gruppe  
Chem. Ber, (1970), 103, 2041-2051
- W. KONIG  
Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem. (1971), 352, 2
- S. KOTANI, Y. WATANABE, F. KINOSHITA, T. SHIMONO, I.  
MORISAKI, T. SHIBA, S. KUSUMOTO, Y. TARUMI, K. IKENABA  
Immuno-adjvant activities of synthetic N-acetyl-muramyl-peptides  
or amino acids  
Birkem J, (1975), 18, 105-111
- P. KOURILSKY, J. CLAVERIE  
The peptidic self-model: a hypothesis on the molecular nature of  
the immunological self  
Ann. Inst. Pasteur / Immunol, (1986), 137 D, 3-21

J. KYTE, R. DOOLITTLE

A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein

J. Mol. Biol., (1982), 157, 105-132

C. LECLERC, L. CHEDID

Immunomodulation of macrophages by muramyl peptides: recent findings concerning somnogenic activity of muramyl peptides and monokine

Int. J. Tiss. Reac, (1984), VI, 213-218

C. LECLERC, F. AUDIBERT, L. CHEDID

Modulation of antibody response to viruses by delivery systems and muramyl peptides

Immunochemistry of viruses

Eds M. H. V. Van Regenmortel and A. R. Neurath

Elsevier, (1985), 13-28

E. LEDERER

Synthetic immunostimulants derived from the bacterial cell wall

J. Med. Chem., (1980), 23, 8, 819-825

A. LEE, J. POWELL, G. TREGGAR, H. NIALL, V. STEVENS

A method for preparing BHCg-COOH peptide-carrier conjugates of predictable composition

Mol. Immunol, (1980), 17, 749-756

P. LEFRANCIER, E. LEDERER

Chemistry of synthetic immunomodulant muramylpeptides

Progress in the chemistry of organical natural products, W. HERZ, H. GRISEBACH, C. W. KIRBY ed., (1981), 1-47

P. LEFRANCIER, M. DERRIEN, X. JAMET, J. CHOAY, E. LEDERER,

F. AUDIBERT, M. PARANT, F. PARANT, L. CHEDID

Apyrogenic, adjuvant active N-Acetyl muramyl dipeptides

J. Med. Chem., (1982), 25, 87-93

R. LERNER

Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity

Nature, (1982), 299, 592-596

M. LEVITT, C. CHOTHIA

Structural patterns in globular proteins

Nature, (1976), 261, 552-558

M. LUO, G. VRIEND, I. MINOR, E. ARNOLD, M. ROSSMANN, M. BOEGE,

D. SCRABA, G. DUKE, A. PALMENBERG

The atomic structure of the Mengo virus a 3.0 Å resolution

Science, (1987), 235, 182-191

T. Mc CUTCHAN, A. LAL, V. DELACRUZ, L. MILLER, W. MALOY,

Y. CHAROENVN, R. BEAUDOIN, P. GUERRY, R. WISTAR, W. HOCKMEYER,

W. COLLINS, D. WIRTH

Sequence of the immunodominant epitope for the surface proteins on sporozoite of *Plasmodium falciparum*

Science, (1985), 230, 1381-1383

- D. MAZIER, S. MELLOUK, L. BEAUDOIN, B. TEXIER, P. DRUILHE, W. HOCKMEYER, J. TROSPER, C. PAUL, Y. CHAROENVN, J. YOUNG, F. MILTGEN, L. CHEDID, J. P. CHIGOT, B. GALLEY, O. BRANDICOURT, M. GENTILINI  
Effect of antibodies to the recombinant and synthetic peptides on *Plasmodium falciparum* sporozoite *in vitro*  
*Science*, (1986), 231, 156-159
- R. MERIFFIELD  
Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide  
*J. Am. Chem. Soc.*, (1963), 85, 2149
- R. MERRIFIELD, G. BARANY  
The peptides  
Vol 2  
Academic Press Inc., (1979)
- P. MINOR, G. SCHILD, J. BOOTMAN, D. EVANS, M. FERGUSON, P. REEVE, M. SPITZ, G. STANWAY, A. CANN, R. HAUPTMANN, L. CLARKE, R. MOUNTFORD, J. ALMOND  
Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization  
*Nature*, (1983), 301, 675-679
- A. MITCHELL, B. ERICKSON, M. RYABTSEV, R. HODGES, R. MERRIFIELD  
Tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis  
*J. Am. Chem. Soc.*, (1976), 98, 7357-7362
- S. MOJSOV, A. MITCHELL, R. MERRIFIELD  
A quantitative evaluation of methods for coupling Asparagine  
*J. Org. Chem.*, (1980), 45, 555-560
- L. MORODER, A. HALLETT, E. WUNSCH, O. KELLER, G. WERSIN  
Di-tert.-butyldicarbonat - ein vorteilhaftes Reagenz zur Einführung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe  
*Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* (1976), 357, 1651-1653
- E. NARDIN, R. NUSSENZWEIG, I. Mc GREGOR, J. BRYAN  
Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area hyperendemic malaria  
*Science*, (1979), 206, 597
- E. NARDIN, V. NUSSENZWEIG, R. NUSSENZWEIG, E. COLLINS, K. HARINASUTA, P. TAPCHASRI, Y. CHOCHARN  
Circumsporozoite (CS) proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*  
*J. Exp. Med.*, (1982), 156, 20
- A. NOMOTO, T. OMATA, H. TOYODA, S. KUGE, H. HORIE, Y. KATAOKA, Y. GENBA, Y. NAKANO, N. IMURA  
Complete nucleotide sequence of the attenuated polyovirus Sabin 1 strain genom  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1982), 79, 5793-5797

