

50376
1991
10

65884

50376
1991
10

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS**

N° d'ordre 670

Thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur en
Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée le 18 janvier 1991
par Christophe BOUTILLON

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'IMMUNOREACTIVITE DE
PEPTIDES NATURELS ET MODIFIES DANS DES MODELES
PARASITAIRES ET VIRAUX**



Jury d'Examen : Dr. Claude AURIAULT (Rapporteur)
Pr. André DHAINAUT (Rapporteur)
Pr. Hélène GRAS-MASSE (Examineur)
Dr. Michel JOLIVET (Examineur)
Dr. Pierre SAUTIERE (Examineur)
Pr. André TARTAR (Examineur)

Je remercie Messieurs Claude AURIAULT et André DHAINAUT qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Madame Hélène GRAS-MASSE et Messieurs Michel JOLIVET, Pierre SAUTIERE et André TARTAR qui ont bien voulu l'examiner.

J'aimerais adresser une profonde et amicale reconnaissance à Madame Hélène GRAS-MASSE pour l'enseignement scientifique et pratique qu'elle m'a prodigué durant ces trois années de recherches. J'espère que nous aurons encore l'occasion de collaborer longuement ensemble.

Je remercie Monsieur André TARTAR de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. Il n'a pas hésité à me confier des sujets de recherches délicats et m'a fait prendre conscience qu'une bonne connaissance de la chimie est nécessaire à une bonne appréhension des phénomènes biologiques.

Les résultats exposés dans cette thèse sont le fruit de nombreuses collaborations extérieures à notre laboratoire : ce fut pour moi l'occasion d'un contact avec des personnes de grande qualité scientifique et humaine. J'aimerais particulièrement remercier Jérôme ESTAQUIER, Charles LUTCH, Claude AURIAULT, Jean-Claude AMEISEN, Jean-Loup NEYRINCK, Véronique DUQUESNE, Frédéric MARTINON et Messieurs les Professeurs André CAPRON, Jean-Paul LEVY et Pierre DRUHILE.

Je ne voudrais pas oublier Eric DIESIS et Hervé DROBECQ qui m'ont initié à toutes les subtilités des techniques utilisées au laboratoire. Merci aussi à Marc BOSSUS et à Benoît DEPREZ, leur aide experte et efficace m'a été d'une grande utilité. Je suis reconnaissant également à tous les autres membres du laboratoire pour leur aide ou leurs conseils.

Pour l'essentiel, le travail présenté ici a été réalisé à l'Institut PASTEUR de LILLE et j'adresse une très vive reconnaissance à tous les services de l'Institut qui ont contribué à son bon déroulement.

Le financement de ce travail a été assuré en partie par une bourse doctorale du Ministère de la Recherche et des Technologies.

Enfin, je ne voudrais pas terminer sans avoir une pensée pour ma femme, Charlotte.

Ta patience et ton immense compréhension m'ont été d'un grand secours dans les moments difficiles. Je te dédie ces trois années de recherche ainsi qu'à l'enfant que tu portes.

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

AMEISEN J.C., GUY B., CHAMARET S., LOCHE M., MOUTON Y., NEYRINCK J.L., KHALIFE J., LEPREVOST C., BEAUCAIRE G., BOUTILLON C., GRAS-MASSE H., MANIEZ M., KIENY M.P., LAUSTRIAT D., BERTHIER A., MACH B., MONTAGNIER L., LECOCQ J.P. et CAPRON A..

Antibodies to the *nef* protein and to *nef* peptides in HIV-1 infected seronegative individuals.

AIDS Research and Human Retroviruses, 1989, 5, 279-291.

GRAS-MASSE H., AMEISEN J.C., BOUTILLON C., GESQUIERE J.C., VIAN S., NEYRINCK J.L., DROBECQ H., CAPRON A. et TARTAR A..

A synthetic protein corresponding to the entire *vpr* gene product from the human immunodeficiency virus HIV-1 is recognized by antibodies from HIV-infected patients.

International Journal of Peptide and Protein Research, 1990, 36, 219-226.

GRAS-MASSE H., LONDONO A., BOSSUS M., BOUTILLON C., BARBIER B., DRUILHE P. et TARTAR A..

Modulation of α -helical organization in a unique amino-acid sequence and correlation with antigenicity.

Proceedings of the 21th European Peptide Symposium, 1990 (sous presse).

DUQUESNE V., AURIAULT C., GRAS-MASSE H., BOUTILLON C., DARCY F., CESBRON-DELAUW M.F., TARTAR A. et CAPRON A..

Identification of T-cell epitopes within a 23 kDa antigen of *Toxoplasma gondii*.

Clinical and Experimental Immunology (sous presse).

ESTAQUIER J., BOUTILLON C., AMEISEN J.C., GRAS-MASSE H., LECOCQ J.P., BARBIER B., DIXSON A., TARTAR A., CAPRON A. et AURIAULT C..

T helper cell epitopes of the Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) *nef* protein.

Journal of Immunology (soumis pour publication).

GRAS-MASSE H., BOUTILLON C., VIAN S., NEYRINCK J.L., GESQUIERE J.C., DROBECQ H., AMEISEN J.C., CAPRON A. et TARTAR A..

Chemical synthesis of the protein encoded by the vpr gene of Human Immunodeficiency Virus (HIV-1). Preliminary results of serological studies in HIV infected patients.

FNRS-NFWO Contact group. Structure, conformation and synthesis of biological active peptides, BRUXELLES, BELGIQUE (30 mai 89).

AMEISEN J.C., NEYRINCK J.L., GUY B., LOCHE M., CHAMARET S., KHALIFE J., BOUTILLON C., MOUTON Y., MACH B., MONTAGNIER L., LECOCQ J.P. et CAPRON A..

Antibody response to HIV-1 regulatory gene products in HIV-1 infected seronegative individuals.

7th International Congress of Immunology, Berlin, (30 juillet au 5 aout 1989).

GRAS-MASSE H., AMEISEN J.C., BOUTILLON C., VIAN S., NEYRINCK J.L., GESQUIERE J.C., CAPRON A. et TARTAR A..

Antibodies from HIV-1 infected patients preferentially recognize a dimeric form of the vpr gene product.

Cold Spring Harbor, Modern approaches to new vaccines, New York (20 au 24 septembre 1989).

ESTAQUIER J., BOUTILLON C., AURIAULT C., DIXSON A., AMEISEN J.C., TARTAR A. et CAPRON A..

Helper T-cell epitope analysis of the nef regulatory protein of Human Immunodeficiency Virus (HIV-1).

Société Française d'Immunologie, Paris (27-28 septembre 90).

Acides aminés naturels

A = Ala = Alanine	M = Met = Méthionine
C = Cys = Cystéine	N = Asn = Asparagine
D = Asp = Acide aspartique	p = Pro = Proline
E = Glu = Acide glutamique	Q = Gln = Glutamine
F = Phe = Phénylalanine	R = Arg = Arginine
G = Gly = Glycine	S = Ser = Sérine
H = His = Histidine	T = Thr = Thréonine
I = Ile = Isoleucine	V = Val = Valine
K = Lys = Lysine	W = Trp = Tryptophane
L = Leu = Leucine	Y = Tyr = Tyrosine

Autres abréviations

I ^{re} :	primaire
II ^{re} :	secondaire
III ^{re} :	tertiaire
IV ^{re} :	quaternaire
Ac :	anticorps
ADN :	acide désoxyribonucléique
AES :	antigènes excrétés et sécrétés
Ag :	antigène
Aib :	acide aminoisobutyrique
ASB :	albumine sérique bovine
BOC :	tert.-butyloxycarbonyle
BOP :	hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthyl-aminophosphonium
C α :	domaine constant de la chaîne α
C β :	domaine constant de la chaîne β
CCM :	chromatographie sur couche mince
Cy1 :	premier domaine constant de la chaîne lourde de l'immunoglobuline G
CD ₄ ⁺ :	cellule porteuse de l'antigène cellulaire CD ₄
CD ₈ ⁺ :	cellule porteuse de l'antigène cellulaire CD ₈
CDC :	"Center for Disease Control", Atlanta
CDR :	"complementary determining region"
C _L :	domaine constant de la chaîne légère

CLHP : chromatographie liquide haute pression
cm : centimètre
CMH : complexe majeure d'histocompatibilité
CPA : cellule présentatrice de l'antigène
D : "diversity"
D : dextrogyre
DCC : dicyclohexylcarbodiimide
deg : degré
DIEA : diisopropyléthylamine
dmole : décimole
DMF : diméthylformamide
DNP : dinitrophényle
ELISA : "enzyme linked immunosorbant assay" (test immunoenzymatique)
Fab : fragment ayant un site d'"antigen binding"
Fab' : autre fragment ayant un site d'"antigen binding"
Fc : fragment qui cristallise
FR : "framwork"
Fv : fragment variable
g : gramme
GTP : guanosine triphosphate
H : "heavy" (chaîne lourde)
HOBT : hydroxybenzotriazole
Ig : immunoglobuline (anticorps)
J : "jonction"
kDa : kiloDalton
l : litre
L : "light" (chaîne légère)
L : lévogyre
LSA : "liver-stade antigen"
µg : microgramme
µl : microlitre
ml : millilitre
mm : millimètre
MM : masse moléculaire
O : sulfoxide
PAM : phénylacétamidométhyle
PBS : "phosphate salin buffer" (tampon phosphate salin)
PDMS : "plasma desorption mass spectroscopy"

Rf : en CCM, distance parcourue par la substance analysée / distance parcourue par le solvant

RIA : "radioimmuno assay" (test radioimmunologique)

RMN : résonance magnétique nucléaire

TFA : acide trifluoroacétique

V α : domaine variable de la chaîne α

V β : domaine variable de la chaîne β

V_H : domaine variable de la chaîne lourde

VIH : virus d'immunodéficience humaine

V_L : domaine variable de la chaîne légère

SOMMAIRE

GENERALITES	p 1
TABLE DES MATIERES	
I - INTRODUCTION	p 1
II - RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DES CELLULES B (RECEPTEUR B)	p 11
III - RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DES CELLULES T (RECEPTEUR T)	p 37
IV - METHODES DE PREVISION DES EPITOPES	p 59
RESULTATS DANS LES MODELES EXPERIMENTAUX	p 74
TABLE DES MATIERES	
I - INTRODUCTION	p 74
II - UNE PROTEINE SYNTHETIQUE CORRESPONDANT AU PRODUIT ENTIER DU GENE VPR DE VIH-1 EST RECONNUE PAR DES ANTICORPS DE SUJETS INFECTES PAR VIH-1	p 77
III - DETECTION D'ANTICORPS ANTI-PEPTIDES DE NEF (ET ANTI-PROTEINE NEF) CHEZ DES SUJETS INFECTES PAR VIH-1 MAIS SERONEGATIFS	p 91
IV - MODULATION DE L'ORGANISATION α -HELICOIDALE D'UN PEPTIDE SYNTHETIQUE ET CORRELATION AVEC SON ANTIGENICITE	p 103
V - IDENTIFICATION DES EPITOPES T AUXILIAIRES D'UN ANTIGENE (P24) DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	p 109
VI - RECHERCHE DES EPITOPE T AUXILIAIRES DE LA PROTEINE NEF DE VIH-1	p 122
VII - INDUCTION <i>IN VIVO</i> D'UNE REPONSE CELLULAIRE T CYTOTOXIQUE ET D'UNE REPONSE ANTICORPS SPECIFIQUES DE LA PROTEINE GP120 DE VIH-1, A L'AIDE D'IMMUNOGENES SYNTHETIQUES LIPOPEPTIDIQUES	p 145
CONCLUSION GENERALE	p 159

METHODES UTILISEES

p 163

TABLE DES MATIERES

FICHES ANALYTIQUES DES PEPTIDES SYNTHETISES

p 193

TABLE DES MATIERES

BIBLIOGRAPHIE

p 208

GENERALITES

GENERALITES	p 1
I - INTRODUCTION	p 1
A - IMMUNITE NON ADAPTATIVE	p 1
B - IMMUNITE ADAPTATIVE	p 2
C - ANTIGENICITE	p 3
D - IMMUNOGENICITE	p 4
E - NOTION D'EPITOPE	p 5
F - CELLULES B ET CELLULES T	p 6
1 - Cellules B	p 6
2 - Cellules T	p 7
G - LES RECEPTEURS DE L'ANTIGENE	p 9
H - CHOIX DE L'ETUDE DES ANTIGENES PEPTIDIQUES ET POLYPEPTIDIQUES	p 10
II - RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DES CELLULES B (RECEPTEUR B)	p 11
A - STRUCTURE GLOBALE DE L'ANTICORPS	p 11
1 - Chaîne lourde et chaîne légère	p 12
2 - Domaines variables, domaines constants et région charnière	p 13
3 - Digestions enzymatiques des anticorps	p 15
B - STRUCTURES IMPLIQUEES DANS LA LIAISON A L'ANTIGENE (DOMAINES VARIABLES DES CHAINES L ET H)	p 16
C - MODE DE RECONNAISSANCE (ANTIGENICITE) DES PROTEINES ET DES PEPTIDES	p 17
1 - Différents types d'épitopes	p 18
2 - Liaisons impliquées dans la reconnaissance antigène- anticorps	p 19
a - Liaison hydrogène	p 20
b - Liaison électrostatique ("ionique")	p 21
c - Forces de VAN DER WAALS	p 22

d - Liaison hydrophobe ("apolaire")	p 23
e - Distance d'interaction	p 25
f - Complémentarité	p 25
3 - Affinité	p 27
4 - Structures radiocristallographiques de complexes antigènes-anticorps	p 28
a - Présence en surface et conformations	p 30
b - Mobilité et accessibilité	p 31
c - Complémentarité	p 32
d - Liaisons observées	p 33
e - Changements conformationnels : 2 modèles envisagés	p 34
f - Interaction peptide-anticorps	p 36
III - RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DES CELLULES T (RECEPTEUR T)	p 37
A - CELLULES PRESENTATRICES DE L'ANTIGENE	p 37
1 - Présentation aux cellules T des déterminants antigéniques portés par les molécules de classe II du CMH	p 38
2 - Présentation aux cellules T des déterminants antigéniques portés par les molécules de classe I du CMH	p 40
B - STRUCTURE DES MOLECULES DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE (CMH)	p 42
1 - Molécules de classe I du CMH	p 42
a - Structure globale des molécules de classe I	p 42
b - Structure radiocristallographique d'une molécule de classe I du CMH : site de liaison à l'antigène	p 43
2 - Molécules de classe II de CMH	p 46
a - Structure globale des molécules de classe II	p 46
b - Modélisation de la structure spatiale du site de liaison à l'antigène des molécules de classe II du CMH	p 47

C - STRUCTURE DU RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DES CELLULES T	
(RECEPTEUR T)	p 49
1 - Structure globale du récepteur T	p 50
2 - Structures impliquées dans la liaison à l'antigène et à la molécule du CMH (domaines variables des chaînes α et β)	p 52
D - MODE DE RECONNAISSANCE (ANTIGENICITE) DES PEPTIDES ANTIGENIQUES	p 53
1 - Comparaison antigénicité T / antigénicité B	p 53
2 - Restriction par les molécules du CMH et ses conséquences	p 54
IV - METHODES DE PREVISION DES EPITOPES	p 59
A - INTRODUCTION	p 59
B - PREVISION DES EPITOPES B	p 60
1 - Critères thermodynamiques	p 61
2 - Critères statistiques	p 62
a - Acrophilie	p 62
b - Hydrophatie	p 63
c - Surface accessible	p 64
d - Mobilité et flexibilité	p 67
3 - Prévisions conformationnelles	p 68
a - Méthode de CHOU Y. et FASMAN G.	p 70
b - Moment hydrophobe et représentation d'EISENBERG D. et col.	p 71
C - PREVISION DES EPITOPES T	p 72
1 - Hélice α amphiphile	p 72
2 - Pattern de ROTHBARD	p 73

I - INTRODUCTION

La fonction principale du système immunitaire consiste à protéger l'organisme des agents infectieux et des produits toxiques qu'ils sont amenés à excréter ou sécréter. Ce système a développé une série de mécanismes très efficaces pour localiser et éliminer (ou neutraliser) les cellules étrangères, les virus ou les produits macromoléculaires de ces pathogènes. Une surveillance est ainsi réalisée grâce à des protéines et à des cellules circulant au travers de l'organisme. Nombreux sont les mécanismes qui permettent une telle surveillance et ceux-ci peuvent être divisés en 2 catégories :

- mécanismes de l'**immunité non-adaptative**, également appelée **immunité non-spécifique** ou **immunité naturelle**,
- mécanismes de l'**immunité adaptative** que l'on nomme aussi **immunité spécifique** ou **immunité à mémoire**.

A - IMMUNITE NON-ADAPTATIVE

Elle constitue une première ligne de défense capable d'arrêter la plupart des agents pathogènes avant que ne s'établisse une véritable infection.

L'immunité non-adaptative est générée par des cellules répondant non-spécifiquement aux molécules étrangères. Elle inclue :

- la phagocytose par les cellules de la lignée monocytes/macrophages;
- la libération de lysozyme dans la plupart des sécrétions;
- la lyse cellulaire par les cellules tueuses naturelles ("Natural Killer");
- la sécrétion des glandes sébacées;
- l'acidité gastrique;

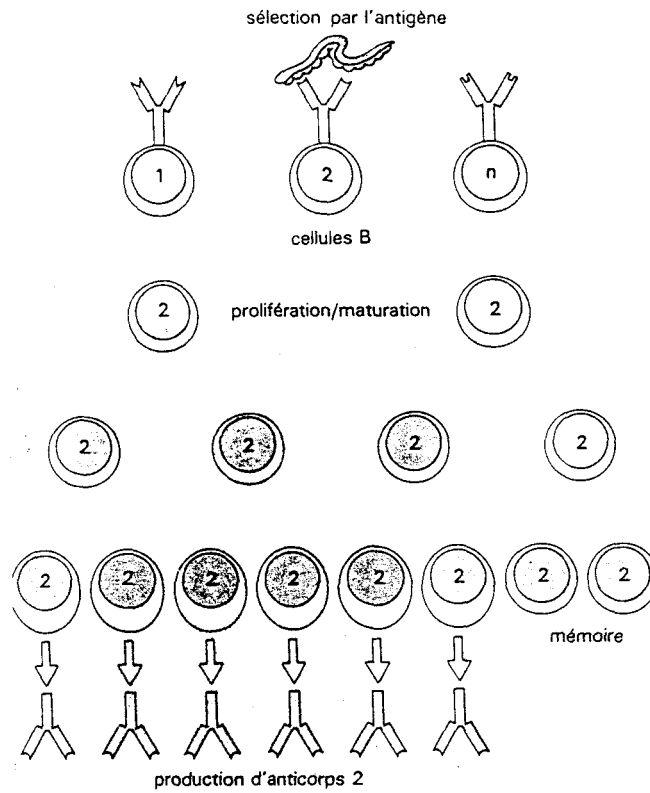


Figure 1 : Spécificité (distinction du "soi" et du "non soi") et mémoire de la réponse immune.

- la peau, etc..

Ce type d'immunité n'est pas modifié, même si les molécules étrangères sont exposées de façon répétée au système immunitaire.

B - IMMUNITE ADAPTATIVE

En cas d'échec de l'immunité non-adaptative, les mécanismes de l'immunité adaptative entrent en action. Ils déclenchent une réaction dirigée spécifiquement contre l'intrus, entraînant généralement sa destruction ou son élimination de l'organisme.

La réponse adaptative présente 2 caractères importants : la **spécificité** et la **mémoire**. L'immunité adaptative est dirigée contre des molécules spécifiques. Elle s'adapte aux caractéristiques physico-chimiques de chaque immunogène et augmente par réexposition de celles-ci au système immunitaire, car elle conserve la mémoire de l'intrus (Figure 1). L'immunité établie envers un agent étranger ne s'exerce, à court ou à long terme, qu'envers cet agent.

Il existe 2 types d'immunité adaptative :

- l'**immunité spécifique humorale** faisant intervenir des anticorps synthétisés par une catégorie de cellules, appelées **cellules B** (= **réponse humorale**);
- l'**immunité spécifique cellulaire** faisant intervenir une autre catégorie de cellules, appelées **cellules T** (= **réponse à médiation cellulaire**).

Signalons également que la réponse immunitaire adaptative se montre **xénophobe**, à savoir que le système immunitaire ne tolère aucun élément qui

lui soit étranger. Cela implique que les agents responsables de la réponse immunitaire fassent la discrimination entre le "soi" que sont les éléments constitutifs de l'organisme auquel ils appartiennent et le "non-soi" que sont les substances étrangères à cet organisme. Le système immunitaire ne pourra tolérer que des éléments de variation très proches des constituants de l'organisme qu'il défend. Cette faible marge de tolérance immunitaire a été utilisée pour mettre au point toutes les techniques de transfusion et, plus récemment, à travers la définition des groupes tissulaires, pour déboucher sur la codification des greffes d'organes.

C - ANTIGENICITE

La notion de spécificité fait appel à un phénomène important de l'immunité adaptative, que l'on retrouve également dans de nombreuses fonctions de l'organisme : la **reconnaissance** au niveau moléculaire. Les cellules du système immunitaire portent à leur surface de nombreuses structures leur permettant de reconnaître ou d'être reconnues.

Une molécule (ligand) capable d'être reconnue spécifiquement par un récepteur de l'immunité adaptative est appelé **antigène**. Ce peuvent être des structures extrêmement diverses (protéines, polysides, lipides, acides nucléiques), existant chez l'individu même (structures **autologues** ou **syngéniques**), chez d'autres individus de la même espèce (structures **allogéniques**), chez tous les individus de la même espèce (structures **isogéniques**), chez des individus d'une autre espèce, d'un autre ordre, d'une autre classe (structures **xénogéniques**) ou enfin d'origine organique ou même minérale.

Le terme d'**antigénicité** désigne donc la capacité d'une structure moléculaire particulière d'être reconnue par le récepteur à la surface des lymphocytes T ou par celui à la surface des lymphocytes B ou enfin par les anticorps solubles, protéines produites par ces mêmes lymphocytes B. Nous définirons plus loin la nature des récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T et B, ainsi que celle des anticorps solubles.

Très longtemps, le terme d'antigène a été utilisé à la place de celui d'immunogène et cette confusion se rencontre encore parfois de nos jours.

D - IMMUNOGENICITE

La notion d'**immunogénicité** est très importante. Elle définit la capacité d'une structure moléculaire à induire une réponse immune mesurable dans un organisme hôte. Une telle structure est appelée **immunogène**. L'immunogène est un antigène présenté sous une forme capable d'induire une réponse immunitaire spécifique. Cette propriété dépend donc de la capacité de réponse de l'hôte, c'est à dire d'une multitude de facteurs de régulation dont on peut citer :

- la différence entre l'antigène et les molécules du "soi" (plus cette différence est importante, plus l'antigène a de chances d'être immunogène);
- l'activité des lymphocytes T auxiliaires (aussi nommés amplificateurs);
- les réseaux idiotypiques;
- la présentation de l'antigène;
- le répertoire des lymphocytes B et T (donc l'antigénicité).

Certaines molécules ne sont pas capables, sans couplage préalable avec de grosses molécules porteuses, d'induire la production d'anticorps spécifiques. Par contre elles peuvent se lier à des anticorps spécifiques, qu'elles soient couplées ou non. De telles molécules sont appelées **haptènes**.

E - NOTION D'ÉPITOPE

Trop souvent le terme d'antigène a été utilisé pour désigner indifféremment une molécule (molécule organique simple, peptide, oligonucléotide, sucre simple, macromolécule), un virus, une bactérie et même un organe. Généralement cette confusion se faisait dans le cadre d'une reconnaissance par les récepteurs à la surface des lymphocytes B et par les anticorps solubles qu'ils produisent.

En fait, comme nous le verrons plus loin, les anticorps ne sont pas des récepteurs complémentaires d'une macromolécule ou d'une cellule entière mais d'un **déterminant antigénique** unique possédant une taille limitée. Un tel déterminant est appelé **épitope** et il fait partie de l'ensemble, antigène. Un antigène peut présenter plusieurs épitopes différents ou plusieurs épitopes identiques (épitopes répétitifs). La partie du récepteur qui reconnaît l'épitope est appelée **paratope**.

Il en va de même pour le récepteur spécifique à la surface des lymphocytes T, complémentaire d'un déterminant antigénique unique possédant lui aussi une taille limitée. Ce déterminant antigénique est également appelé épitope.

Pour différencier ces deux types d'épitopes, on parle communément d'**épitopes B** pour les déterminants reconnus par le récepteur à la surface

des **lymphocytes B** et par les anticorps solubles, et d'**épitopes T** pour les déterminants reconnus par le récepteur à la surface des **lymphocytes T**.

F - CELLULES B ET CELLULES T

Le système immunitaire contient plus de 10^9 lymphocytes répartis dans tout l'organisme et ainsi, il présente la possibilité de répondre rapidement en n'importe quel site à de très nombreux antigènes.

Il existe deux grandes catégories de lymphocytes responsables de l'immunité adaptative, les cellules B et les cellules T. Elles remplissent des fonctions distinctes mais sont toutes deux capables de reconnaître l'antigène. Il existe une troisième population de cellules lymphoïdes, nommées non-B, non-T ou cellules nulles, mais elles n'expriment pas de récepteur à l'antigène.

1 - Cellules B

Les cellules B ont pour fonction de produire des **anticorps**. Les cellules immunocompétentes portent elles-mêmes des récepteurs de type anticorps à leur surface. Ce sont les marqueurs qui les caractérisent et dont la spécificité est identique à celle des anticorps sécrétés par leur descendance après activation et différenciation. Ces molécules sont insérées dans la membrane cellulaire où elles jouent le rôle de récepteurs spécifiques pour l'antigène.

Chaque cellule immunocompétente porte des récepteurs anticorps de spécificité unique et donc **chaque cellule B est monospécifique**. La compétence d'une cellule B pour la synthèse d'anticorps d'une spécificité

donnée s'instaure pendant sa phase de différenciation, préalablement à tout contact avec l'antigène.

Les lois les plus simples de la thermodynamique indiquent qu'un épitope au sein de l'antigène se lie plus facilement au meilleur récepteur (le plus affin) parmi les millions de récepteurs possibles à la surface des millions de cellules B de l'organisme hôte. Cette interaction active la cellule qui prolifère et se différencie pour former un clone cellulaire (plasmocyte) produisant un anticorps de spécificité donnée et des cellules mémoires de spécificité identique. Cet ensemble d'évènements constitue la **théorie de la sélection clonale** de BURNET (BURNET F.M., 1959.).

2 - Cellules T

Les cellules T reconnaissent l'antigène et les molécules du CMH grâce à un récepteur de surface de la super-famille des immunoglobulines, distinct des anticorps présents à la surface des cellules B. Ce récepteur est étroitement associé à une glycoprotéine nommée T3, présente sur toutes les cellules T matures chez l'homme. Comme les cellules B, chaque cellule immunocompétente porte des récepteurs de spécificité unique et donc **chaque cellule T est monospécifique.**

On distingue trois types principaux de sous-populations cellulaires T, selon leurs fonctions immunologiques et les marqueurs polypeptidiques présents à leur surface :

- les cellules T auxiliaires également nommées T amplificatrices ("T helpers");
- les cellules T cytotoxiques;
- les cellules T suppressives.

Les **cellules T auxiliaires** contrôlent et régulent le développement des réponses immunes. Elles peuvent coopérer avec les cellules B pour induire la production d'anticorps dirigés contre des antigènes T-dépendants, pour participer à la maturation des cellules T cytotoxiques et T suppressives ou pour moduler l'activité d'autres cellules effectrices.

Les **cellules T cytotoxiques** sont des cellules effectrices jouant un rôle particulièrement important dans les réactions immunitaires envers les parasites intracellulaires et les virus, mais également dans le cadre des rejets de greffe. On appelle souvent cellules cibles les cellules qui peuvent être reconnues par les cellules T cytotoxiques soit parce qu'elles sont infectées, soit parce qu'elles portent des déterminants allogéniques ou xénogéniques.

Les cellules T auxiliaires et T cytotoxiques, comme les cellules B, peuvent subir l'influence de **cellules T suppressives**, c'est à dire un phénomène de régulation négative par inhibition. Il est admis en général que les cellules T, auxiliaires et suppressives, contrôlent ensemble l'activité des cellules B et des cellules T cytotoxiques, principales cellules effectrices du système immunitaire. Les cellules T auxiliaires agissent directement sur les cellules effectrices, tandis que les cellules T suppressives, beaucoup moins bien connues, semblent agir en inhibant essentiellement les cellules T auxiliaires dont dépendent les cellules effectrices.

De manière très simplifiée, il est possible de représenter la réponse immunitaire sous la double influence des lymphocytes T régulateurs aux fonctions amplificatrices (+, cellules T auxiliaires) ou inhibitrices (-,

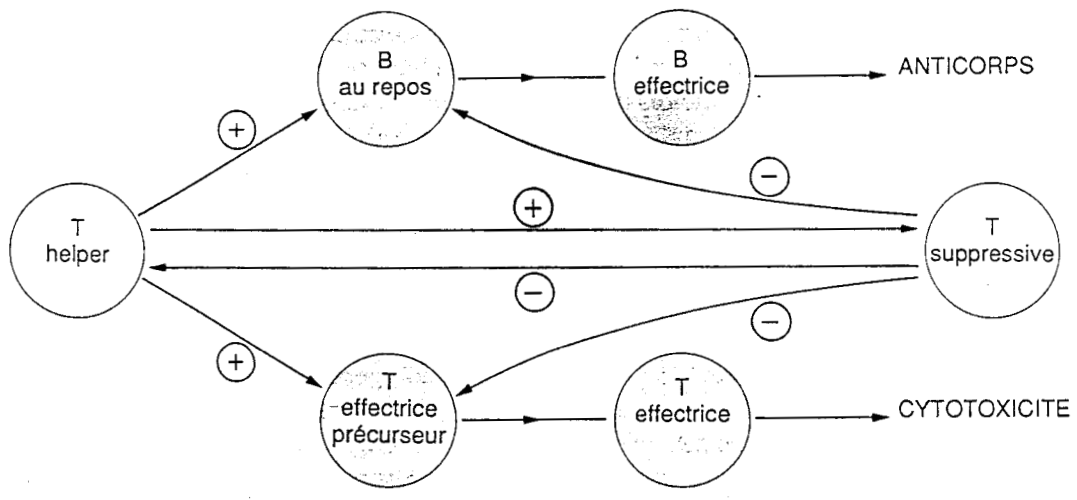


Figure 2 : Interactions entre lymphocytes. Contribution à la régulation de la réponse immune.

cellules T suppressives) et du contrôle mutuel qu'exercent les lymphocytes T régulateurs entre eux (Figure 2).

Le réseau complexe d'interactions cellulaires que nous venons de décrire brièvement ne constitue qu'un maillon de la chaîne de régulation complexe de la réponse immune. En dehors de l'antigène lui-même dont le rôle est crucial, il existe d'autres mécanismes régulateurs du système immunitaire qui peuvent parfois interagir avec l'antigène. Parmi les plus importants, nous pouvons citer l'effet immunorégulateur des anticorps et des complexes immuns, la régulation idiotypique des récepteurs des cellules B et des cellules T, la reconnaissance du "soi" et du "non-soi", la régulation par les systèmes nerveux et endocrinien, etc..

G - LES RECEPTEURS DE L'ANTIGENE

Il est aujourd'hui clairement établi qu'il existe 2 types de molécules impliquées dans le processus de reconnaissance de l'antigène : les anticorps et les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T. Ces molécules constituent de véritables familles caractérisées par leur diversité et leur hétérogénéité. Leur élaboration est très semblable du point de vue de la génétique moléculaire. Elles nécessitent, en effet, des réorganisations génétiques permettant de générer une multitude de récepteurs distincts capables de reconnaître un univers antigénique important.

La spécificité de la réponse immune est en partie contrôlée par un mécanisme très simple, qui porte le nom d'**exclusion allélique** : une cellule reconnaît un déterminant antigénique (épitope). En effet, tous les récepteurs de l'antigène sont identiques à la surface d'un même lymphocyte. C'est la **monospécificité cellulaire**. La spécificité est maintenue par un

processus n'autorisant l'expression que d'un type de récepteur au sein de chaque lymphocyte : bien que tous les lymphocytes d'un individu normal portent deux gènes pour chaque locus, un seul allèle de chaque polypeptide composant le récepteur est exprimé dans une même cellule. Nous l'avons déjà dit, la production de ce dernier s'effectue en l'absence d'antigène. Néanmoins, un répertoire très diversifié de récepteurs de l'antigène est disponible avant l'introduction de celui-ci dans l'organisme. Ceci s'applique aussi bien aux cellules B qu'aux cellules T, dont nous allons étudier en détail la structure des récepteurs pour l'antigène et le mode de reconnaissance de ce dernier.

H - CHOIX DE L'ETUDE DES ANTIGENES PEPTIDIQUES ET POLYPEPTIDIQUES

Les antigènes de nature glucidique, lipidique et nucléique peuvent être reconnus par les cellules B. Cependant, les connaissances les plus approfondies sur l'antigénicité concernent les antigènes de nature protéique. Les principes de base de la reconnaissance des protéines et des peptides par les anticorps peuvent toutefois être appliqués à des antigènes de nature non protéique.

Quant aux cellules T, elles ne reconnaissent que des antigènes de nature protéique qui, à l'inverse des cellules B, ne peuvent être considérés isolément mais uniquement en association avec des molécules codées par le CMH, à la surface de cellules présentatrices.

Ainsi tout au long de notre thèse, nous envisagerons les antigènes peptidiques et polypeptidiques, laissant volontairement de côté les antigènes d'autres natures.

II - RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DES CELLULES B (RECEPTEUR B)

La reconnaissance spécifique de l'antigène peut induire une prolifération de lymphocytes B qui, transformés en plasmocytes avec l'aide des lymphocytes T auxiliaires, sécrètent des anticorps dirigés contre l'antigène inducteur. C'est l'**immunité spécifique humorale**. Les anticorps produits circulent dans le sang et la lymphe où ils s'associent aux antigènes étrangers ("non soi"). Les complexes antigène-anticorps sont alors éliminés de la circulation principalement par la phagocytose qu'opèrent les macrophages. Lymphocytes B et plasmocytes présentent à leur surface des anticorps ayant la même spécificité que ceux qui sont sécrétés.

Le terme d'**immunoglobuline** est employé de manière interchangeable avec celui d'anticorps. Formellement, un **anticorps** est une glycoprotéine, récepteur de surface des cellules B ou sécrété par ces dernières, qui se lie de façon spécifique à un épitope sur un antigène. Le terme d'immunoglobuline se réfère aussi à une super-famille de glycoprotéines présentant des homologies de séquence et de structure, dont font partie les anticorps ainsi que le récepteur à la surface des cellules T et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dont nous parlerons plus loin.

A - STRUCTURE GLOBALE DE L'ANTICORPS

A la différence de la plupart des autres récepteurs, les anticorps existent non seulement sous forme membranaire (à la surface des cellules B), mais aussi sous forme circulante, ce qui a permis de les préparer en relativement grande quantité et de déterminer leur structure par analyse

	Structure			Interactions fonctionnelles (chez l'homme)									Sous-classes humaines		Sous-classes murines	
	Sous-unités	Dom. chaînes lourdes	Taille	Demi-vie dans le sérum humain (jours)	Fixation du complément	Fixation aux plaquettes	Sensibilisation des basophiles et mastocytes	Passage transplacentaire	Passage transépithélial	Opsonisation pour macrophages, neutrophiles, et éosinophiles	Sensibilisation des cellules K	Fixation aux lymphocytes	Sous-classe	Taux sérique (mg/ml)	Sous-classe	Taux sérique (mg/ml)
IgM	5	5	19s	5.1	++	-	-	-	(+)	-	-	T**	μ	1,5	μ	0,6-1,0*
IgG	1	4	7s	23*	+*	+	-	+*	(+)	+*	+*	T**B	γ ₁	9	γ ₁	4,6-6,5
													γ ₂	3	γ _{2a}	1,0-4,2
													γ ₃	1	γ _{2b}	1,2-2,0
													γ ₄	0,5	γ ₃	0,1-0,2
IgA	1, 2 ou plus	4	7s ou 11s	5,8	-	-	-	-	++	-	-	T**B**	α ₁	3	α	0,26-0,4
													α ₂	0,5		
IgD	1	4	7s	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	δ	0,03	δ	***
IgE	1	5	8s	2,3	-	-	++	-	-	-	-	T**B**	ε	0,05 x 10 ⁻³	ε	0,1x10 ⁻³

+ Chez la souris, ces valeurs sont très variables selon les lignées et l'âge
* Certaines sous-classes seulement
** Certaines sous-populations seulement
*** Les taux sériques des IgD murines sont très faibles ou non mesurables

Figure 3 : Fonctions et propriétés des différentes classes d'anticorps.

biochimique et cristallographique. Ce sont, à l'heure actuelle, les récepteurs pour l'antigène les mieux connus.

1 - Chaîne lourde et chaîne légère

Les anticorps constituent une grande famille de glycoprotéines composées d'une ou plusieurs copies de l'unité caractéristique de base observée au microscope électronique sous la forme d'un "Y". Chaque unité structurale "Y" contient 4 chaînes polypeptidiques :

- 2 copies d'un polypeptide connu sous le nom de **chaîne lourde H** ("heavy") contenant environ 440 acides aminés et pesant 50 à 77 kDa,
- 2 copies d'un polypeptide nommé **chaîne légère L** ("light") contenant environ 220 acides aminés et pesant 25 kDa.

Chez les mammifères on distingue 5 **classes** d'anticorps (ou immunoglobulines : Ig) : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM, dont il existe, pour chacune, une forme membranaire et une forme sécrétée. Ces 5 classes se différencient selon le nombre d'unités structurales "Y" et le type de chaîne lourde qu'elles contiennent (α pour IgA, δ pour IgD, ϵ pour IgE, γ pour IgG et μ pour IgM). Pour certaines classes d'immunoglobulines, il s'ajoute une hétérogénéité au niveau de la chaîne lourde (H), ce qui a donné naissance à des **sous-classes** dont le type et le nombre varient d'une espèce de mammifère à l'autre (Figure 3). Les différences dans le type de chaîne lourde et le nombre d'unités structurales "Y" permettent à ces glycoprotéines d'apparaître et d'agir dans différentes sortes de réponses immunitaires et à des étapes particulières de la maturation de ces réponses.

Il existe 2 types de chaînes légères (L) chez la plupart des vertébrés : κ et λ . Potentiellement chaque type de chaîne L peut se combiner avec chaque

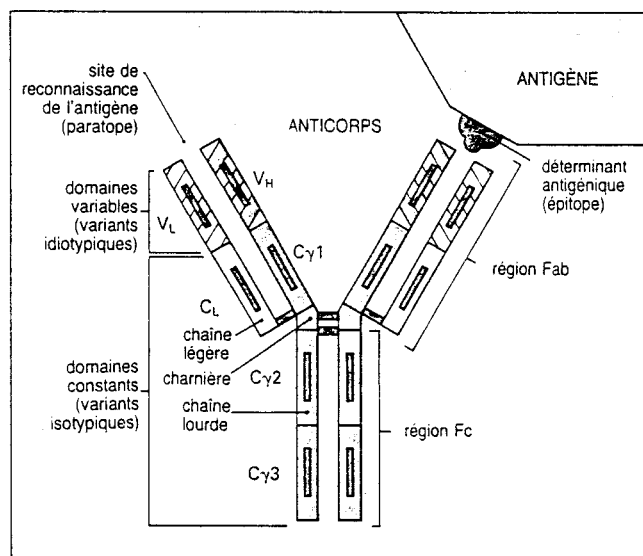


Figure 4 : Structure de l'anticorps reflétant sa bivalence (2 paratopes) et sa bifonctionnalité (paratopes et région constante).

type de chaîne H, mais une molécule d'anticorps possède un seul type de chaîne L et un seul type de chaîne H, les hybrides naturels n'existant pas.

Les 2 chaînes L et les 2 chaînes H sont reliées par 4 **ponts disulfure intercaténaux** (2 entre les 2 chaînes H et 2 reliant chacun 1 chaîne H avec 1 chaîne L) dans le cas des IgG₁ et IgG₄ humaines, et par des liaisons non covalentes.

Chaîne L et chaîne H se composent de plusieurs domaines globulaires ayant une structure tertiaire particulière. Chaque **domaine** est constitué d'environ 110 acides aminés et comporte plusieurs boucles et feuillets plissés β antiparallèles, stabilisés par des **ponts disulfures intracaténaux** responsables, chacun, d'une boucle rapprochant dans l'espace 2 acides aminés éloignés d'environ 60 résidus. Les ponts disulfures entre les chaînes polypeptidiques ne sont pas aussi protégés que ceux situés à l'intérieur des domaines et sont donc plus facilement clivés en milieu réducteur. Si ce milieu réducteur est éliminé et si l'on rétablit un pH neutre, les chaînes se réassocient pour former la molécule native, même si les groupements SH des cystéines ont été bloqués chimiquement. Cette expérience démontre qu'il existe des interactions secondaires bien définies entre les différents domaines des chaînes L et H.

2 - Domaines variables, domaines constants et région charnière

La structure des anticorps est plus facile à appréhender en considérant l'immunoglobuline la plus abondante dans le sérum, l'IgG, qui ne contient qu'une unité structurale "Y". L'IgG possède 3 régions protéiques qui reflètent sa **bifonctionnalité**, c'est-à-dire sa capacité à associer l'antigène à une cellule effectrice (Figure 4) :

- 2 de ces régions sont identiques et forment l'extrémité des "bras" de l'unité structurale "Y". Chaque "bras" contient un site pouvant lier spécifiquement un déterminant antigénique (**épitope**) au niveau du site de reconnaissance, appelé **paratope**, que forment les domaines N-terminaux des chaînes L et H et qui font de l'IgG une **molécule bivalente**. Ces régions sont très variables entre les différentes molécules d'anticorps. Ce sont les **domaines variables (domaines V)**. On retrouve 1 domaine variable dans la partie N-terminale de chaque chaîne L (**VL**) et 1 domaine variable dans la partie N-terminale de chaque chaîne H (**VH**),
- la troisième région forme la base de l'unité structurale "Y". Elle est constituée de domaines dont la variabilité est nettement moindre et que l'on appelle **domaines constants (domaines C)**. On retrouve 1 domaine constant dans la partie C-terminale de chaque chaîne L (**CL**) et 3 domaines constants dans la partie C-terminale de chaque chaîne H (**C γ 1, C γ 2 et C γ 3**). Cette région est très importante dans certains aspects de la réponse immune.

La **région charnière** de l'immunoglobuline est située au niveau de la chaîne lourde, entre les domaines C γ 1 et C γ 2 où se forment les ponts disulfures reliant les 2 chaînes H entre elles. Elle sépare également les 2 régions Fab et Fc dont nous parlerons plus loin, car à cet endroit, la structure primaire des chaînes H est particulièrement exposée aux diverses actions enzymatiques (papaine, pepsine, etc.). Elle est suffisamment flexible pour accorder à l'Ig une certaine souplesse et permettre aux "bras" de l'unité structurale "Y" de se fixer sur des épitopes séparés (épitopes répétés sur le même antigène ou épitopes identiques sur deux molécules d'antigène) par des mouvements latéraux mais également rotatifs.

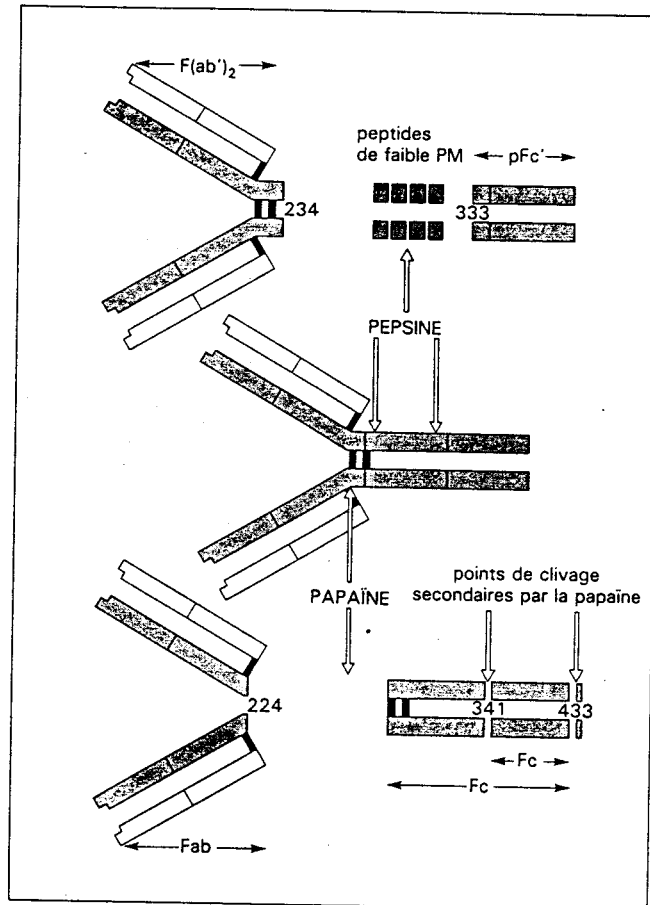


Figure 5 : Sites de clivage enzymatique de l'IgG1 humaine.

En résumé, l'ensemble des informations qui précèdent concernant la structure de la molécule d'immunoglobuline (IgG) montrent qu'au niveau des régions N-terminales, les domaines variables (VL et VH) sont impliqués dans la reconnaissance de l'antigène et contiennent les 2 paratopes. Les régions constantes CL et C γ 1, proches des régions variables, sont impliquées dans la stabilisation de l'ensemble chaîne L-chaîne H au moyen de liaisons covalentes et non covalentes. Les régions C γ 2 et C γ 3 sont impliquées dans les fonctions effectrices de l'immunoglobuline.

3 - Digestions enzymatiques des anticorps

Structure globulaire compacte et ponts disulfures (il en existe 16 dans l'Ig G humaine) confèrent aux anticorps une stabilité inhabituelle pour des protéines. Ceci explique que le faible nombre de clivages causés aux Ig natives par les protéases est essentiellement localisé dans la région charnière qui constitue la zone la plus exposée de la molécule (Figure 5).

Ainsi, la molécule d'anticorps peut être fragmentée en 3 parties par l'action de la **papaïne** qui coupe essentiellement en position Nt de la région charnière pour donner:

- 2 parties **Fab** (Fragment ayant un site d'"antigen binding") univalentes, composées chacune d'un "bras" de l'unité structurale "Y" c'est à dire (VL-CL) (VH-CH); chaque Fab contient un paratope;
- 1 partie **Fc** (Fragment qui cristallise) composé de la base de l'unité structurale "Y", donc (C γ 2-C γ 3) (C γ 2-C γ 3).

La **pepsine**, quant à elle, libère 3 fragments principaux en coupant en position Ct de la région charnière :

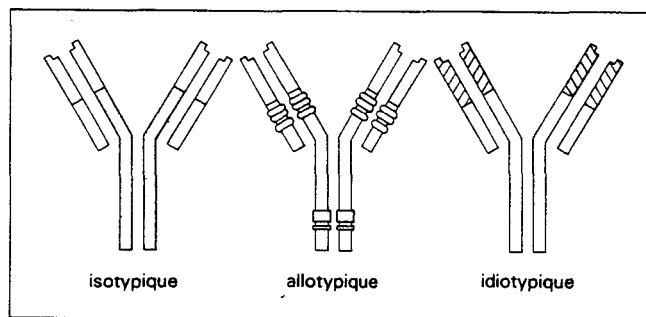


Figure 6 : Antigénicité des anticorps (en relation avec leur variabilité).

- 1 fragment $F(ab')_2$ bivalent qui, après réduction douce, donne 2 fragments Fab' contenant chacun un paratope;
- 2 fragments pFc' correspondant au domaine $C\gamma 3$ plus d'autres produits de dégradation mineurs.

B - STRUCTURES IMPLIQUÉES DANS LA LIAISON A L'ANTIGÈNE (DOMAINES VARIABLES DES CHAINES L ET H)

Comme n'importe quelle autre protéine, les anticorps eux-mêmes contiennent des déterminants antigéniques (Figure 6). Ces sites antigéniques se situent à des endroits distincts de la molécule et ils déterminent la spécificité propre à l'espèce (**isotypie**) qui concerne les domaines constants des chaînes lourdes, la spécificité propre à l'individu (**allotypie**) qui concerne le plus souvent des zones des domaines constants, et la spécificité propre à la protéine d'anticorps elle-même (**idiotypie**) qui apparaît dans les domaines variables.

L'idiotypie révèle que si, exceptionnellement, l'information codant pour une spécificité anticorps donnée est transmise de génération en génération dans des lignées d'animaux consanguins, la majorité du répertoire exprimé ne semble pas faire partie du patrimoine génétique d'une espèce donnée. De plus une analyse comparative des séquences d'acides aminés d'un grand nombre de régions V montre que la variabilité n'est pas répartie de façon homogène le long des 110 acides aminés qui constituent les domaines VL et VH. Trois niveaux de variabilité sont observables :

- 1 : zones hypervariables où la séquence diffère très largement d'une chaîne à l'autre. On sait maintenant que ces séquences sont impliquées directement dans la liaison à l'antigène;

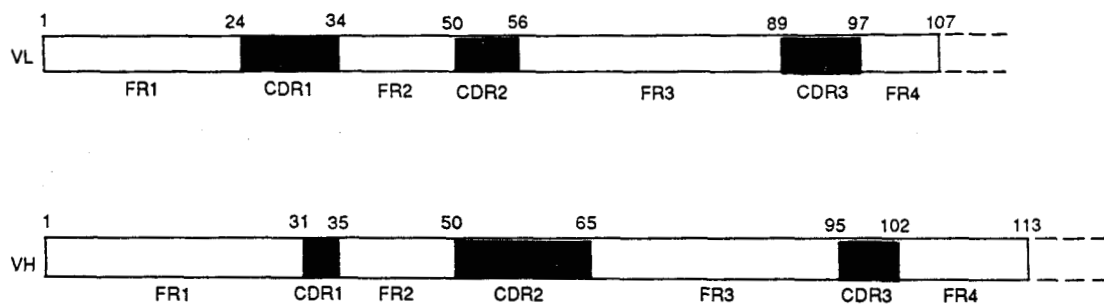


Figure 7 : Répartition des régions hypervariables (CDR) à l'intérieur des domaines variables des chaînes légères (VL) et des chaînes lourdes (VH) des anticorps.

- 2 : des zones, au contraire, très conservées où les mutations sont rares;
- 3 : des zones intermédiaires, hypovariables, présentant un certain "bruit de fond" de variabilité.

Le niveau 1 de la classification qui précède, correspond aux régions hypervariables aussi appelées **CDR** ("Complementary Determining Region"). Les niveaux 2 et 3 correspondent aux régions intermédiaires formant l'armature ou la charpente des domaines V. On les nomme **FR** ("Framework"). La comparaison d'un grand nombre de régions variables VL et VH permet d'établir une cartographie précise de la succession des régions CDR et FR, applicable à la fois chez l'homme et chez la souris (Figure 7).

On trouve ainsi 3 CDR (CDR1 à CDR3) et 4 FR (FR1 à FR4) dans les régions V des chaînes L et H. Le site de liaison à l'antigène est situé dans la partie N-terminale du Fab et il est composé des 6 régions hypervariables (CDR) des domaines VH et VL qui, une fois réunis, forment une surface hypervariable continue.

C - MODE DE RECONNAISSANCE (ANTIGENICITE) DES PROTEINES ET DES PEPTIDES

Les anticorps reconnaissent les antigènes généralement dans leur conformation native en solution ou présents sur les surfaces cellulaires.

La discussion portera sur la base structurale de l'antigénicité des protéines car ce sont les antigènes les plus divers et les plus abondants rencontrés par le système immunitaire. Comme nous l'avons déjà dit, les principes de base de la reconnaissance des protéines par les anticorps

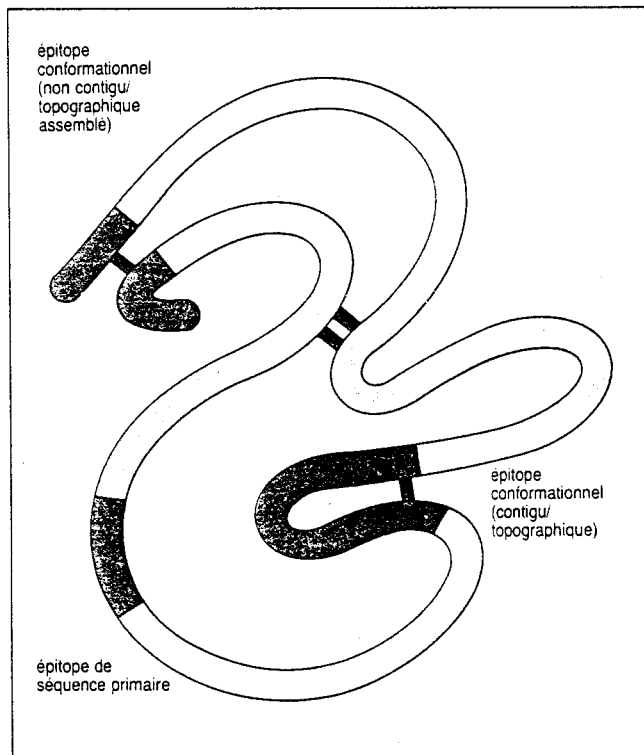


Figure 8 : Différents types d'épitopes sur les antigènes protéiques.

semblent pouvoir être également applicables à des antigènes de nature non protéique.