Y. NOZAKI, C. TANFORD

The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions

J. Biol. Chem., (1971), 246, 2211-2217

A. OUAISSI, J. P. DEFOORT, D. AFCHAIN, H. GRAS-MASSE, J. CORNETTE, H. CARON, A. TARTAR, A. CAPRON

Use of synthetic peptides in two different approaches to interfere with host cell penetration by *Trypanosoma cruzi*

Sous presse

L. S. OZAKI, P. SUEC, R. NUSSENZWEIG, V. NUSSENZWEIG, G. GODSON

Structure of the *Plasmodium knowleii* gene coding for the circumsporozoite protein

Cell, (1983), 34, 815-822

M. PATARROYO, R. AMADOR, P. CLAVUO, A. MORENO, F. GUZMAN,

P. ROMERO, R. TASCÓN, A. FRANCO, L. MURILLO, G. PONTÓN, G. TRUJILLO

A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stage of *Plasmodium falciparum* malaria

Nature, (1988), 332, 158-161

P. PIETTA, G. MARSHALL

Amide protection and amide supports in solid phase peptide synthesis

Chem. Comm., (1970), 650

P. PONNUSWAMY, R. BHASKARAN

Differential equation model to study dynamic behaviour of globular proteins

Int. J. Peptide Protein Res, (1984), 24, 168-179

P. POTOČNAK, N. YOSMIDA, R. NUSSENZWEIG, V. NUSSENZWEIG

Monovalent fragments of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb 44) protect mice against malarial infection

J. Exp. Med, (1980), 151, 1504-1513

RACANIELLO, BALTIMORE

Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1981), 78, 4887-4891

J. RAVETCH, R. FEDER, A. PAULOVEC, G. BLOBEL

Primary structure and genomic organization of the histidine-rich protein of the malaria parasite *Plasmodium lophurae*

Nature, (1984), 312, 616-620

M. ROSSMANN

Structure of a human common cold virus and functional relationship to the other picornaviruses

Nature, (1985), 317, 145-153

J. ROTHBARD, G. SCHOOLNIZ

The primary sequence and antigenic structure of gonococcal pilin: approaches towards a gonococcal vaccine

Adv. Exp. Med. Biol, (1985), 185, 247-273

- R. SAILE, C. DELPIERE, P. PUCHOIS, G. HOCKE, C. CACHERA,  
A. STEINMETZ, A. TARTAR, J. C. FRUCHART  
Enzyme-Linked ImmunoSorbant assay for human serum amyloid A  
apolipoprotein using specific antibodies against synthetic  
peptides  
Clinical Chemistry, (1988), 33, 1767-1771
- C. SAKARELLOS, M. SAKARELLOS-DAITSIOTIS, D. BLANOT, I. BARRAL,  
J. SAVRDA, E. BRICAS  
Synthèse de peptides substrat de l'entéropeptidase apparentés à la  
séquence N-terminale du trypsinogène  
Bull. Soc. Chim, (1976), 5-6, 781-788
- V. SARIN, S. KENT, J. TAM, R. MERRIFIELD  
Quantitative monitoring of solid phase peptide synthesis by the  
ninhydrin reaction  
Anal. Chem, (1981), 117, 147-157
- M. SHAPIRA, M. JIBSON, G. MULLER, R. ARNON  
Immunity and protection against influenza virus by synthetic  
peptide corresponding to antigenic sites of hemagglutinin  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1984), 81, 2461-246
- R. SHOEMAKER, P. KIM, E. YORK, J. STEWART, R. BALDWIN  
Tests of the helix dipole model for stabilization of  $\alpha$ -helices  
Nature, (1987), 326, 563-567
- R. SPANGENBERG, P. THAMM, E. WUNSCH  
Zur behandlung säureempfindlicher aminosäure-und peptid-derivate  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem, (1971), 352, 5, 655-656
- H. STAHL, P. CREWETHER, R. ANDERS, G. BROWN, R. COPPEL, A. BIANCO,  
G. MITCHELL, D. KEMP  
Interspersed blocks of repetitive and charged amino acids in a  
dominant immunogen of *Plasmodium falciparum*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985), 82, 543-547
- J. STEWART, J. YOUNG  
Solid phase peptide synthesis  
ed. Freeman, (1984), 2<sup>nd</sup>ed.
- J. SUTCLIFFE, T. SHINNINCK, N. GREEN, R. LERNER  
Antibodies that react with predetermined sites on proteins  
Science, (1983), 219, 660-666
- J. TAM, W. HEARTH, R. MERRIFIELD  
Improved deprotection in solid phase peptide synthesis: removal of  
protecting groups from synthetic peptides by an  $S_N2$  mechanism with  
low concentration of HF in dimethyl sulfide  
Tetrahedron Letters, (1982), 23, 43, 4435-4438
- J. TAM, W. HEARTH, R. MERRIFIELD  
 $S_N2$  deprotection of synthetic peptides with a low concentration of  
HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide  
synthesis  
J. Am. Chem. Soc, (1983), 105, 6442-6455