1 - Différents types d'épitopes

Tous les déterminants antigéniques (épitopes) reconnus par les anticorps sont situés à la surface de la protéine (à condition que les anticorps aient été obtenus chez des animaux immunisés avec la protéine native structurée). On définit généralement 2 classes d'épitopes :

(I) **épitopes conformationnels** nécessitant l'intégrité de la structure tertiaire de la protéine. On les appelle parfois épitopes "topographiques". Ils peuvent être **continus** s'ils correspondent à une région d'acides aminés contigus arrangés dans une conformation bien définie ou **non continus** s'ils correspondent à des régions non contiguës qui se retrouvent "côte à côte" quand la protéine est repliée dans sa conformation native, et il s'agit alors d'une juxtaposition spatiale de résidus non adjacents dans la structure primaire.

(II) **épitopes séquentiels** dépendant uniquement de la structure primaire de la protéine, que celle-ci soit native ou dénaturée. Ils sont nécessairement **continus** c'est à dire qu'ils ne correspondent pas à des régions séparées dans la protéine (Figure 8).

Les anticorps dirigés contre des épitopes séquentiels reconnaissent généralement très bien les peptides correspondants qui sont alors capables de les mimer. Les anticorps dirigés contre des épitopes conformationnels continus peuvent parfois se lier aux peptides correspondant mais seulement si ce dernier possède une structure secondaire (hélice α ou coude β , par exemple) suffisamment proche de cette partie de la protéine native. Les anticorps dirigés contre des épitopes conformationnels discontinus pourront parfois

reconnaitre le peptide correspondant à une des parties de l'épitope mais avec une affinité considérablement affaiblie du fait de la diminution du nombre de sites de liaison.

A l'aide d'un peptide, il est donc très facile de mimer un épitope séquentiel, un peu plus difficile de mimer un épitope conformationnel continu et quasiment impossible de mimer un épitope conformationnel discontinu bien qu'une équipe française soit parvenue à mimer un épitope conformationnel impliquant un segment de l' α -hCG et un segment de la β -hCG dans une structure quaternaire (BIDART J.M. et col., 1990.).

La distinction épitope conformationnel, épitope séquentiel, est quelque peu abusive mais elle a le mérite de simplifier la vision que l'on peut avoir des déterminants antigéniques. En réalité tous les épitopes sont conformationnels puisqu'ils nécessitent un arrangement spatial approprié des chaînes d'acides aminés pour interagir avec l'anticorps.

2 - Liaisons impliquées dans la reconnaissance antigène-anticorps

De nombreuses liaisons non covalentes participent à la liaison entre l'épitope et les acides aminés du paratope. Bien qu'elles soient énergétiquement faibles, comparées aux liaisons covalentes, leur grand nombre fournit néanmoins une énergie de liaison élevée. On compte quatre grandes classes de liaisons intermoléculaires impliquées dans la liaison entre l'épitope et le paratope (Figure 9).

a - Liaison hydrogène

Lorsque l'hydrogène est lié à un élément fortement électronégatif (dans le cas des protéines : O, N et éventuellement S) la liaison à cet élément est fortement polarisée et présente un moment dipolaire important, l'hydrogène constituant alors un centre positif δ^+ . D'autre part, les atomes N et O sont porteurs, respectivement de 1 et 2 doublets électroniques non-liants, constituant des centres négatifs δ^- . Les centres δ^+ d'une molécule et δ^- d'une autre peuvent donc s'approcher à très courte distance et les forces d'attraction devenir très grandes. Ces associations ayant toujours lieu par l'intermédiaire d'un atome d'hydrogène, on leur donne le nom de liaison hydrogène ou de **liaison par pont hydrogène**.

On sait que les doublets non-liants se localisent préférentiellement dans certaines directions de l'espace. Dans ces directions les interactions avec l'hydrogène δ^+ s'établissent plus facilement et plus fortement, de sorte que la liaison hydrogène n'est pas omnidirectionnelle mais dirigée (l'angle A-H-B ayant une valeur moyenne de 180° , avec une variation maximale de 30°).

La liaison hydrogène correspond à des énergies de 4 à 40 kJ/mol. De telles énergies d'interaction restent cependant encore faibles par rapport aux énergies des liaisons covalentes, qui se situent entre 200 et 800 kJ/mol. Un atome d'hydrogène demeure donc beaucoup plus fortement lié à sa molécule d'origine qu'à la molécule avec laquelle s'établit l'interaction.

En présence d'eau, les liaisons hydrogène mettant en jeu les molécules d'eau et les macromolécules entrent en compétition avec les liaisons hydrogène intermacromoléculaires. L'exclusion des molécules d'eau entre les

macromolécules accroît donc de façon importante l'énergie de liaison, en réduisant fortement la constante diélectrique portée par l'eau.

b - Liaison électrostatique ("ionique")

Au pH physiologique (environ pH 7,2) certains acides aminés sont chargés positivement et d'autres négativement selon qu'ils perdent ou gagnent un proton. Pour un pH donné, leur état d'ionisation est déterminé par la valeur de leur pH_i . Sous l'effet de forces de Coulomb, des liaisons intermoléculaires peuvent alors s'établir entre des groupements ionisés de charge opposée. Une charge + peut se rencontrer sur une Arg, une His, une Lys ou la fonction NH_2 -terminale et une charge - sur un Asp, un Glu ou la fonction $COOH$ -terminale.

Très fortes en l'absence d'eau (de l'ordre de 40 à 400 kJ/mol), les liaisons électrostatiques deviennent relativement faibles en milieu aqueux (de l'ordre de 4 à 40 kJ/mol) où des liaisons de type ion-dipôle avec les molécules d'eau tendent à les supplanter. Ceci est dû à la valeur élevée de la constante diélectrique de l'eau.

D'autre part, il faut garder à l'esprit qu'une charge ne peut exister isolée dans un milieu contenant des sels, mais qu'elle est toujours accompagnée d'un contre-ion qu'il sera nécessaire de déplacer, moyennant un apport énergétique, pour former une liaison électrostatique intermoléculaire.

Des réactions de transfert de charge entre l'anticorps et l'antigène créent également parfois des forces ressemblant aux forces électrostatiques.

c - Forces de VAN DER WAALS

Elles concernent trois formes d'interactions entre les macromolécules.

. **Interaction entre 2 dipôles permanents (forces de KEESOM)**. Il existe entre les molécules polaires des forces d'attraction électrostatiques, le pôle + de l'une attirant le pôle - de la voisine, et ainsi de proche en proche. Ces forces sont directement proportionnelles au moment dipolaire des liaisons portant les dipôles. Les énergies mises en jeu sont souvent comprises entre 0,02 et 3,5 kJ/mol.

. **Interaction entre 1 dipôle permanent et 1 dipôle induit (forces de DEBYE)**. Une molécule polaire crée autour d'elle un champ électrique et si une molécule non polaire vient dans son voisinage elle subit l'influence de ce champ. Il se crée une polarisation induite (qui disparaît quand les molécules s'éloignent) et il existe alors une force d'attraction entre les 2 dipôles, comme entre 2 dipôles permanents



dipôle induit dipôle permanent (inducteur).

L'importance de cet effet induit dépend de la grandeur du moment dipolaire de la molécule polaire (dipôle permanent), mais aussi de la polarisabilité de la molécule non polaire (dipôle induit). Les énergies mises en jeu sont de l'ordre de 3 kJ/mol.

. **Forces de dispersion (forces de LONDON)**. On peut considérer d'abord le cas d'un simple atome d'hydrogène. Son unique électron et son noyau forment à chaque instant un dipôle, dont l'orientation et le moment varient continuellement. Comme la probabilité de présence de l'électron est la même dans toutes les directions, en moyenne l'atome ne possède pas de moment

électrique permanent. Le raisonnement est identique pour un atome possédant plusieurs électrons ou pour une molécule non-polaire : l'absence de moment dipolaire résulte d'un effet de moyenne dans le temps. Mais, à un instant donné la distribution des charges dans l'espace est telle qu'il existe un dipôle non nul. Dans ces conditions, si 2 atomes viennent à proximité l'un de l'autre, le moment dipolaire instantané de l'un crée un moment dipolaire induit dans l'autre, et réciproquement. Il s'établit ainsi une sorte de concordance, ou de couplage, entre les mouvements de leurs électrons respectifs, qui diminue l'énergie résultant de l'interaction de ces deux atomes. Ce phénomène est général. Il constitue la seule forme d'interaction entre des molécules non polaires, mais dans le cas des molécules polaires, il se superpose aux forces de KEESOM et de DEBYE. Les forces de LONDON induisent des énergies de l'ordre de 30 kJ/mol. Elles constituent donc les plus importantes forces de VAN DER WAALS.

d - Liaison hydrophobe ("apolaire")

Les résidus apolaires hydrocarbonés ne sont pas solubles dans l'eau, principalement parce qu'ils sont incapables de former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. En conséquence, ces dernières s'ordonnent autour des résidus apolaires pour former, au niveau moléculaire, une interface comparable à l'interface liquide-gaz. L'augmentation de la structuration du solvant qui en résulte (par rapport aux molécules d'eau seules) conduit à un système plus ordonné que celui existant hors de la zone interactive et donc à une diminution de l'entropie. Quand les structures apolaires se rejoignent, elles excluent les molécules d'eau liées structurées entre elles. Comme l'eau déplacée ne fait plus partie de la zone interactive, il y a un retour à un système moins ordonné provoquant un gain d'entropie. Ce changement est suffisant pour diminuer l'énergie libre du système lié et pour le rendre plus

stable. Cela est équivalent à une liaison énergétique car il favorise l'association des structures hydrophobes. Naturellement, dès que les résidus hydrophobes sont à une distance suffisante, les forces de VAN DER WAALS (essentiellement les forces de LONDON) deviennent opérationnelles entre ces résidus. Une fois l'eau exclue et les résidus apolaires en contact, son retour dans la zone d'interaction apolaire est hautement défavorisé par la nécessité de franchir une barrière énergétique élevée.

Les liaisons hydrophobes se produisent entre les résidus non chargés des molécules interagissant et, en présence d'eau, les résidus, tels Ala, Ile, Leu, Met, Phe et Val, ont tendance à s'agréger pour former des structures stables.

Efin, il faut signaler que l'exclusion de l'"écran" constitué de molécules d'eau au voisinage des interactions hydrophobes favorise l'établissement de liaisons hydrogène et électrostatiques fortes.

CHOTHIA C. et JANIN J. en étudiant les principes de la reconnaissance protéine-protéine ont montré que les liaisons hydrophobes constituent le facteur principal de stabilisation des associations protéine-protéine (CHOTHIA C. et JANIN J., 1975.). Le problème est que les liaisons hydrophobes sont très peu spécifiques. Les liaisons hydrophobes contribuent grandement à la stabilité du complexe protéine-protéine, et la stricte complémentarité exigée pour la formation des liaisons hydrogène, des liaisons électrostatiques et l'établissement des forces de VAN DER WAALS assure la spécificité de la reconnaissance.

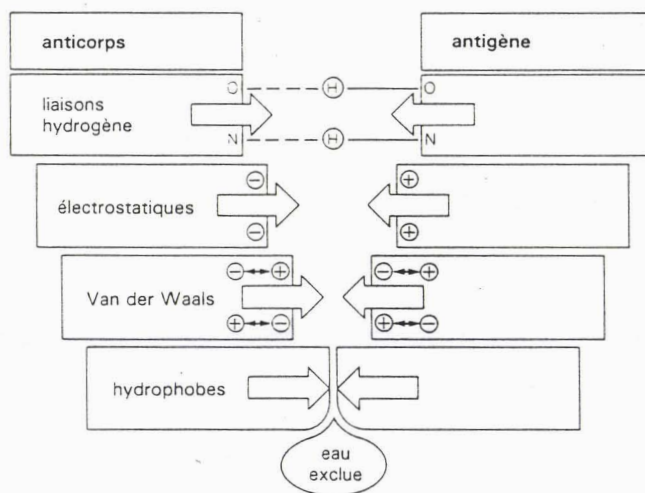


Figure 9 : Forces attractives intermoléculaires impliquées dans la liaison entre l'antigène et l'anticorps. Distances relatives d'interaction.

e - Distance d'interaction

La distance optimale entre les groupes interagissant varie avec le type de liaison et cette distance d est un facteur critique pour l'établissement de liaisons non covalentes (Figure 9).

Par exemple, la force de liaison décroît selon un facteur $1/d$ pour les liaisons électrostatiques ion-dipôle, $1/d^2$ pour les liaisons électrostatiques ion-ion et $1/d^6$ pour les forces de VAN DER WAALS où les entités sont virtuellement en contact. Pour être efficaces, ces forces exigent donc un contact étroit entre les différents groupes réactifs, bien que la distance optimale entre deux atomes varie suivant le type d'interaction : 0,3 à 0,4 nm pour une interaction de type VAN DER WAALS ou une distance plus importante pour les atomes porteurs de charges opposées dans une liaison électrostatique. Les forces mettant en jeu des atomes porteurs de charges opposées dans une liaison électrostatique agissent à une distance relativement élevée par rapport aux autres liaisons non covalentes. Aussi, les interactions non spécifiques entre un anticorps et d'autres macromolécules mettent souvent en cause des liaisons électrostatiques.

f - Complémentarité

Globalement, les forces intermoléculaires n'atteignent des valeurs significatives que si les 2 molécules sont en contact étroit, et d'autant plus que les molécules d'eau se trouvent exclues de la zone d'interaction.

Epitope et paratope doivent donc posséder des **structures complémentaires** capables de se combiner, c'est-à-dire :

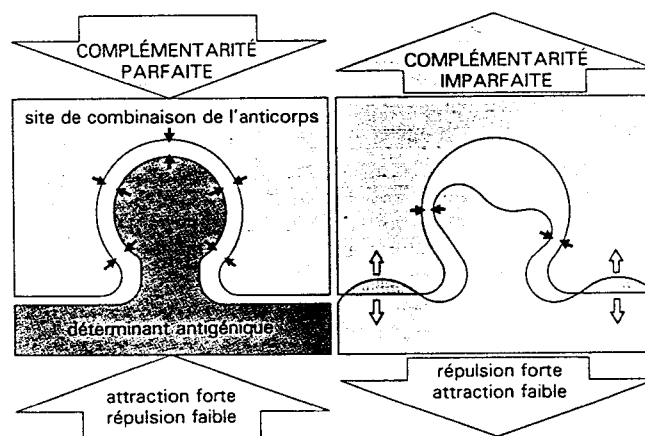


Figure 10 : Complémentarité parfaite ou imparfaite entre l'antigène et l'anticorps.

- la forme du paratope doit être la mieux adaptée possible à celle de l'épitope dont il est spécifique, afin que le plus grand nombre possible de liaisons non covalentes puissent se former simultanément;
- les groupements atomiques "agonistes" (susceptibles de former des liaisons non covalentes) doivent être bien positionnés sur l'épitope et le paratope et les groupements "antagonistes" doivent se trouver le plus loin possible les uns des autres.

Des structures complémentaires permettent l'association étroite des 2 molécules seulement si la distance intermoléculaire devient minime et donc si les forces dont nous venons de parler peuvent s'établir. Dans le cas d'une complémentarité parfaite, l'énergie de liaison est telle qu'elle peut quasiment interdire une rupture, du point de vue thermodynamique. Cependant, si les nuages électroniques de l'épitope et du paratope tendent à se rencontrer, des **forces stériques de répulsion**, proportionnelles à $1/d^{12}$ (d représentant la distance séparant les 2 nuages interactifs) entrent alors en jeu. Ces forces jouent un rôle important quant à la spécificité de l'anticorps pour un épitope donné et quant à sa capacité de reconnaître différents épitopes. En effet, toute modification de la structure complémentaire entraîne une augmentation des forces répulsives avec une diminution des forces attractives, donc globalement une baisse de l'énergie de liaison (Figure 10).

Enfin, l'énergie de liaison entre protéines provient de facteurs enthalpiques et entropiques. Les forces que nous avons décrites sont autant de contributions positives à l'établissement de la liaison antigène-anticorps. Mais la perte d'entropie, résultant de l'immobilisation des molécules ainsi que de leur squelette peptidique et de leurs chaînes latérales, constitue un

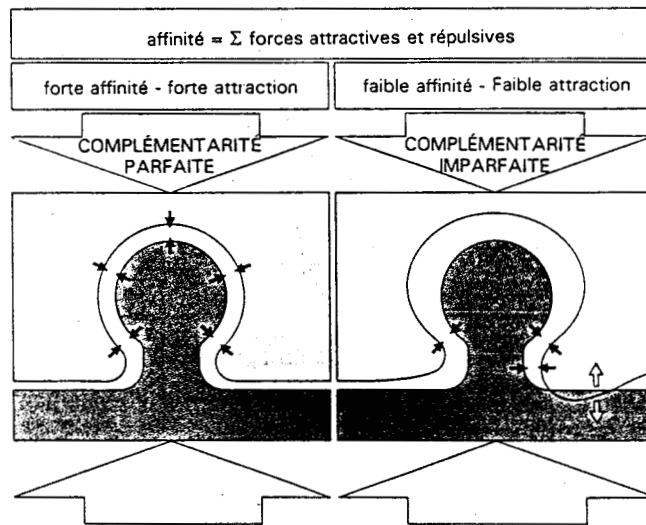


Figure 11 : Affinité de l'anticorps pour l'antigène.

effet négatif. Aussi cet effet doit être dominé par un facteur enthalpique plus important pour que la liaison antigène-anticorps puisse s'établir.

3 - Affinité

La force de liaison antigène-anticorps est globalement appelée **affinité** de l'anticorps pour l'antigène. Elle représente la résultante des forces attractives et répulsives décrites ci-dessus (Figure 11). Elle peut être mesurée thermodynamiquement et son calcul requiert l'utilisation d'un antigène monovalent (c'est-à-dire possédant plusieurs épitopes représentés une seule fois) ou d'un déterminant antigénique isolé.

Les liaisons non covalentes épitope-paratope sont dissociables et donc l'ensemble de la liaison entre un antigène et un anticorps est une réaction réversible. Dans ce cas, la loi d'action de masse peut être appliquée et la constante d'équilibre K déterminée. C'est la **constante d'affinité intrinsèque** de l'anticorps pour l'antigène (force avec laquelle un seul site anticorps se lie à un déterminant antigénique unique) :

$$K = [Ac-Ag]/[Ac] [Ag] \text{ (en l/mole).}$$

La liaison antigène-anticorps étant en équilibre, elle est sensible à la température, au pH et au solvant. Le changement de l'un de ces facteurs peut augmenter ou diminuer le nombre de complexes antigène-anticorps trouvé à l'équilibre (par modification de la constante d'affinité). La mesure de l'affinité renseigne sur la nature immunochimique de la réaction antigène-anticorps.

On sait aujourd'hui que l'univers des sites de reconnaissance des anticorps, bien que très vaste, est limité et qu'il est donc probablement plus

restreint que l'univers des antigènes. En fait, au sein de l'anticorps, chaque paratope peut potentiellement reconnaître plusieurs épitopes proches les uns des autres mais avec des affinités différentes. La reconnaissance de l'antigène par l'anticorps semble donc partiellement dégénérée mais, comme l'antigène est composé de plusieurs épitopes distincts et que la réponse immunitaire naturelle à un antigène est polyclonale (plusieurs spécificités sécrétées), celle-ci est suffisamment diversifiée pour être globalement spécifique vis à vis de l'antigène. Pourtant, la plupart des modifications liées à l'évolution dans une protéine antigénique semblent immunologiquement détectables.

4 - Structures radiocristallographiques de complexes antigène-anticorps

De nombreuses données structurales, chimiques et spatiales, concernant les anticorps sont apparues dans les années 1970. Elles ont permis de comprendre les variations structurales des anticorps mais on s'est longtemps demandé comment différents anticorps pouvaient reconnaître spécifiquement différents épitopes.

Depuis peu, nos connaissances sur la nature de l'interaction anticorps-protéine antigénique se sont considérablement améliorées grâce à la détermination, par plusieurs équipes, de la structure radiocristallographique de 6 complexes Fab monoclonal-protéine antigénique :

- 3 complexes Fab-lysozyme (du blanc d'oeuf de poule) (AMIT A. G. et col., 1986, MARIUZZA R.A. et col., 1987, SHERIFF S. et col., 1987 et PADLAN E.A. et col., 1989.);
- 1 complexe Fab-neuraminidase (du virus de la grippe) (COLMAN P.M. et col., 1987.)

(Revue de DAVIES D.R. et col., 1988 et LAVER W.G. et col., 1990.);

- 1 complexe Fab(anti-idiotope)-Fab(anti-lysozyme du blanc d'oeuf de poule) porteur de l'idiotope (BENTLEY G.A. et col., 1990.);
- 1 complexe Fv-lysozyme (du blanc d'oeuf de poule) (le fragment Fv, fragment variable, est composé exclusivement des domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère) (BHAT T.N. et col., 1990.).

De plus, très récemment, la première structure radiocristallographique d'un complexe Fab'-peptide a pu être déterminée avec une très bonne résolution (STANFIELD R.L. et col., 1990.).

Jusqu'à présent, seule la détermination de la structure de complexes antigène-anticorps cristallisés a permis la **définition** complète et exacte d'**épitopes**. Une nouvelle technique utilisant la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton à 2 dimensions a permis d'étudier l'antigénicité du cytochrome c de cheval. Ceci a été rendu possible en comparant la vitesse d'échange hydrogène-deutérium au niveau des résidus de la protéine antigénique en contact avec un anticorps monoclonal (immunoprotection de l'antigène par l'anticorps), avec la vitesse d'échange des résidus accessibles hors de l'épitope (PATERSON Y. et col., 1990.). Ce type d'étude complète les données sur l'antigénicité des protéines, apportées par les structures radiocristallographiques des complexes antigène-anticorps, tant au niveau de la surface de l'épitope que de sa nature fine.

Etant donné qu'on évalue à environ 10^8 à 10^9 le nombre des spécificités différentes dans le répertoire des anticorps et que seulement 5 complexes Fab-protéine, 1 complexe Fv-protéine et 1 complexe Fab'-peptide ont été étudiés, il est hasardeux de pousser très loin l'extrapolation à d'autres complexes antigène-anticorps. Néanmoins, comme la nature tend souvent à généraliser les

solutions apportées à un problème donné, plusieurs conclusions d'ordre global peuvent être envisagées à partir des informations existantes.

a - Présence en surface et conformations

Les trois anticorps (Fab) anti-lysozyme se lient en différentes positions de la protéine même s'il existe un petit recouvrement entre deux des trois épitopes. Les trois épitopes couvrent ensemble approximativement la moitié de la surface de la protéine. Chaque épitope est composé de résidus répartis sur plusieurs segments de la séquence protéique et réunis de façon contiguë à la **surface** (de manière accessible au solvant) après repliement de la chaîne protéique. Même si un de ces segments semble important (14 résidus), la plupart sont relativement courts. Il en va de même pour les segments discontinus composant l'épitope caractérisé à la surface de la neuraminidase.

Dans tous les cas, l'interaction s'étend sur une surface comprise entre 650 et 900 Angström carrés et concerne 15 à 22 résidus d'acides aminés de l'antigène et de l'anticorps, sans que l'on connaisse leur contribution respective exacte à l'énergie de liaison. Toutefois des calculs énergétiques effectués après modélisation moléculaire suggèrent que seul un petit nombre de résidus d'acides aminés (5 à 6) contribuent de façon importante à l'**énergie de liaison** (constituant en quelque sorte l'**"épitope énergétique"**), les autres résidus permettant simplement une bonne complémentarité des surfaces en contact (ils constitueraient l'**"épitope structural"**). Les résidus contribuant plus que les autres à la liaison ne sont pas disposés de manière continue dans la structure primaire de l'antigène mais il sont répartis sur toute la surface de l'épitope.

Globalement, l'antigénicité des épitopes est dépendante de la **conformation** des protéines antigéniques natives. Les 3 structures radio-cristallographiques anticorps (Fab)-lysozyme représentent une chance exceptionnelle d'examiner l'**antigénicité** d'un point de vue spatial puisqu'elles impliquent des épitopes qui couvrent, nous l'avons dit, au moins la moitié de la surface du lysozyme. D'abord il est clair qu'aucun des 3 anticorps ne se lie à un simple segment polypeptidique continu, mais ils sont tous dirigés contre des **épitopes conformationnels non continus**. Ainsi, comme nous l'avons dit plus haut, chaque anticorps anti-lysozyme se lie à plusieurs séquences peptidiques de longueur variable, continues et contiguës, constituant ensembles l'épitope après repliement de la protéine. Les tailles relatives du paratope et des segments continus à la surface du lysozyme sont telles qu'il est très improbable qu'il puisse y avoir des anticorps dirigés contre des épitopes formés d'un segment polypeptidique continu. BARLOW D.J. et col. sont allés plus loin : ils montrent que si la zone de reconnaissance entre une protéine et un anticorps a les mêmes dimensions que celle trouvée pour un complexe lysozyme-anticorps aucun épitope ne sera de type séquentiel et ils suggèrent l'idée que tous les épitopes sont de type conformationnel non continu (BARLOW D.J. et col., 1986.). Toutefois, ils montrent aussi que la plupart des résidus formant des régions continues se situent dans des boucles qui dépassent à la surface de la protéine. De telles séquences sont donc prévisibles et cela permet de disposer des meilleurs peptides antigéniques susceptibles d'induire des réactions croisées avec la protéine.

b - Mobilité et accessibilité

Du point de vue de la **mobilité**, on peut tirer assez peu de conclusions. Il y a des régions de haute mobilité qui font partie de l'épitope, mais il en va de même de régions de faible mobilité.

La corrélation avec les régions de haute **accessibilité** est bien meilleure même s'il y a, ici aussi, quelques résidus faiblement accessibles qui forment des contacts avec l'anticorps. Bien que ces données soient encore limitées, elles confirment l'idée de BENJAMIN D.C. et col., selon laquelle toutes les régions accessibles sont potentiellement antigéniques (BENJAMIN D.C. et col., 1984). En effet, étant donné que les 3 complexes anticorps-lysozyme cristallisés couvrent approximativement la moitié de la surface du lysozyme, il semble très probable qu'avec suffisamment d'anticorps, toute la surface accessible du lysozyme puisse être démontrée antigénique.

c - Complémentarité

Dans tous les cas, les résidus de l'anticorps en contact avec l'épitope sont situés au sein des 6 CDR, bien que certains CDR aient plus de résidus liés à l'épitope que d'autres. En plus des CDR, il y a parfois certains résidus de FR impliqués dans la liaison.

Un des aspects les plus frappants de l'analyse des complexes antigène-anticorps est la forte **complémentarité** entre les 2 surfaces interagissant. Ceci est démontré par l'exclusion quasi complète des molécules d'eau de l'interface et cela implique que toutes les cavités existantes entre les 2 surfaces sont trop petites pour inclure ne serait-ce qu'une molécule d'eau. Cette complémentarité est réalisée bien que la surface de l'anticorps au niveau du site de liaison soit très irrégulière avec des saillies et des vallées formées par les chaînes latérales d'acides aminés.

d - Liaisons observées

Rares sont les résidus chargés au sein de la zone complémentaire dans l'épitope ou le paratope. Quand il sont impliqués dans la liaison, c'est par l'intermédiaire d'une neutralisation de charge pour former une **liaison ionique**. Une seule liaison ionique semble avoir une grande influence sur l'affinité d'un des complexes anticorps-lysozyme par rapport à un autre. Ainsi, avec une surface de contact égale, l'anticorps formant une liaison ionique possède une constante d'affinité 1000 fois supérieure. Les résidus chargés observés en bordure de la surface de contact de l'antigène et de l'anticorps sont plus nombreux mais ils n'interagissent pas avec un résidu possédant une charge complémentaire. Dans ce cas, l'eau peut jouer un rôle très important dans la dissipation de la charge, la formation de ponts salins n'étant pas nécessaire. Il existe toutefois une exception dans le cas d'un des épitopes du lysozyme, où l'on trouve en bordure de la zone complémentaire, une liaison ionique entre un résidu chargé positivement et un résidu du paratope chargé négativement, mais la liaison est faible car la distance entre les résidus est de 3,6 Angström.

Les **liaisons hydrogène** qui se forment à l'interface jouent également un rôle clef dans la spécificité de l'interaction entre l'anticorps et l'antigène. Il semble que les liaisons hydrogènes entre groupements donneurs et accepteurs potentiels à l'interface ne soient pas toutes formées, même si la résolution des données de diffraction des rayons X est probablement insuffisante pour établir avec certitude le système complet des liaisons hydrogène des complexes. Néanmoins on évalue entre 75 et 120 (selon le complexe) le nombre de liaisons hydrogène formées entre l'anticorps et l'antigène.

Plus faciles à visualiser, les **liaisons hydrophobes** sont également présentes à l'interface antigène-anticorps. Dans son analyse des 3 Fab anti-lysozyme, PADLAN E.A. a remarqué la présence de nombreux résidus aromatiques parmi les résidus intervenant dans la liaison, particulièrement des résidus de tyrosines (PADLAN E.A., 1990.). Il a également remarqué, de façon plus surprenante, l'absence de résidus aliphatiques non polaires. Les résidus aromatiques peuvent contribuer grandement à l'énergie de liaison. En effet, ils présentent de grandes surfaces d'interaction et ils peuvent être le site de phénomènes de transfert de charges ou de liaisons hydrogène par l'intermédiaire des groupements polaires qu'ils peuvent porter.

e - Changements conformationnels : 2 modèles envisagés

Différents degrés de **changements conformationnels** sont observés dans les structures antigène-anticorps déterminées. Mais, comme dans aucun cas la structure de l'anticorps non complexé n'a pu être déterminée, les conclusions sont, en majeure partie, apportées par les changements opérés dans l'antigène.

En ce qui concerne, par exemple, les complexes anticorps(Fab)-lysozyme, AMIT A.G. et col. n'observent pas de changement du squelette peptidique de l'antigène lors de la complexation avec le Fab, même si certaines chaînes latérales se réarrangent légèrement (AMIT A.G. et col., 1986.). Pour les 2 autres complexes il y a des changements faibles mais significatifs dans la structure tertiaire du lysozyme, de même que dans le complexe anticorps(Fv)-lysozyme. Dans le cas de la neuraminidase, COLMAN P.M. et col. mettent clairement en évidence que des changements conformationnels peuvent être induits dans l'antigène par l'anticorps (COLMAN P.M. et col., 1987.).

Au niveau de l'anticorps, des changements se produisent très probablement, mais ils n'ont pas pu être directement observés. Le site de liaison de l'anticorps est certainement plus sujet aux changements conformationnels qu'une protéine aussi rigide et compacte que le lysozyme. En effet, les 2 domaines variables VH et VL qui composent le paratope de l'anticorps sont reliés par des forces non covalentes. D'autre part, des changements peuvent se produire dans l'anticorps grâce aux mouvements des boucles hypervariables par rapport à la partie charpente du domaine structural.

Il est donc clairement établi qu'un des complexes anticorps(Fab)-lysozyme peut être rangé dans le modèle "clef-serrure" où il n'y a pas de changement conformationnel lors de la liaison du fait de la bonne complémentarité des 2 surfaces avant leur interaction. Par contre, les 2 autres complexes anticorps(Fab)-lysozyme, le complexe anticorps(Fv)-lysozyme et le complexe anticorps-neuraminidase incompatibles avec le modèle précédent, font plutôt appel au modèle d'"adaptation induite localisée" où l'on observe de légers changements conformationnels des squelettes peptidiques et de certaines chaînes latérales lors de la liaison. Ces changements ne pourront être observés que si la dépense d'énergie libre résultant de l'amélioration de la complémentarité des deux molécules est supérieure au gain d'énergie libre survenant lors de la distorsion de chaque protéine quittant son état natif ou, du moins, un état correspondant à une conformation faiblement énergétique. Toutefois, les changements conformationnels opérés n'impliquent très certainement que de faibles énergies afin de ne pas trop coûter à l'affinité de la liaison antigène-anticorps. Dans un tel modèle, les **variations spatiales de l'arrangement V_H-V_L** ajoutent une nouvelle dimension à la diversité des anticorps autorisant une molécule d'anticorps à reconnaître un spectre d'épitopes. Ce potentiel pourrait expliquer comment des anticorps

anti-peptide dérivé d'une protéine peuvent reconnaître la protéine native ou, comme le pensent COLMAN P.M. et col., pourquoi certains anticorps réagissent de façon croisée avec des antigènes non reliés à l'immunogène ayant servi à leur production (COLMAN P.M. et col., 1987.).

f - Interaction peptide-anticorps

Dans leur détermination structurale radiocristallographique de la liaison peptide-Fab' (anti-peptide), STANFIELD R.L. et col. trouvent des résultats similaires à ceux obtenus lors de l'étude des interactions protéine-anticorps : taille des surfaces en contact, nature des liaisons impliquées, modifications négligeables de la conformation de l'anticorps lors de la liaison malgré quelques petits réarrangements du squelette peptidique et de certaines chaînes latérales (STANFIELD R.L. et col., 1990.).

Par contre, d'importantes modifications structurales semblent apportées au peptide (contenant 19 résidus) lors de sa liaison à l'anticorps. Alors qu'en solution la moitié N-terminale du peptide ne semble pas adopter de conformation particulière, elle se présente sous la forme d'une hélice α dans la protéine native et sous celle d'un coude β quand elle est en contact avec le paratope du Fab'. Il apparaît donc que la conformation du peptide lié au Fab' est incompatible avec la liaison du Fab' à la protéine native, surtout quand on sait que les modifications opérées dans le Fab' lors de la liaison sont tout à fait mineures. En conséquence, la liaison observée n'a pu se produire qu'avec des formes conformationnellement altérées de la protéine ou avec l'apo-protéine. Ces formes protéiques associées au Fab' n'ayant pas pu être cristallisées, il reste à déterminer précisément comment un anticorps peut se lier à la même séquence au sein d'un peptide et d'une protéine.

III - RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DES CELLULES T (RECEPTEUR T)

Mise à part la production d'anticorps, la réponse immunitaire peut se traduire par le développement de lymphocytes T immuns porteurs de récepteurs spécifiques pour l'antigène. C'est l'**immunité à médiation cellulaire**. Bien que les récepteurs pour l'antigène, présents sur les cellules T et sur les cellules B présentent des points communs, la reconnaissance de l'antigène par les cellules T diffère considérablement de l'interaction épitope-paratope de l'anticorps telle que nous l'avons exposée.

A - CELLULES PRESENTATRICES DE L'ANTIGENE

Comme les cellules B, les cellules T reconnaissent l'antigène grâce à un récepteur de surface mais, contrairement aux cellules B, elles ne le reconnaissent pas isolément sous sa forme native en solution. Pour être activées les cellules T ont besoin d'une population de cellules accessoires : les cellules T ne reconnaissent l'antigène qu'en association avec des molécules du "soi", les molécules du **complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)**.

En règle générale, les **cellules T auxiliaires** reconnaissent l'antigène associé à des molécules de **classe II du CMH**. Les molécules de classe II du CMH sont présentes sur un nombre restreint de types cellulaires, rendant ces dernières capables de présenter l'antigène. C'est pourquoi on les appelle **cellules présentatrices de l'antigène (CPA)**. Quant aux **cellules T cytotoxiques**, elles reconnaissent l'antigène en association à des molécules de **classe I de CMH**. La différence fonctionnelle majeure entre les molécules du CMH de classe I et de classe II se reflète dans leur

distribution tissulaire : les molécules de classe I du CMH s'expriment à la surface de toutes les cellules nucléées. Dans ce contexte, les cellules reconnues (cellules cibles) par les cellules T cytotoxiques peuvent être, soit des cellules du "soi" infectées par un virus ou un parasite intracellulaire, soit des cellules greffées exprimant des molécules du CMH étrangères à l'organisme. Le mode de reconnaissance de l'antigène par les **cellules T suppressives** est moins bien connu. Il semble qu'elles puissent reconnaître l'antigène associé au CMH ou, tout simplement, l'antigène seul.

1 - Présentation aux cellules T des déterminants antigéniques portés par les molécules de classe II du CMH

Dans ce cas, l'**antigène** est d'origine **exogène** et, à l'exception des cellules B spécifiques de l'antigène, la liaison des antigènes solubles aux CPA se produit par l'intermédiaire d'interactions non spécifiques, non covalentes, avec des structures jusqu'à présent mal caractérisées, à la surface cellulaire. Le degré de fixation non spécifique semble proportionnel à la taille et à la concentration de l'antigène.

Après la fixation de l'antigène sur la CPA, une courte période de temps est observée, durant laquelle la cellule phagocyte l'antigène protéique (l'endocyte quand il s'agit d'une cellule B), le digère et l'exprime à sa surface sous forme de peptides associés aux molécules de classe II du CMH, reconnus par les cellules T. Une étape de **digestion enzymatique** ("**processing**") est nécessaire car l'antigène protéique ne peut pas se fixer dans le site spécifique situé au sommet de la molécule de CMH (Voir chapitre suivant : B). Cette digestion fait essentiellement appel à des phénomènes de protéolyse au sein des lysosomes dont l'acidité provoque la dénaturation de l'antigène protéique, facilitant par là sa dégradation enzymatique. Il est

bien évident que le catabolisme de l'antigène doit être partiel, de façon à ce que les fragments formés soient recyclés à la surface de la CPA avant d'être complètement dégradés : une protéolyse rapide et extensive pouvant rendre compte, en partie, de la pauvre immunogénicité de certains antigènes. D'autre part, il est très probable que les antigènes soient relativement hétérogènes en ce qui concerne leur susceptibilité aux enzymes et on peut s'attendre à ce que différentes enzymes produisent différents fragments antigéniques. Ceci a été vérifié dans une étude de DEMOTZ S. et col. décrivant l'isolement des peptides antigéniques provenant d'une dégradation et associés à une molécule de classe II du CMH : ils sont hétérogènes, de différentes longueurs et se superposent (DEMOTZ S. et col., 1989.). La possibilité que de tels fragments antigéniques soient reconnus par les cellules T dépendra tout d'abord de leur capacité à s'associer correctement à des molécules du CMH, mais aussi du répertoire des récepteurs de l'antigène à la surface des cellules T, dont nous parlerons plus loin.

Le niveau d'activation d'une cellule T donnée dépendra de l'affinité de son récepteur pour le ligand complexe composé par le peptide antigénique associé à la molécule de classe II du CMH. Il est fort probable que cette activation dépende également de la concentration du ligand complexe à la surface de la CPA. De plus, l'activation de nombreuses cellules T nécessite des facteurs additionnels apportés par la CPA :

- molécules à la surface de la CPA permettant une stabilisation de l'interaction spécifique. On pense principalement à la molécule de classe II du CMH, dont certaines régions hautement conservées interagissent avec une molécule CD4 présente à proximité du récepteur T sur le lymphocyte (ses molécules constituent les protéines d'adhésion intercellulaire qui stabilisent l'interaction spécifique);
- interleukine 1.

Il existe plusieurs types de CPA exprimant des molécules de classe II du CMH : macrophages, cellules B spécifiques de l'antigène (capables de capter spécifiquement l'antigène par leurs immunoglobulines de surface, puis de l'endocyter) ou non spécifiques de l'antigène (schéma de présentation identique aux autres CPA), cellules dendritiques, cellules de Langerhans (cellules de la peau), cellules hépatiques de Kupffer, astrocytes du cerveau, cellules "Natural Killers", cellules endothéliales, chondrocytes articulaires, cellules de l'épithélium thyroïdien et fibroblastes du derme.

2 - Présentation aux cellules T des déterminants antigéniques portés par les molécules de classe I du CMH

Les mécanismes de présentation des déterminants antigéniques aux cellules T restreintes par les molécules de classe I du CMH commencent à être bien connus. Il apparaît que l'antigène est d'origine **endogène**. L'antigène doit donc être synthétisé "de novo" dans la cellule cible infectée qui fait alors office de cellule présentatrice.

Les antigènes synthétisés "de novo" semblent nécessiter une digestion enzymatique (pour les mêmes raisons que celles exposées à propos des CPA) mais cette fois dans le cytoplasme. Cette digestion est donc certainement différente de celle réalisée dans les CPA (machinerie enzymatique différente), car située dans un compartiment cellulaire différent. Les peptides formés sont transportés dans un compartiment pré-golgien et interagissent avec la chaîne lourde de la molécule de classe I du CMH, permettant ainsi son repliement correct et son association à la β 2-microglobuline. Le complexe est alors transporté à la surface cellulaire.

Comme pour les CPA, la formation d'une association stable entre l'antigène et la molécule de classe I à la surface de la cellule cible est probablement le facteur le plus important dans la reconnaissance par les cellules T. Ce processus permet au système immunitaire, par le biais des lymphocytes T cytotoxiques, de détecter et d'éliminer un agent infectieux "dissimulé" à l'intérieur de la cellule qu'il infecte.

Des travaux très récents, effectués par deux équipes différentes, montrent qu'une cellule qui n'exprime qu'un haplotype du CMH et qui est infectée par un virus ne présente qu'un seul peptide antigénique naturel associé au CMH, et que ce peptide a toujours la même longueur (8 acides aminés dans un cas et 9 dans l'autre) sur toutes les molécules du CMH de la cellule (VAN BLEEK G.M. et NATHENSON S.G., 1990 et ROTZSCHKE O. et col., 1990.). En outre, il semble que le peptide produit par le traitement intracellulaire de l'antigène est influencé par les molécules de classe I du CMH exprimées par la cellule cible. Une explication possible de ces phénomènes est que la dégradation de l'antigène dans un système de classe I du CMH utilise un ensemble de protéases plus spécifiques (un seul peptide antigénique présenté) qui coupent la protéine antigénique étrangère de façon plus sélective (le peptide antigénique a toujours la même longueur) que celle utilisée dans un système de classe II du CMH. Alternativement, les molécules de classe I du CMH protégeraient le fragment peptidique d'une dégradation totale pendant le transit cellulaire jusqu'à la surface.

Ici aussi, des molécules à la surface de la cellule infectée permettent une stabilisation de l'interaction spécifique. Il s'agit, entre autres, de la molécule de classe I du CMH, dont certaines régions hautement conservées interagissent avec une molécule CD8 à proximité du récepteur T sur le lymphocyte.

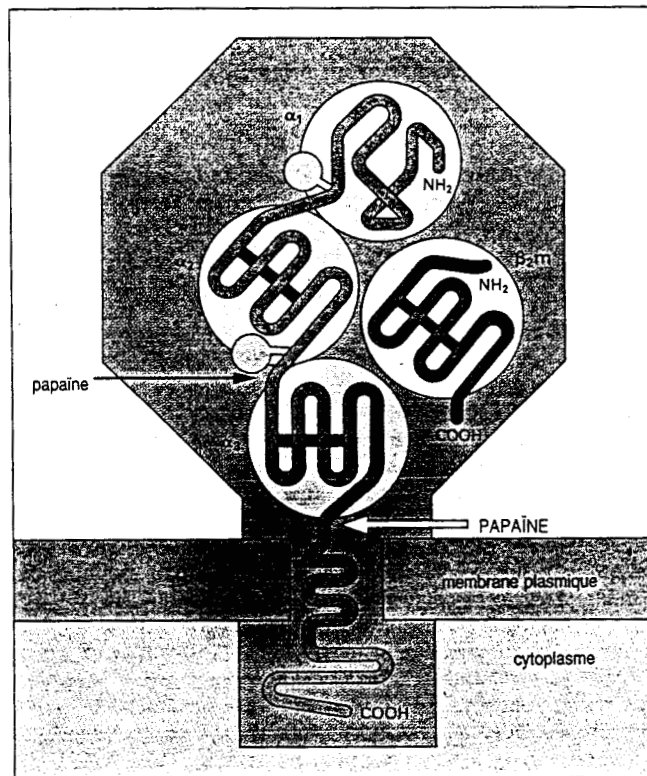


Figure 12 : Structure schématique des molécules de classe I du CMH.

B - STRUCTURE DES MOLECULES DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE (CMH)

Bien que le CMH ait d'abord été identifié par son implication dans les phénomènes de rejet de greffes, ce n'est pas là son rôle physiologique principal. La véritable fonction du CMH réside dans le processus de reconnaissance de l'antigène par les cellules T.

1 - Molécules de classe I du CMH

a - Structure globale des molécules de classe I

Il existe au moins trois locus du CMH de classe I, appelés H-2K, H-2D et H-2L chez la souris, et HLA-A, HLA-B et HLA-C chez l'homme.

Les molécules de classe I du CMH comprennent une chaîne polypeptidique glycosylée de 44 kDa (chaîne lourde) associée de façon non covalente à la β_2 -microglobuline (β_2m) qui est un polypeptide de 12 kDa (chaîne légère) (Figure 12).

Les analyse de séquence des chaînes lourdes chez l'homme et la souris ont montré l'existence de cinq domaines :

- trois domaines extracellulaires, α_1 (domaine N-terminal), α_2 et α_3 ;
- une région transmembranaire;
- une domaine intracytoplasmique.

Les trois domaines α_1 , α_2 et α_3 comportent environ 90 résidus d'acides aminés chacun et ressemblent aux domaines des anticorps. Les domaines α_2 et α_3 forment des ponts disulfures intramoléculaires, permettant la formation de

boucles comprenant respectivement 63 et 83 acides aminés. De plus, le domaine $\alpha 3$ semble se replier comme une région constante d'immunoglobuline avec laquelle il présente une homologie de séquence. Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont polymorphes et ils ne présentent pas d'homologie particulière avec les domaines constants ou variables des immunoglobulines. Par contre ces deux domaines présentent une légère homologie l'un envers l'autre.

La $\beta 2$ -microglobuline, chaîne légère des molécules de classe I, comporte deux cystéines reliées par un pont disulfure, formant un domaine identique à ceux des immunoglobulines. Qui plus est, elle présente une forte homologie avec les régions constantes des immunoglobulines. On pense qu'elle s'associe avec la chaîne lourde de classe I, principalement au niveau de son troisième domaine ($\alpha 3$), et d'une manière identique à celle observée entre les domaines d'immunoglobuline. La fonction de la $\beta 2m$ semble être de stabiliser les molécules de classe I. Elle pourrait peut-être aussi intervenir dans le transport des chaînes lourdes vers la membrane.

b - Structure radiocristallographique d'une molécule de classe I du CMH : site de liaison à l'antigène

Un fragment soluble de la molécule HLA-A2 a pu être cristallisé et analysé par diffraction des rayons X avec une précision de 3,5 Angströms (BJORKMAN P.J. et col., 1987a.). Ce fragment, obtenu après coupure par la papaine de l'ancrage transmembranaire de la chaîne lourde, contient les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 2m$. La molécule HLA-A2 est composée de deux paires de domaines similaires du point de vue de la structure tertiaire. Il se confirme donc que les domaines $\alpha 3$ et $\beta 2m$ ont des structures tertiaires similaires et comparables à celles des domaines des anticorps, mais qu'ils sont liés par une

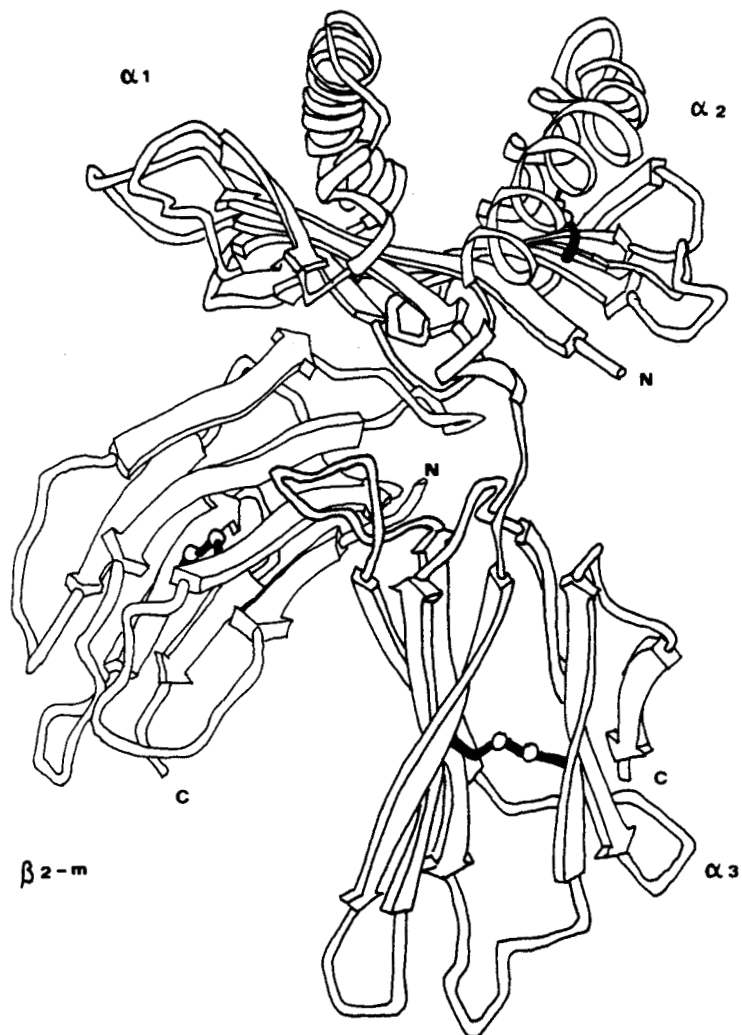


Figure 13 : Structure spatiale de la molécule de classe I, HLA A2, du CMH (d'après sa structure radiocristallographique). On peut distinguer les 3 domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de la chaîne lourde ainsi que la β_2 microglobuline ($\beta 2$ -m).

interaction non décelée auparavant dans les structures d'immunoglobulines (Figure 13).

Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont également l'un et l'autre très similaires, mais pas du tout comparables aux domaines constants ou variables des immunoglobulines. Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment une plate-forme composée de huit feuillets plissés β anti-parallèles (quatre de chaque domaine) surmontée par deux hélices α symétriquement disposées (un de chaque domaine). Ils forment ainsi un **sillon**, d'une longueur de 25 Angströms, d'une largeur de 10 Angströms et d'une profondeur de 11 Angströms, situé entre les deux hélices, et dont le fond est composé par les huit feuillets plissés. Les parois du sillon sont formées des chaînes latérales des deux hélices et le fond, des chaînes latérales des feuillets plissés centraux. Ce sillon est situé au sommet (par rapport à la base en contact avec la surface cellulaire) et à la surface de la molécule de classe I (Figure 14).

Dans un article associé, BJORKMAN P.J. et col. montrent que la plupart des acides aminés polymorphes de la molécule de classe I qui sont impliqués dans l'interaction (non covalente) de l'antigène avec cette molécule sont situés sur les parois internes (hélices) ou le fond (feuillets plissés) du sillon. Les parois externes (hélices) du sillon pourraient intervenir préférentiellement dans l'interaction (non covalente) de cette molécule avec le récepteur à la surface des cellules T (BJORKMAN P.J. et col., 1987b.). Ces éléments sont fortement en faveur d'une théorie selon laquelle le sillon constituerait le site de liaison (non covalente) de l'antigène sur la molécule de classe I CMH, et cet ensemble serait reconnu par le récepteur à la surface des cellules T. En diffractant les cristaux de la molécule HLA-A2, ces auteurs ont remarqué dans ce site (entre les deux hélices) une densité électronique ne

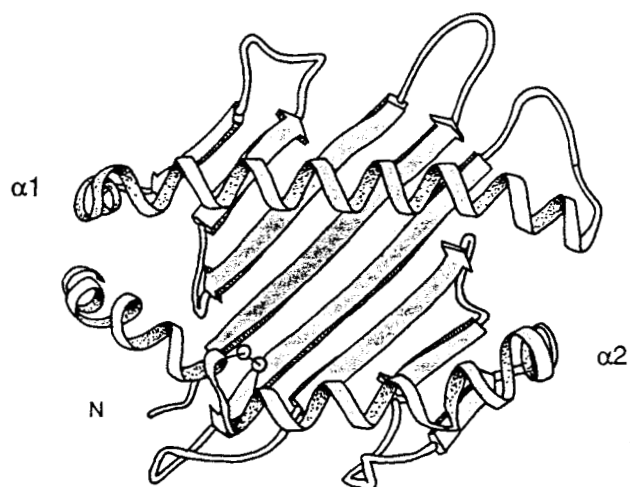


Figure 14 : Vue de dessus du sillon au sommet de la molécule de classe I, HLA A2, du CMH. Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ délimitent le sillon en apportant chacun, 1 hélice α et 4 feuillets plissés β .