J. Tam

Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system  
Proc. Natl. Acad. Sci USA (1988), 85, 5409-5412

A. TOGNA, B. DELGIUDICE, A. VERDINI, F. BONELLI, A. RESSI,  
H. ENGERS, G. CORRADIN

Synthetic *Plasmodium falciparum* circumsporozoite peptides elicit heterogenous L 3T4<sup>+</sup> T cell proliferative responses in H-2<sup>b</sup> mice  
J. Immunol, (1986), 137, 2956-2960

T. TRIGLIA, H. STAHL, P. CREWETHER, D. SCANLOW, G. BROWN, R. ANDERS, D. KEMPS

The complete sequence of the gene for the knob-associated-histidine-rich protein from *Plasmodium falciparum*  
EMBO, (1987), 6, 1413-1419

P. Van Der MAREL, T. HAZENDOK, M. Van HEZEL

Induction of neutralizing antibodies by poliovirus capsid polypeptides VP1, VP2 and VP3  
Vaccine, (1983), 1, 17-23

S. Van Der WERF, C. WYCHOWSKI, P. BRUNEAU, B. BLONDEL, R. CRAINIC,  
F. HORODNICEANU, M. GIRARD

Localization of a poliovirus type 1 neutralization epitope in viral capsid polypeptide VP1  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1983), 80, 5080-5084

K. WETZ, K. HABERMEHL

Topographical studies on poliovirus capsid proteins by chemical modification and cross-linking with bifunctional reagents  
J. Gen. Virol, (1979), 44, 525

C. WYCHOWSKI, S. Van Der WERF, O. SIFFERT, R. CRAINIC, P. BRUNEAU,  
M. GIRARD

A poliovirus type 1 neutralization epitope is located within amino acid residues 93-104 of viral capsid polypeptide VP1  
EMBO, (1983), 2, 2019-2024

J. YOUNG, W. HOCKMEYER, M. GROSS, W. BALLOU, R. WIRTZ, J. TROSPER,  
R. BEAUDOIN, H. HOLLINGDALE, L. MILLER, C. DIGGS, M. ROSENBERG

Expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite proteins in *Escherichia coli* for potential use in a human malaria vaccine  
Science, (1985), 228, 958-962

F. ZAVALA, J. TAM, M. HOLLINGDALE, A. COCHRANE, I. QUAKYI,  
R. NUSSENZWEIG, V. NUSSENZWEIG

Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria  
Science, (1985), 228, 1436-1440

F. ZAVALA, A. COCHRANE, E. NARDIN, R. NUSSENZWEIG, V. NUSSENZWEIG

Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes  
J. Exp. Med, (1983), 157, 1947-1957

L. ZERVAS, D. BOROVAS, E. GAZIS  
New methods in peptide synthesis. I. Tritylsulfenyl and  
o-nitrophenylsulfenyl groups as N-protecting groups  
J. Am. Chem. Soc, (1963), 85, 3660-3666



Christine DUBEAUX

ELABORATION D'IMMUNOGENES SYNTHETIQUES POUR LA VACCINATION:  
étude des modèles du poliovirus et *Plasmodium falciparum*

RESUME

Nos recherches se sont focalisées sur les principales étapes d'élaboration d'immunogènes synthétiques.

Cruciale, la première étape consiste à sélectionner des peptides à l'aide de critères physico-chimiques qui sont basés sur la détection de zones exposées et la prédiction de conformations. Le modèle du poliovirus nous a permis d'évaluer la fiabilité des méthodes prédictives informatisées de notre laboratoire.

Puis, nous avons reproduit les peptides sélectionnés par synthèse au moyen de différentes stratégies.

Ensuite, nous avons abordé l'étape importante qui permet de transformer un réactif de laboratoire en immunogène synthétique, qui soit caractérisé chimiquement et utilisable chez l'homme. Dans le contexte d'un vaccin anti-malaria, nous avons conçu et réalisé différents modèles afin de potentialiser l'immunogénicité, améliorer la présentation de l'antigène et induire une mémoire immunitaire. L'étude du sporozoïte et de la forme hépatique du *Plasmodium falciparum* nous a conduit à associer, au sein d'un peptide hybride, les épitopes B et T de ces deux stades afin d'assurer une meilleure protection. Nos travaux ont montré l'influence de la conformation des peptides sur leur antigénicité.

Le succès croissant des immunogènes peptidiques offre de réelles perspectives d'avenir pour la vaccination synthétique.

MOTS-CLES

antigénicité, conformation, immunogènes peptidiques, *Plasmodium falciparum*, poliovirus, vaccins synthétiques