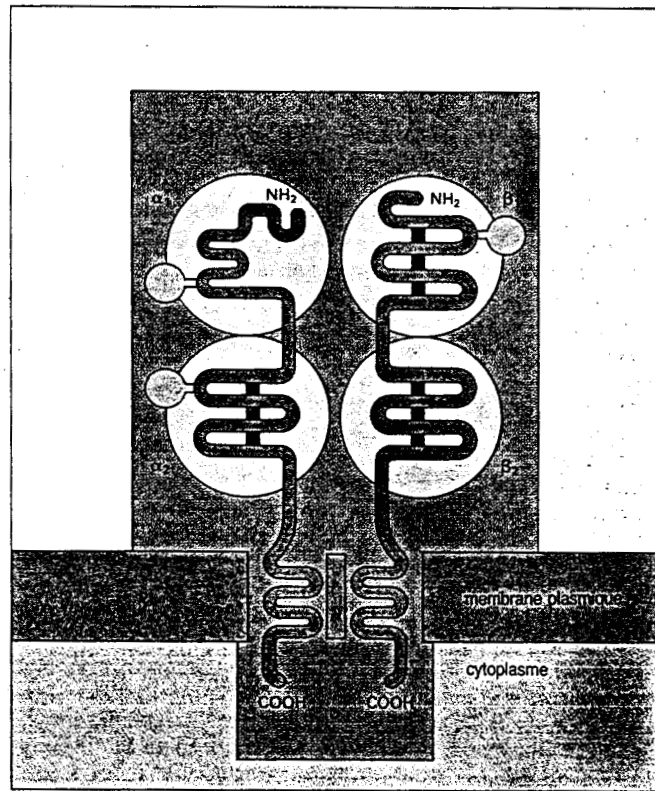


Figure 15 : Structure schématique des molécules de classe II du CMH.

faisant pas partie de la molécule. Il est très probable qu'il s'agisse là d'un peptide antigénique co-purifié et co-cristallisé avec la molécule de classe I. Si cela était le cas, le complexe formé devait être particulièrement stable. Un peptide de huit résidus (étendu sans conformation particulière ou dans une conformation plissée- β stabilisée par son interaction avec le CMH) ou de 20 résidus (hélice α) aurait tout à fait la place de se loger dans le sillon. L'une des extrémités du sillon semble ouverte et pourrait permettre à un peptide antigénique long (plus de 20 résidus) de s'étendre dans cette direction. L'autre extrémité contient quatre résidus hautement conservés qui semblent fermer le sillon (Figure 14).

2 - Molécules de classe II du CMH

a - Structure globale des molécules de classe II

Il existe au moins deux locus du CMH de classe II chez la souris (I-A et I-E) et trois chez l'homme (DP, DQ et DR).

Les molécules de classe II du CMH sont des hétérodimères glycoprotéiques comprenant une chaîne lourde (α) et une chaîne légère (β). La chaîne α a une masse moléculaire variant de 30 à 34 kDa et la chaîne β de 26 à 29 kDa, en fonction du locus d'origine. Chaque chaîne comporte 4 domaines (Figure 15):

- deux domaines extracellulaires d'environ 90 acides aminés chacun ($\alpha 1$ et $\alpha 2$, ou $\beta 1$ et $\beta 2$);
- une région transmembranaire d'environ 30 résidus;
- un court domaine intracytoplasmique.

Les deux domaines N-terminaux $\alpha 1$ et $\beta 1$, ne présentent aucune homologie de séquence avec les immunoglobulines (comme les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des molécules

de classe I), tandis que les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$, comme les domaines $\alpha 3$ et $\beta 2$ des molécules de classe I, ont les caractéristiques d'un domaine d'immunoglobuline. Le domaine $\beta 1$ possède deux résidus de cystéines aux positions 15 et 79, liés par un pont disulfure formant une boucle de 64 acides aminés. Le domaine $\alpha 1$ ne peut pas former de ponts disulfure car il ne contient pas de cystéine. Les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$ ont des ponts disulfure formant des boucles de 56 acides aminés.

Les molécules de classe II du CMH sont associées à une chaîne de 31 kDa, la chaîne invariante appelée Ii (JONES P.P. et col., 1979.). Les 2 chaînes α et β sont complexées à la chaîne Ii durant leur biosynthèse avant de former l'hétérodimère $\alpha\beta$ (KVIST S. et col., 1982.). Cette association persiste pendant tout le transit intracellulaire. Il a été proposé que la chaîne Ii empêche l'association des molécules de classe II avec des peptides d'origine endogène, en occupant le site de liaison à l'antigène (ROCHE P.A. et CRESSWELL P., 1990 et TEYTON L. et col., 1990.).

b - Modélisation de la structure spatiale du site de liaison à l'antigène des molécules de classe II de CMH

Les molécules de classe I et II du CMH ont des activités comparables puisqu'elles permettent aux cellules T de reconnaître les antigènes polypeptidiques "digérés", par l'intermédiaire du même récepteur de surface. Toutes deux présentent une structure en domaines similaire, et leur organisation génétique est comparable. Leurs domaines N-terminaux ($\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans les molécules de classe I et $\alpha 1$ et $\beta 1$ dans les molécules de classe II) sont hautement polymorphes et semblent responsables de la liaison aux peptides antigéniques au sein d'un site unique et, en partie, de la reconnaissance par le récepteur des cellules T. Il existe des peptides capables de se fixer

indifféremment sur les molécules de classe I et de classe II du CMH et capables d'induire ainsi des réponses T restreintes séparément par les 2 classes du CMH. Un des domaines N-terminaux des molécules de classe II présente une légère homologie avec les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des molécules de classe I.

La structure radiocristallographique des molécules de classe II du CMH n'est pas connue. Aussi, compte tenu des éléments que nous venons de rapporter, le site de liaison aux peptides antigéniques de ces molécules été modélisé (BROWN J.H. et col., 1988.), à partir des résultats obtenus lors de l'analyse de la structure radiocristallographique d'une molécule de classe I de CMH (BJORKMAN P.J. et col., 1987a.). Ce travail a également nécessité la comparaison des zones comprenant des résidus conservés ou polymorphes parmi 26 molécules de classe I et 54 molécules de classe II.

Le modèle fabriqué fait apparaître, comme dans la molécule de classe I, un sillon délimité par les deux hélices α C-terminales des deux domaines polymorphes $\alpha 1$ et $\beta 1$, dont le fond est formé de feuillets plissés β N-terminaux de chaque domaine. Il est donc possible de se figurer le site de liaison aux peptides antigéniques des molécules de classe II comme on l'a fait pour celui des molécules de classe I. Les considérations spatiales (taille des peptides antigéniques, etc.) que nous avons envisagées dans un cas semblent également valables dans l'autre cas.

C - STRUCTURE DU RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DES CELLULES T
(RECEPTEUR T)

Nous avons vu que les cellules B utilisent des immunoglobulines (anticorps) à leur surface comme récepteur spécifique de l'antigène (récepteur B). Les cellules T utilisent un récepteur différent (récepteur T) qui a été extrêmement difficile à mettre en évidence et qui n'a été identifié avec certitude que depuis quelques années. Ce récepteur est le même à la surface des cellules T auxiliaires et T cytotoxiques.

La reconnaissance de l'antigène par les récepteurs B et T est très différente. Dans le cas des antigènes protéiques, le récepteur B reconnaît en général, des structures tertiaires natives en solution, alors que le récepteur T reconnaît des structures primaires issues de la dégradation de l'antigène, associées aux molécules du CMH à la surface des cellules présentatrices de l'antigène. Néanmoins, il existe quelques similitudes entre les deux types de récepteurs :

- tous deux peuvent reconnaître une grande variété d'antigènes;
- dans les deux populations cellulaires qui les produisent, chaque cellule individuelle exprime un récepteur et un seul, spécifique d'un antigène;
- on retrouve des similarités de structures génomique et protéiques entre les deux récepteurs.

Bien qu'étant des protéines distinctes, codées par des groupes de gènes différents, les récepteurs d'antigènes des cellules B et T semblent être dérivés d'un ancêtre commun.

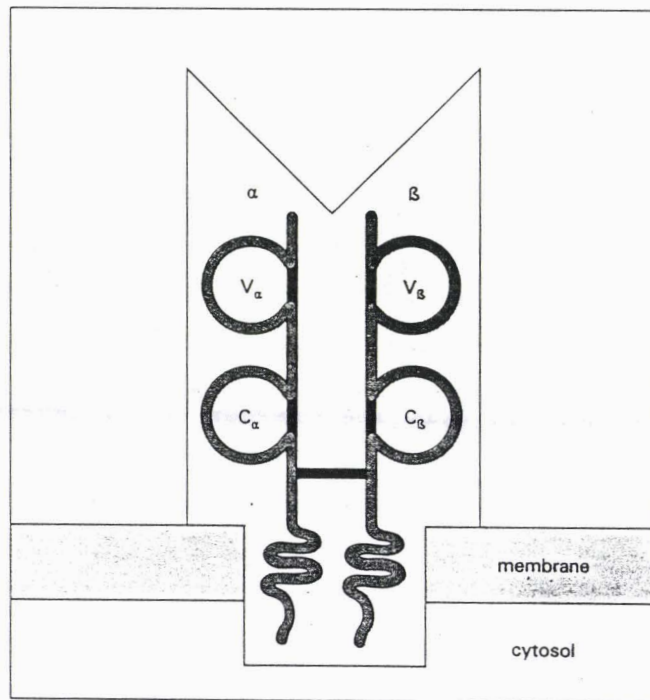


Figure 16 : Structure schématique du récepteur pour l'antigène des lymphocytes T.

1 - Structure globale du récepteur T

Chez l'homme, le récepteur pour l'antigène à la surface des cellules T est un hétérodimère glycoprotéique ayant une masse moléculaire de 90 kDa. Il comprend deux chaînes peptidiques (Figure 16) :

- une chaîne α d'une masse moléculaire de 45 kDa;
- une chaîne β d'une masse moléculaire de 40 kDa.

Chaque chaîne est composée, comme les molécules d'anticorps, d'une région constante (C) C-terminale et d'une région variable (V) N-terminale. Les régions C des deux chaînes sont implantées dans la membrane de la cellule T et possèdent de petits segments intracytoplasmiques. Chacune des régions C et V est caractérisée par une organisation en domaines d'environ 65 résidus d'acides aminés (un domaine C et un domaine V par chaîne) verrouillés, chacun par un pont disulfure intrachaine. Les deux chaînes α et β sont elles-mêmes liées par l'intermédiaire d'un seul pont disulfure interchaîne. Les zones où sont situées ces cystéines pourraient, en dépit du manque de proline, correspondre à la région charnière des immunoglobulines. Chacune des régions C et V des deux chaînes présente donc une homologie d'organisation en domaine, en plus d'une certaine homologie de séquence, avec les anticorps.

Le récepteur T est exprimé sous forme d'un complexe moléculaire qui implique également 3 autres chaînes polypeptidiques (Figure 17) :

- chaîne γ glycosylée, de masse moléculaire 25 kDa;
- chaîne δ glycosylée, de masse moléculaire 20 kDa;
- chaîne ϵ , de masse moléculaire 20 kDa.

Ces chaînes sont associées de façon non covalente les unes avec les

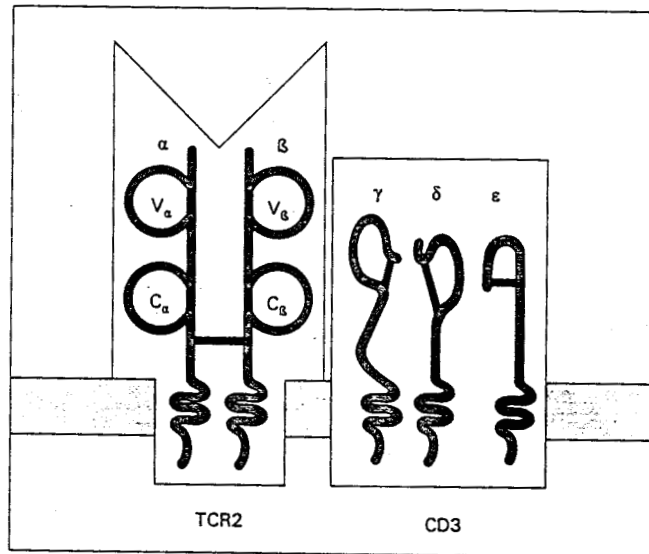


Figure 17 : Structure schématique de la molécule CD3 associée au récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (TCR).

autres. Toutes ont un domaine N-terminal extracellulaire et un peptide transmembranaire. Environ un tiers de la chaîne γ est intracytoplasmique. Ensemble, ces trois chaînes forment une macromolécule appelée CD3 (on le désigne aussi sous le nom de T3) chez l'homme, liée de façon non covalente avec l'hétérodimère $\alpha\beta$ du récepteur T. Les séquences intracytoplasmiques des chaînes γ et δ sont extrêmement conservées chez l'homme et la souris. Il existe des sites de phosphorylation actifs sur la portion intracytoplasmique de la chaîne γ . Il semblerait que la molécule CD3 permette la transduction de signaux vers l'intérieur de la cellule, lorsque les cellules T sont activées par la fixation de l'antigène à son récepteur, à la surface de la cellule.

Il existe un autre récepteur T, le récepteur $\delta\gamma$ (les chaînes δ et γ envisagées ici n'ont rien à voir avec les chaînes δ et γ de la molécule CD3). Celui-ci semble exprimé à la surface de lignées cellulaires différentes de celles exprimant le récepteur $\alpha\beta$, et il est dérivé de gènes différents. Néanmoins, sa structure générale ressemble fort à celle du récepteur T $\alpha\beta$.

2 - Structures impliquées dans la liaison à l'antigène et à la molécule du CMH (domaines variables des chaînes α et β)

Comparativement aux immunoglobulines, il y a moins de gènes qui codent pour les différents domaines variables (V) du récepteur T. Il est par conséquent plus difficile d'identifier les zones d'hypervariabilité. Néanmoins, les domaines V qui ont été séquencés à ce jour présentent une variabilité de séquence globale plus grande que les domaines V des immunoglobulines. Les séquences variables du récepteur T présentent une variabilité répartie sur toute leur longueur. Toutefois, les segments qui, par homologie, correspondent aux régions hypervariables du récepteur B sont particulièrement variables et codent très probablement pour les sites de

fixation du récepteur T sur le complexe antigène-CMH. Cette idée est fondée sur l'hypothèse que les domaines V du récepteur T se replient d'une façon comparable aux domaines V du récepteur B (immunoglobuline).

D - MODE DE RECONNAISSANCE (ANTIGENICITE) DES PEPTIDES ANTIGENIQUES

Nous allons maintenant parler d'interactions peptide antigénique-molécule du CMH d'une part et récepteur T-(peptide antigénique-molécule du CMH) d'autre part.

1 - Comparaison antigénicité T / antigénicité B

Quelles que soient l'aspect des liaisons mises en jeu, elles sont toujours non covalentes et feront appel aux mêmes liaisons que celles rencontrées dans l'interaction antigène-anticorps, c'est-à-dire :

- liaison hydrogène;
- liaison électrostatique ("IONIQUE");
- forces de VAN DER WAALS (forces de KEESOM, forces de DEBYE et forces de LONDON);
- liaison hydrophobe.

Ici aussi les molécules interagissant devront posséder des structures les plus complémentaires possibles sous peine de voir apparaître des forces stériques de répulsion.

A l'heure actuelle, il n'est pas possible d'obtenir suffisamment de matériel pour envisager une analyse radiocristallographique de la structure tertiaire du récepteur T avec ses ligands, comme cela a été réalisé avec les

immunoglobulines. Toutefois de nombreux travaux nous permettent d'appréhender assez précisément les phénomènes mis en jeu.

Nous avons vu que la reconnaissance de l'antigène par les cellules T nécessite sa dégradation enzymatique dans des cellules présentatrices qui exposeront les fragments antigéniques associés à une molécule du CMH. En conséquence, les régions protéiques impliquées dans l'activation des cellules T (que l'on peut appeler épitopes T par extrapolation de la dénomination d'épitopes B) pourront indifféremment être situées à la surface ou à l'intérieur de la structure protéique native.

Récepteurs B et récepteurs T reconnaîtront le plus souvent des épitopes différents de la protéine antigénique et les épitopes T seront souvent moins nombreux. Les **épitopes T** seront **séquentiels** (régions d'acides aminés contigus) ou **conformationnels continus** (région d'acides aminés contigus arrangés dans une conformation bien définie), dans la mesure où la restriction imposée par le CMH, dont nous allons parler n'autorise qu'une liaison fragment antigénique-molécule du CMH (au niveau du sillon) sous forme d'un peptide étendu ou replié dans une conformation particulière.

Faisant généralement appel à des éléments de structures primaires ou secondaires, il apparaît donc que les épitopes T sont beaucoup plus faciles à **mimer** par des peptides synthétiques que les épitopes B.

2 - La restriction par les molécules du CMH et ses conséquences

Que ce soit à la surface des CPA (CMH II) ou d'une cellule infectée (CMH I), la **reconnaissance** de l'antigène par son récepteur à la surface des cellules T est **génétiquement restreinte par les molécules du CMH**. Cela

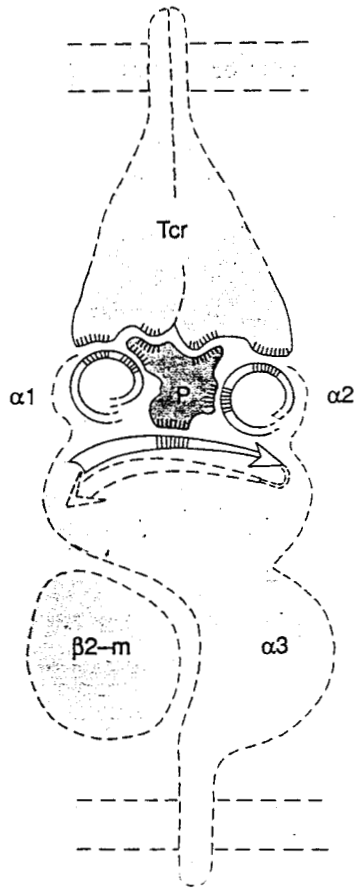


Figure 18 : Interactions possibles entre un fragment antigénique (peptide P) présenté par une molécule de classe I du CMH ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 2m$) et le récepteur spécifique (Tcr) à la surface d'un lymphocyte T cytotoxique.

signifie que les récepteurs à la surface des cellules T d'un organisme donné sont incapables de reconnaître des fragments antigéniques isolés pas plus que les molécules du CMH de l'organisme prises isolément, par contre ils sont capables de reconnaître un fragment antigénique sur une molécule du CMH du même organisme (molécule caractéristique du "soi"), à laquelle il est physiquement lié. L'association entre le peptide antigénique et la molécule du CMH doit donc s'effectuer avant la reconnaissance de ce complexe par le récepteur T. Cette notion de séquence des événements est très importante pour l'efficacité de la réponse immunitaire.

Puisque la reconnaissance de l'antigène par les récepteurs à la surface des lymphocytes T est restreinte du point de vue du CMH, cela implique très certainement que les cellules T **reconnaissent simultanément** la combinaison des deux entités. Très nombreux sont les arguments en faveur de la théorie où un récepteur T unique (celui que nous avons décrit) à la surface des cellules T serait impliqué dans ce phénomène (Figures 18 et 19), plutôt que d'une théorie où les cellules T utiliseraient deux récepteurs distincts. Et, il est donc très probable que des parties distinctes du fragment antigénique interagissent avec le récepteur T et la molécule du CMH.

Nous pouvons alors imaginer comment, au niveau moléculaire, l'interaction récepteur T-antigène est génétiquement restreinte par le CMH : les différentes molécules du CMH exprimées au sein d'un même organisme (six au maximum de classe I et 10 à 20 de classe II par individu, chez l'homme) divergent, nous l'avons vu, de façon non négligeable au niveau de leur site de liaison à l'antigène; elles lient donc différents fragments antigéniques, ou lient différemment un même fragment. Ainsi, des molécules distinctes du CMH de l'organisme peuvent présenter des épitopes distincts d'une protéine

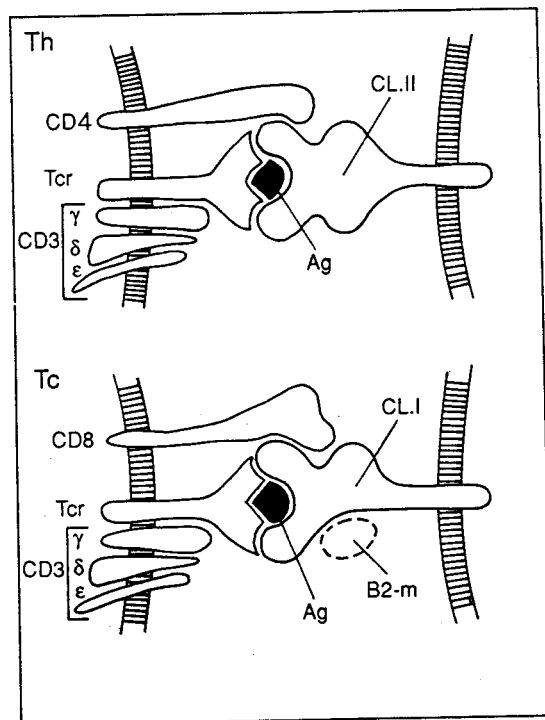


Figure 19 : Interactions hypothétiques (reconnaissance) entre lymphocytes T axillaire (Th) et T cytotoxique (Tc) et leurs ligands (Tcr = récepteur spécifique pour l'antigène à la surface du lymphocyte; CL. "I" ou "II" = molécule de classe I ou II du CMH).

antigénique aux cellules T, certains épitopes n'étant pas présentés aux cellules T d'un organisme (**individu non répondeur** car l'antigène est masqué vis-à-vis du système immunitaire et aucune réponse, humorale ou cellulaire, ne sera obtenue), alors qu'ils peuvent l'être dans un autre organisme. En conséquence, la nature et la force de la réponse immunitaire d'un individu vont dépendre en première instance de ses molécules du CMH.

Toutefois, les quelques molécules du CMH exprimées au sein d'un organisme ont la capacité de lier un grand nombre de peptides différents. L'interaction peptide-CMH est donc fortement dégénérée. Ceci a été démontré par SETTE A. et col. qui ont trouvé qu'une molécule particulière du CMH peut se lier à plus de 10% (entre 10 et 20%) des fragments peptidiques de n'importe quelle protéine et que l'interaction peut supporter 80 à 90% de substitutions différentes avant de s'en trouver modifiée (SETTE A. et col., 1987.).

D'autre part, la fixation du peptide antigénique au CMH et sa présentation aux cellules T est une condition nécessaire mais non suffisante à l'induction d'une réponse cellulaire T : le répertoire des récepteurs T n'est pas infini et, qui plus est, il est entamé par les processus de tolérance au "soi" dans le thymus. Cependant de nombreuses associations peptide antigénique étranger-CMH seront reconnues par les cellules T (dans ce cas, l'**individu sera répondeur**). La reconnaissance par les cellules T est très spécifique et n'accepte pas plus de 10 à 20% de substitutions différentes au sein du peptide antigénique (SETTE A. et col., 1987.). C'est elle qui permet le maintien de la spécificité de la réponse immune.

On comprend mieux alors que les cellules T d'espèces différentes et même d'individus différents de même espèce soient stimulées par différentes régions d'une protéine antigénique. Il existe, globalement, plus de contraintes sur

les régions d'une protéine capables de stimuler les cellules T (régions devant chacune être bien potentialisée et préservée par la dégradation dans la CPA et nécessitant par la suite une liaison à une molécule du CMH, afin d'être reconnue par un récepteur T) que sur les régions stimulant les cellules B (régions directement reconnues par les récepteurs B). Ceci pourrait expliquer pourquoi il existe moins d'épitopes T que d'épitopes B au sein d'une protéine antigénique.

La nature des acides aminés situés dans l'épitope T de la protéine antigénique est importante pour au moins trois raisons (KURATA P. et BERZOFKY J.A., 1990.) :

- certains sont nécessaires à l'interaction avec la molécule du CMH;
- d'autres sont nécessaires à l'interaction avec le récepteur T et constituent l'épitope vrai. Ils peuvent peut-être également favoriser le bon contact entre le récepteur T et la molécule du CMH;
- d'autres enfin, pourraient être importants pour stabiliser l'épitope dans sa meilleure conformation (en hélice α par exemple) de façon à faciliter le contact avec la molécule du CMH et le récepteur T.

Il pourrait exister également des régions de la protéine antigénique native influençant le choix de l'épitope T parmi différentes possibilités. On peut penser par exemple à des régions influençant la manière dont la protéine va être dégradée et présentée par la CPA.

IV - METHODES DE PREVISION DES EPITOPES

A - INTRODUCTION

Il est exceptionnel de disposer de la structure tridimensionnelle des antigènes étudiés. Les progrès récents de la biologie moléculaire font qu'un nombre de plus en plus élevé de protéines ne sont connues que par leur séquence, déduite de la séquence nucléotidique du gène correspondant. Le plus souvent, on ne dispose donc que de la structure primaire de l'antigène étudié.

Or, malgré le fait que les fragments N- et C-terminaux d'une protéine sont souvent accessibles en surface et, ainsi, souvent antigéniques, il n'est pas facile de prédire les zones potentiellement intéressantes. Toutefois, à partir des structures antigéniques connues de quelques protéines, de nombreux auteurs ont essayé de corrélérer la position des épitopes avec certains aspects des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines. Cela a permis d'établir un lien entre la localisation des épitopes et certaines propriétés de segments peptidiques des protéines. Ce sont ces propriétés que nous allons décrire par la suite.

Assisté de programmes informatiques, il est ainsi possible d'effectuer un choix judicieux sur la base de **critères prévisionnels**, afin de prédire les épitopes impliqués dans le déclenchement de la réponse immune (épitopes B impliqués dans la réponse humorale et épitopes T impliqués dans la réponse cellulaire). Ces épitopes pourront ensuite être mimés sous forme de peptides synthétiques.

B - PREVISION DES EPITOPES B

La recherche des épitopes B sera particulièrement axée sur la sélection de zones à la surface de la protéine. Il est nécessaire de compléter cette recherche par la connaissance d'informations de type conformationnel afin de sélectionner judicieusement un plus grand nombre de structures susceptibles d'être reconnues par le système immunitaire. Ceci permettra par la suite de reproduire, plus ou moins finement, selon la nature de l'information, des épitopes B conformationnels.

La connaissance de l'organisation tridimensionnelle d'une protéine, définie par la **diffraction des rayons X**, permet de repérer aisément les zones en surface et de visualiser de manière claire l'information conformationnelle. Cependant, les étapes de cristallisation qui précèdent l'analyse des macromolécules sont extrêmement laborieuses et elles ont limité la connaissance des structures spatiales à quelques centaines de protéines seulement.

L'utilisation de la **résonance magnétique nucléaire (RMN)**, qui s'applique à un milieu non cristallin (macromolécules en solution), est rapidement limitée, quant à elle, par la taille des molécules à analyser. Néanmoins, elle permettra de définir la structure tertiaire des molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 10000 kDa.

La sélection de zones à la surface des protéine ainsi que celle de certains types de conformations s'appuie sur une série de critères de probabilité, définis sur la base des propriétés physicochimiques des résidus et de leurs comportements dans le contexte de structures tridimensionnelles connues. Ces critères permettent une **prédiction** épitopique à partir de la

structure primaire quand celle-ci est seule disponible. Performants lorsqu'il s'agit de repérer une zone accessible (DUBEAUX C., 1988.), ils sont plus imprécis pour définir une structure secondaire et ils ne permettent pas de prédire la structure tertiaire résultant du repliement ("folding") global de la molécule. Ces critères permettent la prédiction d'**épitopes séquentiels** (continus) ou d'**épitopes conformationnels continus**.

Toutefois si la protéine étudiée présente une analogie avec d'autres protéines dont la structure tertiaire est connue, la **modélisation moléculaire** qui consiste à reconstituer la structure protéique selon l'édifice moléculaire des protéines analogues, semble être un outil très performant. Elle permet notamment de sélectionner les zones en surface, de prédire des éléments de structure secondaire et elle apparaît unique pour prédire la structure tertiaire à partir de la structure primaire.

1 - Critères thermodynamiques

Ces critères souvent connus sous le nom de critères de **HOPP T.P. et WOODS K.R.** permettent d'estimer l'**hydrophilie** moyenne de courtes séquences peptidiques (6 acides aminés) (HOPP T.P. et WOODS K.R., 1981 et HOPP T.P. et WOODS K.R., 1983.). L'hydrophilie moyenne est définie comme la moyenne des hydrophilies des chaînes latérales; elle est attribuée au premier acide aminé de l'hexapeptide et le calcul est répété le long de la séquence protéique en décalant la fenêtre d'un incrément d'un acide aminé à chaque pas.

Ces critères sont calculés sur la base des coefficients de partage des dérivés d'acides aminés, protégés sur leurs fonctions amine et carboxylique, entre différents solvants. Les paramètres utilisés par HOPP T.P. et WOODS K.R. (HOPP T.P. et WOODS K.R., 1981.) ont été définis précisément à partir de ceux

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

Tableau I :

Echelles d'hydrophilie (HOPP T.P. et WOODS K.R., 1981.) et d'acrophilie (T.P., 1984.).

employés par LEVITT M. et CHOTTIA C. (LEVITT M. et CHOTTIA C., 1976.) qui les avaient obtenus de mesures d'énergie libre de transfert eau/méthanol définies par NOZAKI Y. et TANFORD C. (NOZAKI Y. et TANFORD C., 1971.). Certains paramètres ont été modifiés pour améliorer la corrélation avec des protéines dont les épitopes dominants avaient pu être localisés. Les valeurs d'énergie libre de transfert eau/méthanol et d'hydrophilie de chaque résidu sont représentées dans le Tableau I.

Un des problèmes de cette méthode réside dans le fait qu'elle privilégie les chaînes latérales ionisables aux dépens des chaînes polaires. Elle présente en plus l'inconvénient de perdre l'information conformationnelle (par exemple, elle ne rend pas compte de la forte probabilité qu'a la proline de se trouver dans un coude β). Par conséquent, on tiendra compte d'autres types de paramètres, tels que ceux dérivés des critères statistiques.

2 - Critères statistiques

L'étude de protéines dont la structure tridimensionnelle est connue permet de déduire, pour chaque résidu ou groupe de résidus, des **critères statistiques** déterminant l'accessibilité moyenne ou la probabilité d'adopter tel ou tel type de conformation. Cependant ces paramètres sont le fruit d'un échantillonnage effectué à partir de protéines globulaires, et leur extension aux protéines de surface est à considérer avec précaution.

a - Acrophilie

Les valeurs d'hydrophilie ne permettent pas de prédire la localisation de tous les sites antigéniques connus; aussi HOOP a-t-il réajusté ces valeurs en les dénommant valeurs d'acrophilie (Tableau I) et en se basant sur 49

Amino Acide	Indice d'Hydrophathie	ΔG° Transfert eau-vapeur	Fraction des chaînes latérales 100 % enfouies	Fraction des chaînes latérales 95 % enfouies
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 II :
Echelle d'hydrophathie (CHOTHIA C., 1976.).

protéines cristallisées dont la structure spatiale était connue (HOOP T.P., 1984.). Les acides aminés qui apparaissent fréquemment dans les zones fortement exposées (Gly, Pro, Asn, Asp et Ser) sont ainsi mis en évidence.

Il n'existe pas de différences notables dans le bas des échelles des 2 tableaux d'hydrophilie et d'acrophilie (Tableau I), un acide aminé hydrophobe étant également "acrophobe". Par contre, les petits résidus sont au sommet de l'échelle d'acrophilie alors que l'échelle d'hydrophilie est dominée par les résidus chargés.

b - Hydropathie

Le terme d'"hydropathie" a été proposé par KYTE J. et DOOLITTLE R.F. (KYTE J. et DOOLITTLE R.F., 1982.). Il désigne à la fois l'hydrophilie et la lipophilie d'un segment peptidique. Le calcul, semblable à celui de HOPP T.P. et WOODS K.R., consiste à affecter une valeur moyenne à un segment peptidique de longueur donnée et à déplacer ce segment tout au long de la protéine selon un incrément d'un résidu.

Les indices d'hydropathie (Tableau II) sont issus des paramètres de CHOTHIA C. qui a mesuré, pour chacun des 20 acides aminés au sein de 12 protéines globulaires, le nombre de résidus exposés en surface et le nombre de résidus enfouis (CHOTHIA C., 1976.). Deux définitions d'un résidu enfoui étant utilisées : enfouissement total (100 %) ou presque total (95 %), correspondant à une exposition inférieure à 5% de la chaîne (Tableau II).

c - Surface accessible

Si le volume d'une protéine globulaire (c'est-à-dire le nombre de résidus qu'elle contient) croît avec le cube du diamètre, la place disponible en surface n'augmente qu'en raison du carré du diamètre (JANIN J., 1979.). Autrement dit, plus une protéine globulaire est volumineuse, plus elle sera exigeante quant à l'hydrophilie des résidus qui seront placés en surface.

Il existe une relation simple entre le nombre d'acides aminés enfouis (n_B) et le nombre total de résidus (n) contenu dans une protéine :

$$k = n^{1/3} - n_B^{1/3} \quad \text{équation (1)}$$

La valeur de k dépend de la définition donnée au terme d'"acide aminé enfoui" :

- si on exclue tout contact avec l'extérieur, k a une valeur de $3,0 +$ ou $- 0,4$;
- si on admet un contact de 10 à 20 Angströms carrés (correspondant à l'émergence d' 1 ou 2 atomes seulement), k prend des valeurs $2 +$ ou $- 2$ à $1,62 +$ ou $- 0,13$.

La valeur de k est donc directement reliée à l'épaisseur de la couche en surface qui varie de 9,6 Angströms (quand on considère comme enfoui les résidus n'ayant aucun contact avec l'extérieur) à 5,2 Angströms (quand on admet un contact de 20 Angströms carrés).

Dans une protéine à n résidus, la fraction g de résidu enfoui est calculée, pour chaque type d'acide aminé, selon l'équation proposée par JANIN J. (JANIN J., 1979.) :

Résidu	Fraction molaire		Energie libre (KCal/mole)	
	Enfouie	Accessible	f	ΔG_t
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 III :

Composition en acides aminés de l'intérieur et de la surface d'une protéine globulaire (JANIN J., 1979.).

$$g = \frac{f n_B}{n - n_B + (f n_B)}$$

équation (2)

Où n_B est calculé d'après l'équation (1) et où f est le pourcentage moyen de résidus enfouis calculé pour chaque type d'acide aminé : $f =$ fraction molaire enfouie / fraction molaire accessible.

Le comportement d'un résidu peut donc être défini par la valeur f représentant son coefficient de partition entre l'intérieur et l'extérieur (surface) de la protéine. On peut, par conséquent, déterminer la valeur de f en mesurant l'énergie libre du transfert du résidu de l'intérieur de la molécule vers l'extérieur :

$$\Delta G_t = R.T.\ln f/\Delta G_h$$

ΔG_h étant l'énergie libre de transfert d'une phase organique vers une phase aqueuse (NOZAKI Y. et TANFORD C., 1971.). Les valeurs de f et ΔG_t de chaque acide aminé sont représentées dans le Tableau III. La valeur f peut être considérée comme une caractéristique des acides aminés des protéines globulaires. Il est possible d'utiliser ces mêmes valeurs pour plusieurs valeurs de k , c'est-à-dire pour plusieurs épaisseurs de la couche en surface. (En calculant la valeur de g pour un volume croissant, on peut constater que la fraction de résidus enfouis n_B augmente avec le volume de la protéine mais moins rapidement pour les résidus hydrophiles (Figure 20). Autrement dit, comme nous l'avons fait remarqué au début de ce paragraphe, plus une protéine globulaire est volumineuse, plus elle sera exigeante quant à l'hydrophilie des résidus qui seront placés en surface.

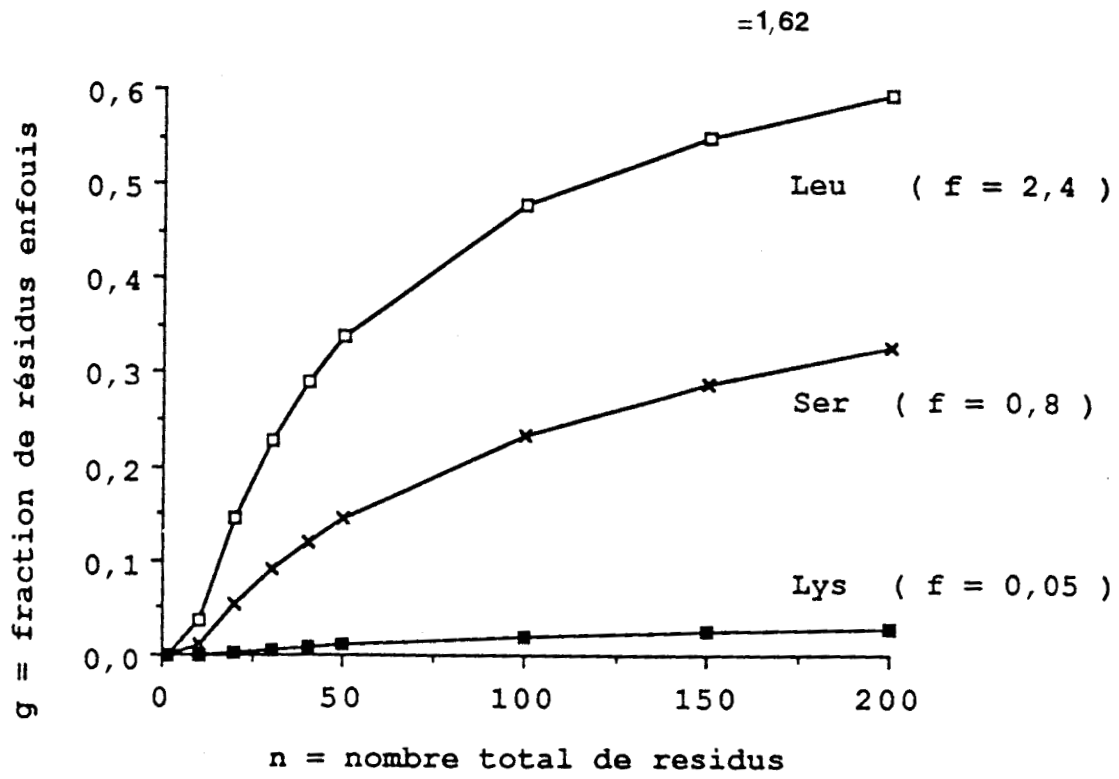


Figure 20 : Fraction de résidus enfouis en fonction du nombre total de résidus.

En routine, le logiciel que l'on utilise se sert d'une valeur de k correspondant à une couche de 5,2 Angströms. Nous pouvons toutefois faire varier k de façon à considérer une couche plus importante afin de tenir compte de la déformabilité de la surface protéique. Notre logiciel calcule la probabilité moyenne $(1 - G_i)$ de trouver en surface tous les hexapeptide (que l'on déplace le long de la séquence selon un incrément de 1) de la protéine, d'après la relation :

$$G_i = \frac{g_i + g_{i+1} + g_{i+2} + g_{i+3} + g_{i+4} + g_{i+5}}{6}$$

Les valeurs de g étant calculées grâce à l'équation (2).

L'exposition moyenne théorique (telle qu'elle est évaluée sur la base du nombre d'acides aminés et dans l'hypothèse d'une structure globulaire) est comparée à l'exposition moyenne calculée (moyenne des expositions des différents résidus, constituant effectivement la protéine).

d - Mobilité et flexibilité

Les facteurs de température des acides aminés augmentent quand l'éloignement par rapport au centroïde d'une protéine globulaire augmente. Une corrélation peut ainsi être établie entre facteurs de température et probabilité d'apparaître en surface (PONNUSWAMY P.K. et BHASKARAN R., 1984.), en favorisant des structures souples, les boucles en particulier.

Les structures mobiles sont des cibles de choix dans la mesure où leur souplesse les rapprochent de ce que peut mimer un peptide et aussi parce

Acide aminé	Déplacement (A°)	Facteur de flexibilité		
		0 v.r.	1 v.r.	2 v.r.
Lys	1,233	1,093	1,082	1,057
Ser	1,262	1,169	1,048	0,923
Gly	1,224	1,142	1,042	0,923
Pro	0,963	1,055	1,085	0,932
Asp	1,315	1,033	1,089	0,932
Glu	1,126	1,094	1,036	0,933
Gln	1,109	1,165	1,028	0,885
Thr	0,907	1,073	1,051	0,934
Asn	0,861	1,117	1,006	0,930
Arg	1,023	1,038	1,028	0,901
Ala	1,159	1,041	0,946	0,892
Leu	0,679	0,967	0,961	0,921
His	0,849	0,982	0,952	0,894
Val	1,043	0,982	0,927	0,913
Tyr	0,798	0,961	0,930	0,837
Ile	0,940	1,002	0,892	0,872
Phe	0,605	0,930	0,913	0,914
Cys	0,844	0,960	0,878	0,925
Trp	0,876	0,925	0,917	0,803
Met	0,871	0,947	0,862	0,804

Tableau IV :

Valeurs des déplacements (mobilité) (PONNUSWAMY P.K. et BHASKARAN R., 1984.) et des facteurs de flexibilité pour 0, 1 ou 2 voisins rigides (v.r.) (KARPLUS P.A. et SCHULZ G.E., 1985.).

qu'elles représentent les épitopes séquentiels les plus probables. Ainsi, lorsque l'on cherche à obtenir la reconnaissance d'une protéine par un anticorps anti-peptide ou l'inverse, on a plus de chance d'y parvenir en sélectionnant une zone mobile, dans la mesure où un épitope conformationnel est partiellement séquentiel et où le peptide synthétique saura le mimer convenablement. La valeur moyenne des déplacements (Tableau IV) des résidus d'un hexapeptide, attribuée au premier acide aminé, permet de définir le profil global de mobilité.

KARPLUS P.A. et SCHULZ G.E. ont défini, également à partir des facteurs de température, des facteurs de **flexibilité** (Tableau IV) qui se distinguent des paramètres introduits par PONNUSWAMY P.K. et BHASKARAN R. puisqu'ils proviennent de l'étude de séquences peptidiques plus longues (30 résidus au moins) (KARPLUS P.A. et SCHULZ G.E., 1985.). La flexibilité relative prédite pour un résidu en position n d'un heptapeptide correspond à la somme des valeurs de flexibilité des acides aminés en position $n-3$, $n-2$, $n-1$, n , $n+1$, $n+2$, $n+3$. Ces valeurs de flexibilité sont affectées respectivement des facteurs 0,25; 0,50; 0,75; 1; 0,75; 0,50; 0,25 et sont modulées par la présence de 0, 1, ou 2 voisins rigides.

3 - Prévisions conformationnelles

Il existe plusieurs méthodes permettant de prédire la structure secondaire d'une protéine à partir de sa séquence en acides aminés. Parmi elles, la méthode de CHOU Y. et FASMAN G. est la plus couramment utilisée.

Le choix des séquences portera plus volontiers sur des zones fréquemment retrouvées en surface et réputées "épitopiques" (coudes β ou hélices α amphiphiles) susceptibles d'être reproduites par un peptide de synthèse :

- les **coudes β** correspondent aux changements de direction du squelette peptidique et ont une forte probabilité d'être exposés en surface;
- si un peptide correspondant à une zone **α -hélicoïdale**, pris isolément, n'adopte pas ce type de conformation, il en possède toutefois l'information dans sa séquence et pourra s'organiser progressivement, en interagissant avec un environnement adéquat (dans le cadre de l'interaction avec un récepteur).

Au contraire, le choix peut encore porter sur des zones pour lesquelles l'absence de préférence conformationnelle laisse présager une flexibilité locale (à comparer avec les critères statistiques). Ceci peut diminuer les exigences conformationnelles imposées lors de la liaison de l'anticorps anti-peptide à cette zone de la protéine native ou inversement de l'anticorps anti-protéine native au peptide. Cette façon de voir les choses est en accord avec l'un des 2 modèles, proposés par NIMAN H.L. et col., concernant la reconnaissance immunitaire de protéines par des anticorps anti-peptide (NIMAN H.L. et col., 1983.).

Il faudra éviter le choix de zones ayant une forte probabilité d'adopter des conformations qu'un peptide de longueur moyenne ne pourra pas adopter. Ce sera le cas, en particulier des zones de type **feuillet plissé β** qui mettent en jeu le recouvrement de 2 zones pouvant éventuellement être distantes l'une de l'autre dans la structure primaire. De plus, les feuillets plissés constituent des structures généralement enfouies et, à ce titre, seront également à éviter.

a - Méthode de CHOU Y. et FASMAN G.

La méthode de CHOU Y. et FASMAN G. permet de localiser les coudes β , les hélices α ainsi que les feuillets plissés β (CHOU Y. et FASMAN G., 1974a et CHOU Y. et FASMAN G., 1974b.). Cependant, même si cette méthode est précise (surtout pour les coudes β), il se peut que la séquence retenue adopte en réalité (au sein de la protéine native repliée) une autre structure secondaire que celle qui est prédite.

Les paramètres ont été établis à partir de 15 protéines dont la structure spatiale était connue. Une étude statistique permet de déterminer l'aptitude que présente chacun des 20 acides aminés naturels à participer à telle ou telle conformation. Des paramètres structuraux peuvent être ainsi calculés. On définira pour un acide aminé donné les paramètres $P\alpha$ et $P\beta$ correspondant aux structures en hélice α et en feuillet plissé β avec :

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

dans lesquels $f\alpha$ et $f\beta$ représentent la fréquence d'apparition du résidu dans chacune des deux structures et $\langle f\alpha \rangle$ et $\langle f\beta \rangle$ représentent le nombre moyen d'acides aminés constituant ces deux structures.

Un segment de six résidus, au sein d'une protéine, adoptera probablement une structure en hélice α si :

- $\langle P\alpha \rangle > \langle P\beta \rangle$
- $\langle P\alpha \rangle > 1,03$

La structure α -hélicoïdale sera privilégiée si les acides aminés qui la constituent induisent fortement cette structure alors que les résidus qui la rompent (c'est le cas, par exemple, de la proline qui déstabilise l'hélice α) ne figurent pas dans la séquence.

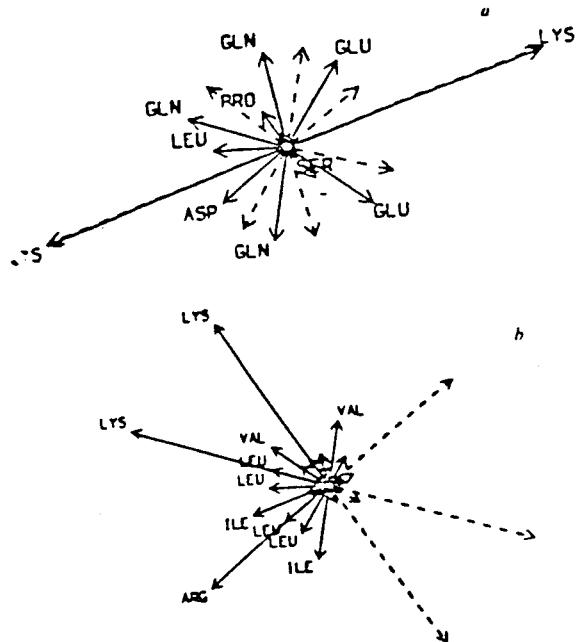


Figure 21 : Représentation graphique de la contribution de chaque résidu au moment hydrophobe (EISENBERG D. et col., 1982).

(a) Distribution symétrique des hydrophobicités (pas d'amphiphilie).

(b) Distribution asymétrique des hydrophobicités (amphiphilie).

Un segment de cinq résidus, au sein d'une protéine, aura une forte probabilité d'adopter une structure en feuillet plissé β si :

- $\langle P\beta \rangle > \langle P\alpha \rangle$

- $\langle P\beta \rangle > 1,05$

Cette probabilité est d'autant plus forte que le segment contient des résidus inducteurs de cette structure et ne comprend aucun élément qui la déstabilise.

Dans le cas du coude β , le problème est plus délicat puisque la position de chaque résidu sur le coude est très importante. Pour cette raison, il faut tenir compte d'une probabilité $P_t = (f_i \times f_{i+1} \times f_{i+2} \times f_{i+3})$ dans laquelle $f_i, f_{i+1}, f_{i+2}, f_{i+3}$ représentent respectivement les fréquences d'existence des différents résidus en position $i, i+1, i+2, i+3$ du coude. Si P_t est supérieur à $0,5 \cdot 10^{-4}$, un coude β en position i pourra être prédit.

Les paramètres structuraux sont tous calculés sur quatre résidus grâce au programme mis en oeuvre dans notre laboratoire.

b - Moment hydrophobe et représentation d'EISENBERG D. et col.

Quand une hélice α a pu être prédite par le critère de sélection précédent (Méthode de CHOU Y. et FASMAN G.), le concept d'hélice α amphiphile peut être apprécié en combinant l'échelle d'hydrophobicité à une représentation de l'hélice en projection axiale (Figure 21) (EISENBERG D. et col., 1982.). L'hydrophobicité de chaque résidu est représentée par un vecteur dont la direction est radiale à partir de l'axe de l'hélice vers le carbone α du résidu concerné. Dans le cas d'une hélice α , cela reviendra à tourner de 100° autour du centre de l'hélice pour chacun des résidus se

succédant dans la séquence (puisque l'on trouve 3,6 résidus par tour d'hélice, donc pour une rotation de 360°). La longueur du vecteur correspond à la valeur d'hydrophobicité H_i du résidu, donnée par les paramètres ΔG_t de JANIN J. (Tableau III). Le sens du vecteur est représenté dans la Figure 21 en traits pleins, et il est soumis au signe de la valeur d'hydrophobicité : positif (centrifuge) pour les résidus hydrophobes et négatif (centripète) pour les résidus hydrophiles. Une distribution asymétrique des vecteurs sur l'une des 2 faces du système α -hélicoïdal témoigne d'un caractère amphiphile marqué (Figure 21b).

C - PREVISION DES EPITOPES T

Comme nous l'avons vu précédemment, si les cellules B peuvent reconnaître l'antigène non dénaturé par l'intermédiaire de leurs récepteurs de surface (immunoglobulines), il n'en va pas de même pour les récepteurs spécifiques de l'antigène à la surface des cellules T. Dans ce cas, la reconnaissance de l'antigène implique une étape de dégradation protéolytique de l'antigène (appelée "processing") au sein d'une cellule présentatrice de l'antigène (CPA) puis sa présentation à la surface cellulaire en association avec une glycoprotéine du complexe majeur d'histocompatibilité.

1 - Hélice α amphiphile

DE LISI C. et BERZOFKY J. ont émis l'hypothèse qu'une part importante des épitopes T se présente sous la forme d'hélice α amphiphile dans le contexte de la présentation au système immunitaire, indépendamment de la structure adoptée au sein de la protéine native (DE LISI C. et BERZOFKY J., 1985.). Ces hélices amphiphiles sont constituées d'une face hydrophile opposée à une face hydrophobe. Dans cette optique, la détermination du moment hydrophobe de zones

Tableau IV' :

"Patterns de ROTHBARD" (ROTHBARD J.B. et TAYLOR W.R., 1988).

"Pattern" de 4 résidus :

(chargé + G) - (hydrophobe) - (hydrophobe) - (polaire + G).

"Pattern" de 5 résidus :

(chargé + G) - (hydrophobe) - (hydrophobe) - (hydrophobe + P) - (polaire + G).

Classification des résidus selon ROTHBARD J.B. et TAYLOR W.R. :

(chargés + G)	= D E H K R G
(hydrophobes)	= A V L I F M W T Y
(hydrophobes + P)	= A V L I F M W T Y P
(polaires + G)	= D E H R K N Q S T G.

potentiellement α -hélicoïdales et donc la représentation d'EISENBERG D. et col. constituent des outils très précieux (CHOU Y. et FASMAN G., 1974a, CHOU Y. et FASMAN G., 1974b et EISENBERG D. et col., 1982.).

2 - "Pattern de ROTHBARD"

En comparant les séquences d'épitopes T auxiliaires et cytotoxiques connus, ROTHBARD J.B. et TAYLOR W.R. ont mis en évidence des enchainements de quatre ou cinq résidus ("pattern") de propriétés physicochimiques différentes (ROTHBARD J.B. et TAYLOR W.R., 1988.). Ce motif, nommé "pattern de ROTHBARD", débute par un résidu de glycine ou un résidu chargé, suivi de deux ou trois résidus hydrophobes et il se termine par un résidu de glycine ou un résidu chargé (Tableau IV').

Ces deux modèles prévisionnels ne sont pas contradictoires puisque le "pattern de Rothbard" peut former une séquence α -hélicoïdale amphiphile. Cependant, ils ne constituent pas une règle absolue de prévision des épitopes T au sein d'une séquence, puisque, comme nous le verrons dans nos modèles, des enchainements ne présentant pas de telles caractéristiques peuvent faire l'objet d'une réponse de type cellulaire T et qu'inversement, il existe des séquences peptidiques, possédant l'un ou l'autre des 2 critères prévisionnels, qui ne sont pas des épitopes T dans le modèle étudié.

**RESULTATS DANS LES MODELES
EXPERIMENTAUX**

RESULTATS DANS LES MODELES EXPERIMENTAUX	p 74
I - INTRODUCTION	p 74
II - UNE PROTEINE SYNTHETIQUE CORRESPONDANT AU PRODUIT ENTIER DU GENE VPR DE VIH-1 EST RECONNUE PAR DES ANTICORPS DE SUJETS INFECTES PAR VIH-1	p 77
A - INTRODUCTION	p 77
B - RESULTATS ET DISCUSSION	p 80
1 - Synthèse de la protéine <i>vpr</i>	p 80
2 - Caractérisation chimique de <i>vpr</i>	p 84
a - Analyse d'acides aminés	p 84
b - CLHP en phase inverse analytique	p 84
c - Electrophorèse en gel urée / SDS	p 86
3 - Détection d'anticorps spécifiques de <i>vpr</i>	p 86
C - CONCLUSION	p 89
III - DETECTION D'ANTICORPS ANTI-PEPTIDES DE NEF (ET ANTI- PROTEINE NEF) CHEZ DES SUJETS INFECTES PAR VIH-1 MAIS SERONEGATIFS	p 91
A - INTRODUCTION	p 91
B - RESULTATS	p 93
1 - Détection d'anticorps anti-protéine <i>nef</i> et anti-peptides de <i>nef</i> chez des sujets séronégatifs à risque pour l'infection par VIH	p 93
2 - Sensibilité et spécificité du test radioimmunologique (RIA)	p 95
3 - Persistance des anticorps anti- <i>nef</i> et anti-peptides de <i>nef</i> et de séquences d'ADN du virus VIH après une séronégativaton spontanée	p 96
C - DISCUSSION	p 97
D - CONCLUSION	p 101

IV - MODULATION DE L'ORGANISATION α-HELICOIDALE D'UN PEPTIDE SYNTHETIQUE ET CORRELATION AVEC SON ANTIGENICITE	p 103
A - INTRODUCTION	p 103
B - RESULTATS ET DISCUSSION	p 103
1 - Constructions adoptées	p 103
2 - Conformation des constructions peptidiques	p 104
3 - Corrélation conformation-antigénicité	p 106
C - CONCLUSION	p 107
V - IDENTIFICATION DES EPITOPES T AUXILIAIRES D'UN ANTIGENE (P24) DE TOXOPLASMA GONDII	p 109
A - INTRODUCTION	p 109
B - RESULTATS ET DISCUSSION	p 111
1 - Sélection des peptides	p 111
2 - Détermination des épitopes de l'antigène P24 chez le rat FISCHER infecté par <i>Toxoplasma gondii</i>	p 111
3 - Détermination des épitopes de l'antigène P24 chez le rat FISCHER immunisé avec les AES	p 112
4 - Détermination des épitopes de l'antigène P24 chez le rat FISCHER immunisé avec un virus recombiné par le gène de la P24 (VVTG 2170)	p 113
5 - Transfert <i>in vivo</i> des cellules T spécifiques du peptide 170-193	p 117
C - CONCLUSION	p 120
VI - RECHERCHE DES EPITOPE T AUXILIAIRES DE LA PROTEINE NEF DE VIH-1	p 122
A - INTRODUCTION	p 122
B - RESULTATS	p 125

1 - Réponse proliférative des populations cellulaires T enrichies en cellules CD ₄ ⁺ et CD ₈ ⁺ , de rats immunisés par l'antigène protéique <i>nef</i>	p 125
2 - Sélection des peptides	p 126
3 - Stimulation par les peptides synthétiques dérivés de <i>nef</i> , des lymphocytes T de rats et de chimpanzés immunisés avec l'antigène <i>nef</i>	p 127
4 - Caractérisation de l'épitope T contenu dans le peptide 45-69	p 131
a - Génération de cellules T spécifiques du peptide 45-69	p 131
b - Identification de l'épitope T minimal contenu dans la zone 45-69 de <i>nef</i>	p 131
5 - Etudes conformationnelles	p 138
6 - Effet auxiliaire <i>in vivo</i> par les lymphocytes T spécifiques du peptide 45-69 pour la production d'anticorps anti- <i>nef</i>	p 138
C - DISCUSSION	p 139
D - CONCLUSION	p 143
VII - INDUCTION <i>IN VIVO</i> D'UNE REPOSE CELLULAIRE T CYTOTOXIQUE ET D'UNE REPOSE ANTICORPS SPECIFIQUES DE LA PROTEINE GP120 DE VIH-1, A L'AIDE D'IMMUNOGENES SYNTHETIQUES LIPOPEPTIDIQUES	p 145
A - INTRODUCTION	p 145
B - RESULTATS ET DISCUSSION	p 147
1 - Synthèse de l'acide amino-2 hexadécanoïque (acide aminé libre)	p 147
2 - Synthèse de l'acide N ^α -BOC amino-2 hexadécanoïque (acide aminé N ^α -protégé)	p 148
3 - Synthèse des lipopeptides	p 149

4 - Induction <i>in vivo</i> d'une réponse cellulaire T cytotoxique chez la souris	p 152
5 - Induction <i>in vivo</i> d'une réponse anticorps chez la souris	p 155
C - CONCLUSION	p 156

I INTRODUCTION

Le développement rapide des techniques de clonage et de séquençage de l'ADN qui facilite, par extrapolation, la connaissance des séquences protéiques pour lesquelles il code, a rendu plus facile et plus aisée la réalisation d'antigènes synthétiques et d'immunogènes par voie chimique ou par génie génétique.

L'identification des déterminants antigéniques (cartographie) peut se faire grâce à diverses méthodes mais l'utilisation simultanée de peptides d'une part, et d'anticorps monoclonaux et de cellules T activées, d'autre part semble constituer la manière la plus précise d'identifier, respectivement, les épitopes B et les épitopes T d'une protéine (DARSLEY M.J. et REES A.R., 1985.). La cartographie épitopique (B et T) d'une protéine permet un certain nombre d'applications :

- préparation de vaccins de synthèse, notamment après avoir identifié les épitopes qui interviennent dans des phénomènes tels que la neutralisation virale par des anticorps spécifiques (ARNON R., 1987 et JAVAHERIAN K. et col., 1990.);
- applications diagnostiques utilisant des peptides synthétiques, la mise en évidence d'anticorps anti-peptide fournissant des renseignements précieux en vue de déterminer
 - . la présence d'agents infectieux dans le sang et les produits sanguins,
 - . la propagation épidémiologique de l'infection,
 - . parfois, le stade de l'évolution de l'infection au niveau individuel;
- détermination de l'épitope commun à deux antigènes reconnus de façon croisée par un anticorps (DYRBERG T. et col., 1989.);

- des études statistiques effectuées sur plusieurs dizaines d'épitopes T connus ont tenté de dégager des propriétés structurales communes, dans le but de prédire les épitopes T d'une protéine quelconque à la seule vue de sa séquence en acides aminés (DE LISI C. et BERZOFSKY J., 1985, ROTHBARD J.B. et TAYLOR W.R., 1988 et Revue de KOURILSKY P. et CLAVERIE J.M., 1989.).

Nous avons vu que les antigènes d'un agent infectieux peuvent présenter un grand nombre d'épitopes qui sont à la base de la spécificité antigénique. Seuls quelques sites antigéniques potentiels sont importants pour l'immunospecificité et le nombre d'épitopes à l'origine de l'immunité protectrice est encore plus faible.

Ce sont ces sites qui retiennent l'attention lorsqu'on envisage une **approche vaccinologique** (faisant intervenir l'immunogénicité). Initialement les vaccins ont été composés d'organismes pathogènes complets, vivants ou tués, ou de protéines synthétisées par ces organismes. Ces vaccins sont inopérants contre certaines maladies, comme la malaria, et certains vaccins contenant des organismes pathogènes entiers ne sont pas dénués de risques. Dans de tels cas, les stratégies nouvelles s'orientent vers la synthèse de peptides (ne représentant qu'une petite partie de l'antigène naturel et une infime partie du pathogène) qui déclenchent la même réaction immunitaire que les antigènes complets mais d'une manière beaucoup plus ciblée et plus forte, donc globalement plus efficace. Ces peptides doivent en général stimuler aussi bien les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques que les lymphocytes B. Les immunogènes synthétiques doivent donc avant tout se lier aux molécules du CMH, très variables d'un individu à l'autre. Aussi, on synthétisera des vaccins plus efficaces si on l'on comprend bien les interactions des molécules du CMH avec les antigènes.

A des fins diagnostiques (faisant intervenir l'antigénicité), des épitopes différents peuvent être tout aussi intéressants.

En synthétisant une miniprotéine entière, nous allons montrer dans l'exposé de nos travaux que nous maîtrisons les méthodes de **synthèse peptidique** (efficacité des couplages, réactions secondaires, méthodes de contrôle etc.). L'obtention d'une protéine n'adoptant pas une structuration native a autorisé à n'explorer que partiellement son immunoréactivité. C'est pourquoi nous avons opter pour un **réductionnisme** des outils d'étude, en nous intéressant à des peptides de petite taille. Nos connaissances des méthodes de synthèse peptidique, associées à l'utilisation de méthodes prévisionnelles des épitopes d'une protéine, nous ont conduits à la synthèse de nombreux peptides naturels ou modifiés afin d'en étudier l'immunoréactivité, c'est à dire l'antigénicité ou l'immunogénicité, dans des modèles parasitaires et viraux.

Nous verrons qu'à l'aide de ces outils peptidiques, il est possible de cartographier les épitopes d'une protéine, d'améliorer l'antigénicité d'un peptide en favorisant sa structuration spatiale ou de le rendre immunogène en modifiant sa structure, la réponse induite restant spécifique de l'antigène natif.

II - UNE PROTEINE SYNTHETIQUE CORRESPONDANT AU PRODUIT ENTIER DU GENE VPR DE VIH-1 EST RECONNUE PAR DES ANTICORPS DE SUJETS INFECTES PAR VIH-1

A - INTRODUCTION

Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent causal du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). En plus des 3 gènes (*gag*, *pol* et *env*) codant pour les protéines structurales, le provirus VIH-1 possède 6 gènes fonctionnels supplémentaires (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu* et *vpr*). Les protéines non structurales codées par ces 6 gènes sont absentes du virion mais exprimées par la cellule infectée. Elles semblent jouer un rôle dans la synthèse du virion infectieux (HASELTINE W., 1988.).

La recherche du rôle que peuvent jouer ces protéines régulatrices et de la réponse immune qu'elles provoquent pourront nous aider à comprendre les mécanismes impliqués dans l'établissement de périodes silencieuses précédant la séroconversion au cours de l'infection par VIH (AMEISEN J.C. et col., 1989 et IMAGAWA D.T. et col., 1989.) ainsi que les mécanismes impliqués dans l'évolution d'une phase de séropositivité asymptomatique vers un SIDA déclaré.

Le produit du gène *vpr* a été étudié et décrit (WONG-STAAAL F. et col., 1987.). Il semble agir en tant que transactivateur de l'expression des protéines virales et augmenter à la fois la répllication du virus et son effet cytopathogène (COHEN E.A. et col., 1989 et COHEN E.A. et col., 1990.). Le gène *vpr* est hautement conservé parmi les différents provirus pour lesquels on dispose des données de séquence (ALIZON M. et col., 1986, ARYA S.K. et GALLO R.C., 1986, MUESING M.A. et col., 1985, RATNER L. et col., 1985,

Clone Sequence

```

BRU  MEQAPEDGCP QREPHNEWTL ELLEELKNEA VRHFPRIMLH GLGQHIYETY GDTWAGVEAI IRIL QQLLFI HFRIGCRHSR IGVTQRRAR -NGASRS*
ELI      A      Y      A      S      S      V      Q      IIR      S      *
MAL      A      Q      R      P      S      Y      E      S      Q      IIR      R      S      *
ARV2      Y      R      P      S      Y      E      S      Q      IIR      R      S      *
HAT3      Y      S      L      S      E      Q      II      *
BM10      S      L      S      E      Q      IT      *
BH5      K      E      Q      QNHWST*
PCV12      K      QNHWST*
4XB2      QNHWST*
H00V      QNHWST*
Z6      SHTMNGH*      QNHWST*

```

Tableau V :

Alignement des séquences protéiques du gène vpr de différents isolats de VIH-1 ("clone sequence").

Les séquences ont été alignées en référence à l'isolat "bru" et seuls les acides aminés différents ont été indiqués.

RATNER, L., 1986, SANCHEZ-PESCADOR R. et col., 1985, SRINIVASAN A. et col., 1987, STARCICH B. et col., 1986 et WAIN-HOBSON S. et col., 1985.), même si dans un isolat infectieux, le gène *vpr* contient un codon stop après seulement 54 bases (SRINIVASAN A. et col., 1987.). Plusieurs souches contiennent une extension C-terminale de 18 ou 19 résidus d'acides aminés (ALIZON M. et col., 1986, SANCHEZ-PESCADOR R. et col., 1985, STARCICH B. et col., 1986 et WAIN-HOBSON S. et col., 1985.). C'est le cas de la séquence de la souche HIV-1 LAV_{bru} (WAIN-HOBSON S. et col., 1985.) qui constitue la souche de référence en Europe (Tableau V). Le gène *vpr* est présent également dans VIH-2 (GUYADER M. et col., 1987.) et un gène correspondant existe dans la plupart des souches VIS (virus d'immunodéficience simien) (HIRSCH V.M. et col., 1989.).

Le profil d'hydrophilie (HOPP T.P. et WOODS K., 1981.) de cette séquence suggère que les deux extrémités N- et C-terminales de la protéine ont une forte probabilité d'être des épitopes B majeurs (Figure 22). Ceci implique que la protéine entière semble intéressante pour effectuer une étude immunologique (sérologique). A l'aide d'une protéine *vpr* recombinante incomplète provenant de la séquence de BH10/VIH-1, moins 8 acides aminés N-terminaux et 2 acides aminés C-terminaux, WONG-STAAAL et col. ont détecté des anticorps anti-*vpr* dans un tiers des sérums de sujets infectés par VIH-1 (WONG-STAAAL F et col., 1987.). La synthèse chimique d'une telle protéine (relativement petite) constitue une alternative intéressante à la technologie utilisant l'ADN recombinant surtout si l'on considère la possibilité d'obtenir la séquence entière incluant tous les acides aminés N- et C-terminaux absents de la protéine recombinante utilisée par WONG-STAAAL et col., tout en évitant la contamination par des protéines bactériennes (bactéries hôtes) qui peuvent conduire à des résultats sérologiques faussement positifs.

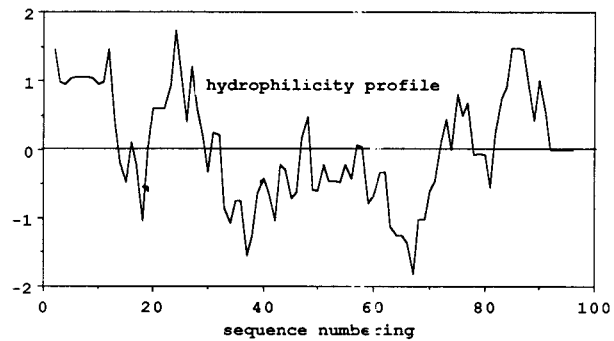


Figure 22 : Analyse de la séquence de la protéine vpr de VIH-1 LAV_{bru'} numérotée de 1 à 95 sur l'axe horizontal ("sequence numbering") selon des critères d'hydrophilie ("hydrophilicity profile") (HOPP T.P. et WOODS K.R., 1981). Les zones hydrophiles sont positives.

Nous avons donc synthétisé, suivant une technique en phase solide (MERRIFIELD R.B., 1963.), la protéine vpr entière (95 résidus) dérivée de l'isolat HIV-1 LAV_{bru}. Notre but était de disposer de suffisamment de matériel pour envisager l'étude de la réponse immune à vpr chez des sujets infectés par VIH, de son immunogénicité dans des modèles expérimentaux et de sa fonction biologique éventuelle, en collaboration avec l'équipe du Professeur A. CAPRON à l'Institut PASTEUR de LILLE.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Synthèse de la protéine vpr

La synthèse a été effectuée selon une stratégie utilisant la phase solide (MERRIFIELD R.B., 1963.) et une résine "PAM" (MITCHELL A.R. et col., 1976.) autorisant 95 étapes de déprotections sans clivage de l'ancrage. Le groupe tert.-butyloxycarbonyl (BOC), labile en milieu acide, a été utilisé pour protéger la fonction α -aminée de chaque acide aminé. Les chaînes latérales des acides BOC aspartiques et glutamiques ont été protégés sous forme d'ester de cyclohexyle (TAM J.P. et col., 1979 et DIMARCHI R.D. et col., 1982.) plutôt que sous forme d'ester benzylique parce que les premiers sont plus stables en milieu acide et qu'ils permettent de minimiser respectivement, la formation d'aspartimide et d'acide pyrrolidone carboxylique.

Le haut rendement de synthèse que nous avons obtenu a été rendu possible grâce à l'efficacité des étapes de couplage (8 excès d'acide aminé lors de chaque couplage) en utilisant systématiquement un double couplage, dans 2 solvants différents (DMF puis DCM) et en activant les acides aminés sous forme d'anhydrides symétriques très réactifs (HAGENMAEIR H. et col., 1972.),

	1 (82-95) resin 14 résidues		2 (46-95) resin 50 résidues		3 (26-95) resin 70 résidues		4 (1-95) resin 95 résidues		5
	Calc.	Theor.	Calc.	Theor.	Calc.	Theor.	Calc.	Theor.	
Asp	1.02	1	2.43	2	3.08	3	50.8	5	4.91
Thr	0.71	1	1.83	3	2.49	3	2.91	4	4.00
Ser	1.44	2	1.75	3	1.72	3	2.48	3	2.96
Glu	1.92	2	6.04	6	8.10	9	16.30	18	17.33
Pro					0.81	9	2.62	4	3.18
Gly	1.01	1	5.05	5	7.12	7	8.85	8	8.18
Ala	1.97	2	4.17	4	5.36	5	6.73	6	6.36
Val	0.94	1	1.94	2	2.69	3	3.23	3	3.15
Trp		0	ND	1	ND	2	ND	3	ND
Ile			4.79	6	6.60	8	7.64	8	7.97
Leu			2.95	3	4.82	5	8.45	9	9.41
Tyr			1.62	2	1.58	2	1.72	2	2.13
Phe			1.88	2	2.95	3	3.18	3	3.18
His		0	ND	2	ND	5	ND	6	5.25
Lys		4	8.72	8	10.27	9	12.16	11	10.90
Arg	3.61								

Tableau VI :

Analyse d'acides aminés de la protéine en cours d'élongation sur son support ("X resin", colonnes 1 à 4) ou après purification (colonne 5).

La valeur moyenne d'un acide aminé a été calculée suivant les valeurs des acides aminés les plus stables dans les conditions d'hydrolyse (Asp, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Lys, et Arg). ND = non déterminé.

préparés automatiquement avant chaque couplage, sans délai entre la neutralisation et l'étape de couplage. L'asparagine, la glutamine, l'arginine(Tos) et l'histidine(DNP) font exception et ont été couplées selon la méthode DCC/HOBt : cette précaution est particulièrement utile après les séquences Gln-Gln en position 84-86 et 64-65 et évite les terminaisons de chaîne par cyclisation en acide pyroglutamique. Les temps de couplage en anhydrides symétriques étaient respectivement de 26 et 34 minutes pour le premier et le second couplage. Ces temps ont progressivement été amenés à 32 et 40 minutes. Suivant la méthode DCC/HOBt, le temps de couplage était de 41 minutes en début de synthèse puis il a été amené progressivement à 47 minutes. Le programme du synthétiseur a été adapté pour optimiser le mélange par vortex pendant l'arrivée des solvants et des réactifs. Durant la synthèse, une partie de la peptidyl-résine (25%), correspondant à la séquence 45-95 de vpr, a été prélevée pour permettre des études immunologiques supplémentaires et un bon gonflement de la peptidyl-résine en cours d'élongation. En fin de synthèse, le poids de peptidyl-résine obtenu correspondait à un rendement global de 67%, autrement dit, à un rendement moyen de 99,6% par étape.

Le suivi de la synthèse a été effectué par analyse d'acides aminés provenant de l'hydrolyse d'échantillons de peptidyl-résine, prélevés à différentes étapes de la synthèse. La distribution des résidus dans la séquence a rendu possible la vérification de l'incorporation régulière des résidus, en utilisant l'Arg comme marqueur de la partie C-terminale de la molécule (8 résidus d'Arg sur 11 sont présents dans les 35 acides aminés C-terminaux) et Glu (Gln) comme marqueur de la partie N-terminale (9 résidus sur 18 sont présents dans les 26 acides aminés N-terminaux). Comme on peut le voir dans le Tableau VI, colonnes 1 à 4, les rapports molaires des acides aminés dans chaque échantillon sont proches des valeurs théoriques indiquant

l'absence de terminaison de chaînes durant la synthèse. Pour les deux derniers prélèvements, nous avons pu utiliser la Phe comme standard interne pour calculer le rendement de l'incorporation de Glu (Gln) au cours des 25 dernières étapes de synthèse : alors que le nombre de Phe reste constant, 9 Glu ou Gln ont été introduits durant la synthèse. L'augmentation de Glu (Gln) par rapport à Phe est de 7,14; cette valeur correspond à un rendement global de 79% ou à un rendement moyen de 99,11% par étape. Ce résultat est en très bon accord avec le rendement calculé sur la base du poids de peptidyl-résine obtenue en fin de synthèse (rendement global de 67% et rendement moyen par étape de 99,6%).

Après avoir couplé le dernier acide aminé, le DNP, groupement protecteur de l'histidine, a été supprimé par thiolyse avant d'effectuer la déprotection finale et le clivage du peptide selon la technique de "Low-High HF" (TAM J.P. et col., 1983.). Dans ces conditions, tous les groupes protecteurs sont éliminés.

Des essais préliminaires ont été effectués pour purifier le produit par CLHP :

- en chromatographie de filtration sur gel dans un tampon dissociant contenant de la guanidine 4 M, HCl sur une colonne Bio-Sil TSK-250 (Bio-Rad);
- en chromatographie d'interactions hydrophobes, sur une colonne (alkyl)aspartimide HIC (NEST GROUP), avec un tampon de départ contenant du sulfate d'ammonium 1,8 M et du phosphate de potassium 0,1 M, pH 7;
- en chromatographie en phase inverse, sur une colonne Vydac C4, dans un mélange eau/acétonitrile/TFA 0,05 %;

- en chromatographie d'échange d'ions, sur une colonne sulfoéthyl aspartimide SCX (NEST GROUP), dans un système tampon NaCl 0,2 M/phosphate de potassium 50 mM, pH 3,5.

Dans tous les cas, la formation d'aggrégats a pu être observée durant la chromatographie.

Etant donné que ces techniques chromatographiques hautement résolutive n'ont pas pu être utilisées, nous avons retenu la méthode la plus simple pour purifier la protéine vpr synthétique : le produit brut (600 mg) a d'abord été solubilisé dans le TFA (30 ml) avant d'être précipité dans l'éther diéthylique (300 ml) afin de supprimer la plupart des "scavengers" (pièges à carbocations) et des sous-produits hydrophobes non volatiles. Après centrifugation, la protéine a été redissoute dans l'eau (20 ml) puis, à l'aide d'une membrane à dialyse dont la limite d'exclusion était de 5000 de masse moléculaire, concentrée (10 ml) par ultrafiltration en conditions réductrices (à l'aide de tributylphosphine) et purifiée par dialyse d'abord en présence de 0,1% de détergent non ionique dialysable (O-octyl-D-glucopyranoside) dans l'eau (50 ml) puis, plus longtemps, contre de l'acide acétique à 1% dans l'eau (400 ml).

Comme nous n'avons pas effectué d'acétylation systématique ("capping" = blocage des chaînes peptidiques en cours d'elongation si le dernier résidu à coupler n'est pas fixé) à la fin de chaque cycle au cours de la synthèse, et étant donné que la purification par dialyse avait peu de chance de supprimer les peptides délétés différant de vpr par l'absence d'un seul acide aminé (BIRR C., 1978), nous avons pensé que l'analyse de la séquence pouvait être bien représentative de l'efficacité des couplages durant les dernières étapes de la synthèse. La séquence N-terminale du peptide purifié a été déterminée en effectuant 30 cycles de dégradation d'EDMAN. L'apparition prématurée

Cycle No.	Residue	Cumulative preview (%)	Average preview per step (%)
1	Gln	0.22	0.11
2	Ala	0.4	0.20
3	Pro	1.5	0.50
5	Asp	2.0	0.40
10	Arg	5.7	0.57
13	Thr	7.6	0.58
14	Asn	9.8	0.70
17	Thr	10	0.59
25	Lys	12	0.48
28	Ala	19	0.70

Tableau VII :

Analyse quantitative de la séquence de vpr.

L'apparition prématurée des acides aminés ("preview") a été calculée comme étant le rapport de l'aire du pic d'un acide aminé i au cycle $i-1$ sur la somme de l'aire du pic de l'acide aminé $i-1$ au cycle $i-1$ et de l'aire du pic de l'acide aminé i au cycle i . Tous les pics ont été corrigés du point de vue du bruit de fond.

(souvent appelée "preview") des acides aminés au cours des cycles successifs de dégradation constitue un bon indicateur du taux de délétions survenant pendant la synthèse. Le taux cumulé de "preview" a pu être quantifié à partir de 28 cycles de séquence (Tableau VII). Tenant compte des limites de précision dues à l'augmentation du bruit de fond, un taux cumulé de "preview" de 19% a été calculé. Cela correspond à un taux moyen de délétion de 0,6% par cycle de synthèse. Si l'on considère maintenant ces 0,6% de délétion comme un taux moyen sur 94 cycles de synthèse, nous pouvons estimer que, dans le produit purifié, 56% des chaînes ont la séquence désirée alors que 32% constituent un mélange de peptides très apparentés présentant une délétion d'un seul acide aminé n'importe où dans la séquence (BIRR C., 1978.).

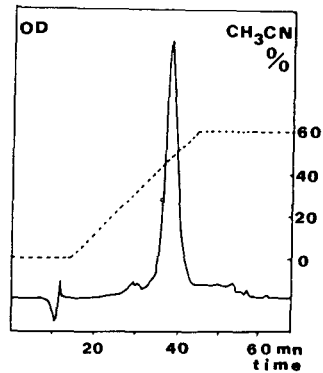
2 - Caractérisation chimique de vpr

a - Analyse d'acides aminés

Elle a été réalisée sur la protéine purifiée, après hydrolyses acides de 24, 48 et 72 heures, en vue d'obtenir la composition précise de la protéine, aussi bien pour les résidus difficiles à cliver que pour les acides aminés sensibles à l'hydrolyse. Ces analyses montrent que la protéine purifiée possède bien la composition en acides aminés attendue (Tableau VI, colonne 5).

b - CLHP en phase inverse analytique

La protéine vpr purifiée, analysée sur une colonne C4, présente un pic large mais unique et symétrique (Figure 23). Ce profil correspond très à la formation d'aggrégats qui a été confirmée par l'électrophorèse.



◆ Figure 23 : Analyse par chromatographie liquide haute pression en phase inverse de la protéine vpr synthétique purifiée. Colonne Vydac C4 300 Anstroms (7,5 x 100 mm). Détection à 215 nm et 0,64 de densité optique ("OD") pleine échelle.

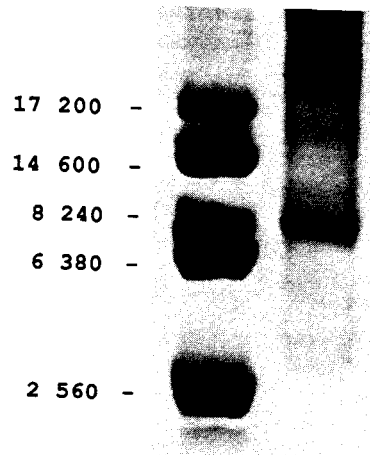


Figure 24 : Electrophorèse en gel de polyacrilamide (12,5 %) / urée 8M - SDS de la protéine vpr synthétique.

c - Electrophorèse en gel urée/SDS

Elle a été réalisée dans des conditions permettant la résolution maximale de peptides dont la masse moléculaire est inférieure à 10000.

En dépit des fortes conditions dénaturantes utilisées, 2 bandes majeures bien distinctes sont observables : la première présente un masse moléculaire apparente de 8500 alors que la seconde correspond au dimère (Figure 24). Quand on utilise des conditions réductrices plus fortes (tributylphosphine à la place du mercaptoéthanol dans le tampon échantillon), il est possible de n'obtenir que le monomère (Résultat non montré). La cystéine présente en position 86 dans vpr est donc responsable de la formation d'un dimère très stable.

3 - Détection d'anticorps spécifiques de vpr

Les sérums de 23 sujets séropositifs infectés par VIH ont été testés : 13 sujets étaient asymptomatiques (stade II CDC) et 10 sujets présentaient un SIDA déclaré (stade IV CDC).

En RIA en phase solide, des anticorps anti-vpr ont été détectés dans 26% des sérums : 3 sujets stade II (CDC) et 3 sujets (30%) stade IV (CDC). Aucun des 40 sujets sains servant de contrôle ne présentait d'anticorps anti-vpr. Cette fréquence de détection est du même ordre que celle établie pour d'autres produits de gènes régulateurs (*nef*, *vif* et *tat*) de VIH et qui est comprise entre 30 et 65% selon l'antigène (KHALIFE J. et col., 1988 et GREEN M. et LOCUVENSTEIN P., 1988.).

	<i>vpr</i>	<i>nef</i>	<i>p24</i>
Healthy controls (40 sera)	0%	0%	0%
CDC Stage II (13 sera)	23%	61%	84%
CDC Stage IV (10 sera)	30%	30%	40%

Tableau VIII :

Mesure de la fréquence de la réponse anticorps vis-à-vis des produits des gènes de régulation *vpr* et *nef* et de la protéine structurale *P24* du virion, chez des sujets séropositifs infectés par VIH-1 ("CDC stage II" et "CDC stage IV") et chez des sujets sains témoins ("healthy control").

A l'aide du même test et des mêmes sérums, la réponse anticorps a été testée vis-à-vis d'un autre produit de gène régulateur (*nef*, le "negative regulatory factor"). Comme on peut le voir dans la Tableau VIII la fréquence de reconnaissance de *vpr* par les sérums est inférieure ou égale à celle de la reconnaissance de *nef*. Contrairement à la réponse anticorps à *nef* qui est, comme la réponse anticorps à la protéine p24 (*gag*) du noyau viral, moins fréquente au stade le plus avancé de la maladie, la réponse à *vpr* ne diffère pas significativement chez les sujets asymptomatiques par rapport aux sujets présentant un SIDA déclaré, suggérant par là l'absence de corrélation avec une progression de la maladie.

Les sérums de 8 sujets séropositifs ont également été analysés dans une technique de transfert de Western. 4 sérums ont réagi avec la protéine synthétique électrotransférée (Figure 25A). D'une façon tout à fait intéressante, même si la forme monomère de *vpr* était majoritaire comme l'avait révélé la coloration au bleu de Coomassie ou à l'"Amido black", les anticorps de sujets infectés ont reconnu préférentiellement la forme dimère de *vpr* (Figure 25B). Ceci nous incite à penser que la forme dimère de *vpr* pourrait correspondre à la structure naturellement vue par le système immunitaire durant l'infection par VIH puisque le test que nous avons réalisé nous montre que les anticorps reconnaissant cette structure sont plus nombreux ou peut-être plus affins.

La réponse anticorps à *vpr* est actuellement analysée dans une population plus large de patients infectés par VIH-1, comprenant des sujets infectés séronégatifs qui présentent une réponse anticorps vis-à-vis du produit du gène de régulation *nef* (IMAGAWA D.T. et col., 1989.).

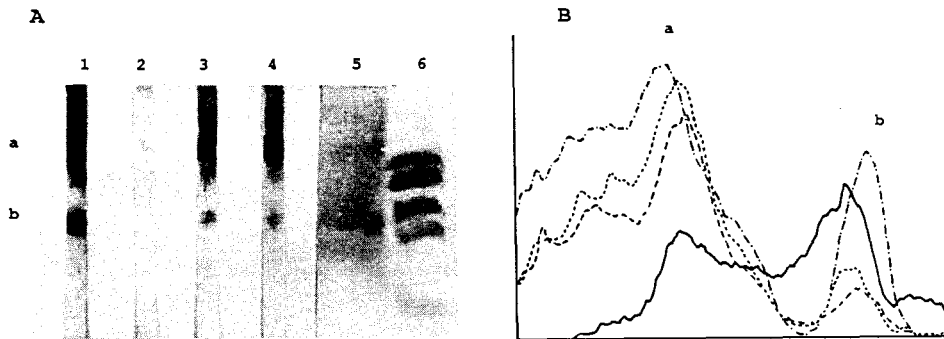


Figure 25 :

(A) Identification des anticorps anti-vpr en transfert de Western dans les sérums de sujets infectés par VIH-1 (bandes 1 à 4). Des témoins de poids moléculaire ont été utilisés au cours de l'électrophorèse qui a précédé le transfert (bandes 6 : 17200, 14600, 8240, 6380, 2560).

(B) Analyse vidéodensitométrique des bandes de nitrocellulose colorées par réaction immunoenzymatique à la peroxydase après réaction des sérums de sujets infectés (-.-. = bande 1, = bande 3, ---- = bande 4) ou par une technique non spécifique de coloration des protéines, l'amido black en l'absence de sérum (____ = bande 5). L'axe horizontal correspond à la distance de migration dans le gel. D'après les témoins de poids moléculaire, (a) correspond à vpr dimère et (b) à vpr monomère.

La disponibilité de grandes quantités de protéine vpr synthétique a permis d'envisager de débiter l'exploration de la réponse cellulaire T à cette protéine chez des sujets infectés par VIH, ainsi que l'étude de son immunogénicité dans différents modèles animaux. De la même façon qu'il a été possible d'étudier le produit du gène de régulation tat (86 résidus) de VIH qui a été synthétisé chimiquement (GREEN M. et LOCUVENSTEIN P., 1988.), la fonction de vpr pourrait être explorée en testant l'effet potentiel de la protéine vpr synthétique sur les cellules infectées ou non du système immunitaire.

C - CONCLUSION

La synthèse de protéines entières présente plusieurs avantages par rapport à la production de protéines recombinantes :

- les produits sont chimiquement définis, facilitant le contrôle de qualité et la reproductibilité de la production;
- il n'y a pas de contamination par des sous-produits bactériens qui pourraient provoquer des effets pyrogènes dans le cadre d'un vaccin, ou des phénomènes reconnaissance non spécifique dans le cadre d'un test diagnostique, ou diminuer la stabilité du produit à température ambiante (si des protéases étaient présentes);
- le coût de production est probablement souvent moins élevé.

Il subsiste toutefois un défaut commun aux deux technologies : le masquage d'épitopes naturels, dû à un mauvais repliement (ne correspondant pas au repliement naturel) de la chaîne peptidique. Néanmoins dans le cas de vpr, l'association de 2 chaînes (correspondant certainement à un phénomène naturel) a permis une meilleure reconnaissance par des anticorps ayant vu la

protéine native. Cette restructuration quaternaire a très probablement permis la reconstitution d'épitopes naturels.

La formation d'aggrégats, pouvant être mise en relation avec un profil inhabituel d'hydrophobicité, n'a pas permis la purification complète de la protéine synthétique vpr par des techniques de chromatographie hautement résolutive.

Le peptide synthétique correspondant au produit entier du gène vpr de VIH devrait toutefois représenter un outil très précieux, exempt de toute contamination biologique significative, qui permettra l'étude de la réponse immune de sujets infectés par VIH et de divers modèles animaux, tant d'un point de vue diagnostique que d'un point de vue vaccinal.

III - DETECTION D'ANTICORPS ANTI-PEPTIDES DE NEF (ET ANTI- PROTEINE NEF) CHEZ DES SUJETS INFECTES PAR VIH-1 MAIS SERONEGATIFS

A - INTRODUCTION

La période de silence sérologique (latence) qui suit l'infection par le virus d'immunodéficience humain (VIH) et précède la séroconversion, constitue un grand problème pour le dépistage du virus ("screening"), notamment dans les banques de sang. Actuellement, la séropositivité à VIH (séroconversion) est définie par la présence, dans le sérum du sujet infecté, d'anticorps dirigés contre les protéines structurales du virion, c'est-à-dire les protéines codées par les gènes *gag*, *pol* et *env*.

Mis à part quelques cas détaillés d'infection par du sang contaminé (VITTECOQ D. et col., 1986, NEISSON-VERNANT C. et col., 1986 et ALLAIN J.P. et col., 1986.), la durée de la période de latence n'est pas connue. Des cultures positives de VIH ont été rapportées chez des sujets séronégatifs (MAYER K.H. et col., 1986.) et l'existence de périodes de latence prolongées chez des sujets contaminés par voie sexuelle a été l'objet de multiples controverses (RANKI A. et col., 1987, COUROUCE A.M. et col., 1987 et GROOPMAN J.E. et col., 1988.). Récemment, on a pu détecter des séquences d'ADN proviral chez 5 sujets séronégatifs à risque pour l'infection par VIH (LOCHE M. et col., 1988.) et chez 5 enfants de mères infectées qui avaient perdu les anticorps maternels anti-VIH à l'âge de un an (LAURE F. et col., 1988.). Il a également été montré que du sang abusivement jugé négatif en sérologie, avait causé la transmission du virus lors de transfusions sanguines (WARD J.W. et col., 1988.). La connaissance des mécanismes impliqués dans le

maintien de la période de latence est encore très fragmentaire et leur étude serait très utile en vue de développer diverses stratégies antivirales.

A côté des protéines structurales, le provirus code également pour des protéines non structurales, impliquées dans des phénomènes de régulation du provirus. Bien qu'absentes du virion, elles sont exprimées par les cellules infectées et elles jouent un rôle très important dans la synthèse de virions infectieux (CHEN I.S.Y., 1986.). La détection d'anticorps dirigés contre le produit de gènes de régulation a été mise en évidence il y a trois ans chez six sujets, quelques mois avant la séroconversion complète, mais qui présentaient déjà des anticorps anti-protéines structurales (*gag* et *env*) ou de l'antigène viral *gag* lui-même (RANKI A. et col., 1987.).

L'un de ces gènes de régulation, *nef* ("negative enhancer factor" ou *3'orf* ou *F*), code pour une protéine de 27 kDa reconnue par le sérum d'un tiers des sujets séropositifs (KHALIFE J. et col., 1988, ALLAN J.S. et col., 1985 et FRANCHINI G. et col., 1986.). *Nef* est impliquée dans la régulation négative de la réplication virale et pourrait ainsi participer à l'établissement de la période de latence du provirus VIH dans les cellules infectées (LUCIW P. et col., 1987, GUY et col., 1987 et AHMAD N. et col., 1988.).

Nous avons donc cherché à savoir, en collaboration avec l'équipe du Professeur A. CAPRON à l'Institut PASTEUR de LILLE, si le produit du gène *nef* est exprimé *in vivo* et s'il peut induire une réponse immune spécifique pendant la phase de latence, en l'absence de toute synthèse détectable de virion. Pour cela nous avons utilisé le produit recombinant purifié du gène de régulation *nef* et 6 peptides synthétiques dérivés de la séquence de cette protéine et sélectionnés selon des critères statistiques et thermodynamiques.

	HIV ₁ serology ELISA, WB	Seric p24/25 antigen	HIV ₁ culture	HIV ₁ DNA	Anti- <i>nef</i> protein antibodies		Anti- <i>nef</i> peptide antibodies
					WB	RIA (isotype)	RIA
1: 88/2	-	-			+	IgA	P1-6
88/2	-	-		+	+	IgA	P1-3,5
88/3	-	-			+	IgG1	P2,5
88/4	-	-	-				
88/5	-	-					
88/6	-	-		+	+	IgG1,G4	P2,5
88/9	-	-					
2: 87/10	-	-			-	IgG1,G4	P1,3
88/5	-	-		+	+	IgG1	P1,3,5,6
88/9	-	-					
3: 87/11	-	-			-	IgA,E	P3,5
88/1	-	-			+	IgA	P1,6
88/2	-	-			-	-	P2,5,6
88/3	-	-	-		-	IgG1,G4	P2,5
88/5	-	-		+	-	IgG4	P5
88/6	-	-	-		-	IgG1,G4	P2,4,5
88/9	-	-					
4: 87/10	-	-				IgG1,G4	P2,4,5
88/5	-	-		+		IgG1	P2,4,5
5: 88/5	-	-		+	-	IgG4	P5
88/9	-	-					
6: 88/5	-	-		+	-	-	P2,4,5
88/9	-	-					
7:	-	-	-	+	+	IgM,G4,A	P1,2,4,6
8:	-	-		+	+	IgG4,A,E	P2,5
9:	-	-	-	+	-		
10:	-	-		-	-	-	-
11:	-	-		-	-	-	-
12: 87/6	+						
87/9	+				+	IgG4	P2,4,5
87/10	+				+	IgE	
87/11	+				+	IgG4	P2,4,5
88/1	-	-		+	+	IgG1,G4,E	P2,4,5
88/4	-	-			+	IgG4	P2,4,5

Tableau IX :

Détection d'anticorps spécifiques de la protéine *nef* et détection de séquences d'ADN de VIH-1 chez des sujets séronégatifs à risque vis-à-vis de l'infection par VIH (1 à 11), ou chez un sujet ayant subi une séronégativité spontanée (12) (DNA = ADN, ELISA = test immunoenzymatique, RIA = test radioimmunologique, WB = transfert de Western, anti-*nef* protein antibodies = anticorps anti-protéine *nef*, anti-*nef* peptide antibodies = anticorps anti-peptide de *nef*).

Ces produits ont été utilisés en tant qu'antigène dans un test de transfert de Western et dans un test radioimmunologique (RIA).

B - RESULTATS

1 - Detection d'anticorps anti-proteine nef et anti-peptides de nef chez des sujets séronégatifs à risque pour l'infection par VIH

Le groupe A (n = 17) était composé de sujets séronégatifs vis-à-vis de VIH-1 (ELAVIA, DIAGNOSTICS PASTEUR; EIA, ABBOTT; transferts de Western, DU PONT DE NEMOURS et DIAGNOSTICS PASTEUR) et antigène P24/25-négatifs (kit EIA HIV ANTIGEN, ABBOTT), sélectionnés parcequ'ils présentaient un risque d'être infectés par VIH (partenaires sexuels réguliers d'une ou plusieurs personnes séropositives vis-à-vis de VIH). Il est à noter que ces sujets étaient également séronégatifs vis-à-vis de VIH-2 (Transfert de Western, DIAGNOSTICS PASTEUR).

En transfert de Western, 7 individus sur 17 de ce groupe présentaient des anticorps dirigés contre la protéine nef recombinante et, de façon transitoire, il en allait de même pour 1 des 4 sujets suivis sur plusieurs mois (Tableau IX).

Pour analyser plus avant la réponse immune à nef, un test radioimmunologique (RIA) a été utilisé. Cela nous a permis de connaître à la fois la distribution isotypique des anticorps anti-nef et les épitopes reconnus. Parmi les 17 sujets du groupe A, 10 dont les 7 positifs vis-à-vis de nef en transfert de Western possédaient des anticorps anti-nef détectables en RIA. La réponse anti-nef était polyisotypique, variant d'un sujet positif

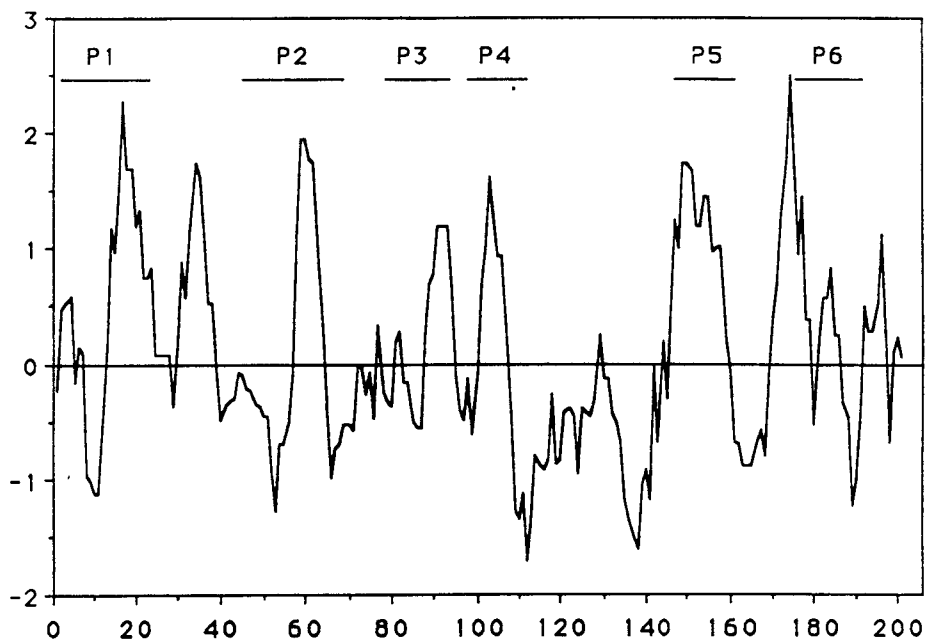


Figure 26 : Analyse de la séquence de la protéine nef de VIH-1 LAV_{bru} (numérotée de 1 à 206 sur l'axe horizontal) selon des critères d'hydrophilie (HOPP T.P. et WOODS K.R., 1981). Les zones hydrophiles sont positives.

à l'autre (Tableau IX). Toutefois, les principaux isotypes représentés étaient IgG₁, IgA et IgG₄ (dans 50% des sérums présentant des anticorps anti-*nef* en RIA) et un seul sérum contenait des IgM. Ceci suggère que la réponse anticorps à *nef* avait déjà l'aspect d'une réponse secondaire. De plus, la moitié des sérums possédait des anticorps anti-*nef* présentant l'isotype IgG₄ qui apparaît habituellement après une stimulation antigénique longue ou répétée, associée à une désensibilisation allergique (AALBERSE R.C. et col., 1983.) ou à une infection parasitaire chronique (HUSSAIN R. et OTTESEN R.A., 1986.).

Après avoir sélectionné des zones de *nef* selon une analyse d'algorithmes basés sur des critères d'hydrophilie (critères thermodynamiques) (Figure 26), d'hélicité α , de mobilité et d'amphiphilie (critères statistiques), nous avons synthétisé 6 peptides (1-23 = P1, 45-69 = P2, 79-94 = P3, 98-112 = P4, 148-161 = P5 et 177-191 = P6). La moitié seulement des sérums ont été testés en RIA vis-à-vis de chaque peptide et tous les sérums ont été testés viv-à-vis des 3 peptides P2, P4 et P5. Ainsi, P5 et P2 se sont révélés être les 2 peptides immunodominants et ils étaient reconnus respectivement par 80 et 65% des sérums positifs en RIA vis-à-vis de *nef* (Tableau IX).

Une étude cinétique retrospective de 12 sujets homosexuels hommes, VIH-1-séropositifs ayant des partenaires multiples a montré que la présence d'anticorps anti-*nef* précède souvent la séroconversion bien que les résultats soient quelque peu différents de ceux obtenus dans l'étude cinétique prospective effectuée sur le groupe A où les sujets étaient à risque vis-à-vis de l'infection par VIH et séronégatifs. En effet, l'étude retrospective a montré que des anticorps anti-*nef* pouvaient être détectés 3 mois avant la séroconversion chez 1 sujet et 2 à 4 semaines avant la séroconversion chez 3 sujets (anticorps anti-*nef* mis en évidence chez 33% des sujets de ce groupe).

Par contre l'étude prospective a clairement montré l'absence de séroconversion durant les 6 à 10 mois suivant la détection des anticorps anti-*nef* mis en évidence chez plus de 70% des sujets. Les différences majeures entre les deux groupes résident dans le nombre de partenaires sexuels plus élevé dans le groupe d'hommes homosexuels, et dans l'hétérogénéité de la population trouvée au sein du groupe A (certainement plus représentative d'une population normale). Aussi, il serait intéressant de savoir si le degré et le mode d'exposition au virus ainsi que l'exposition à de multiples souches virales jouent un rôle dans les différences observées.

2 - Sensibilité et spécificité du test radioimmunologique (RIA)

La technique RIA utilisée a permis de détecter plus de sérums positifs vis-à-vis de *nef* au sein du groupe A (10/17) que n'a pu le faire le transfert de Western (7/17). De plus la technique RIA utilisant les peptides de *nef* comme antigène a permis la détection d'un plus grand nombre de sérums positifs (12/17) que l'utilisation de la protéine recombinante (10/17). Ces résultats peuvent être mis en relation soit avec une plus grande sensibilité, comme cela a déjà été rapporté dans le cas des peptides de la glycoprotéine d'enveloppe virale gp41 (GNAAN J. et col., 1987.), soit avec un manque de spécificité du test. En routine le test RIA utilisait les sérums humains à la dilution de 1/50 et le transfert de Western, à la dilution de 1/100. 4 sérums qui étaient positifs vis-à-vis de *nef* en RIA et négatifs en transfert de Western dans ces conditions ont été testés en RIA à différentes dilutions, du 1/25 au 1/200. Les anticorps dirigés contre *nef* et les peptides de *nef* ont pu être détectés en RIA jusqu'à la dilution de 1/1000 démontrant par là une plus grande sensibilité de la technique RIA par rapport au transfert de Western.

Antigen:	NEF			P2			P5		
	NEF	BSA	OVA	NEF	BSA	OVA	NEF	BSA	OVA
preincubation with:	NEF	BSA	OVA	NEF	BSA	OVA	NEF	BSA	OVA
Inhibition of the antibody response:									
A: IgG ₁	86.7	8.7	0	100	8.7	8.7	-	-	-
B: IgG ₁	66	19.4	23.6	-	-	-	100	0.9	0
C: IgG ₄	61.2	0	0	100	0	8.6	100	0	0
D: IgG ₁	99.2	4.2	25.2	99.1	0	0	100	7.5	0
IgG ₄	100	7.5	0	-	-	-	-	-	-

Tableau X :

Inhibition de la détection radioimmunologique d'anticorps spécifiques ("inhibition of the antibody response") de nef et des peptides de nef par préincubation avec ("preincubation with") la protéine nef recombinante.

"BSA" = albumine sérique bovine et "OVA" = ovalbumine.

A à D représentent 4 sérums différents.

"-" absence de réponse anticorps spécifique de l'antigène quand le sérum est préincubé seulement dans du tampon.

En faveur de la spécificité de l'utilisation des peptides en RIA on a pu observer (I) qu'aucun sérum des sujets du groupe A n'a réagi avec un peptide témoin de 10 acides aminés (le LH-RH); (II) que la préincubation des sérums positifs vis-à-vis de *nef* avec la protéine *nef* recombinante inhibe la réponse à la protéine recombinante mais aussi la réponse aux peptides P2 et P5, alors (III) que leur incubation avec des protéines non apparentées (ASB ou ovalbumine) n'a qu'un effet inhibiteur mineur ou pas d'effet du tout (Tableau X); (IV) qu'aucun des 54 sérums négatifs témoins (groupe B, composé de donneurs de sang séronégatifs sans risque connu d'être infectés par VIH) ne présente de réponse anticorps détectable anti-*nef* ou anti-peptides de *nef*. (V) Enfin, la détection de séquences d'ADN de VIH (MULLIS K.B. et FALOONA F.A., 1987 et OU C.Y. et col., 1988.) a apporté un argument supplémentaire de poids en faveur de la spécificité correcte de la technique RIA : la présence d'ADN proviral de VIH-1 a été recherchée dans les cellules mononucléaires périphériques du sang chez 11 sujets du groupe A dont 8 étaient positifs et 3 négatifs vis-à-vis de *nef* en RIA; des séquences du gène *gag* ont été détectées chez 9 des 11 sujets du groupe A, dont tous les sujets testés (8/9) qui possédaient des anticorps anti-*nef* ou anti-peptides de *nef* (Tableau IX); les 2 sujets (2/11) ne présentant pas de séquence de *gag* n'avaient pas non plus d'anticorps dirigés contre *nef* détectables en transfert de Western ni en RIA, pas plus que d'anticorps anti-peptides de *nef*.

3 - Persistance des anticorps anti-*nef* et anti-peptides de *nef* (et de séquences d'ADN du virus VIH) après une séro-négativisation spontanée

Un cas très intéressant de passage d'un état séropositif à un état séronégatif a également été étudié (Tableau IX). Une femme asymptomatique avait été déterminée séropositive en juin 1987 et l'est restée pendant 4 mois

et demi selon les techniques d'ELISA, de transfert de Western et de RIPA. En janvier 1988, cette femme est spontanément devenue complètement séronégative, antigène P24/25 négative et toujours asymptomatique, pendant 4 mois. Néanmoins il a été possible de détecter de l'ADN proviral de VIH-1 en janvier 1988 et les anticorps spécifiques de nef et des peptides de nef (P2, P4 et P5) ont persisté, indiquant par là que la séronégativisation n'était pas reliée à l'élimination des cellules infectées et que la présence du virus pouvait encore être détectée immunologiquement.

Ce cas de séronégativisation tend à montrer, comme certains auteurs l'ont déjà indiqué, que l'infection par VIH peut impliquer des phases de latence successives, non seulement avant mais aussi, dans certains cas, après l'initiation de la réplication virale chez le sujet infecté (FARZADEGAN H. et col., 1988.). En dépit de cela, l'ADN viral et les anticorps anti-nef persistent après séronégativisation. et représentent donc de bons marqueurs de l'infection.

C - DISCUSSION

Une équipe allemande a récemment recherché les épitopes de nef reconnus par le sérum de sujets séropositifs ou séronégatifs vis-à-vis de VIH-1, à risque pour l'infection (GOMBERT F.O. et col., 1990.). Pour cela ils ont fait réagir ces sérums en ELISA, avec 3 séries de plus de 200 nonapeptides superposés, fixés de façon covalente au support après synthèse selon la technique de GEYSEN M. et col. (GEYSEN M. et col., 1987.). 9 zones épitopiques étaient assez bien reconnues par l'ensemble des sérums et, parmi elles, 5 sont retrouvées dans 5 des 6 peptides que nous avons utilisés. Ces résultats valident notre prédiction des zones antigéniques de nef qui, bien qu'incomplète, s'est révélée très spécifique. Néanmoins, un des peptides

immunodominants que nous avons révélé (P5 = 148-161), n'est pas détecté dans l'étude allemande. GOMBERT F.O. et col. supposent que la présence de nombreux résidus chargés dans ce peptide (9/14 résidus) peut être à l'origine d'un manque de spécificité du test RIA que nous avons utilisé. Cet argument n'est pas valable pour deux raisons : (I) s'il y a 9 charges potentielles dans ce peptide, elles ne sont pas toutes de même signe et elles sont réparties tout au long du peptide, ce qui pouvait difficilement autoriser le peptide P5 à jouer un rôle d'"échangeur d'ions"; (II) ceci est confirmé par le fait qu'aucun des 54 sérums VIH-négatifs, utilisés comme contrôle, n'a reconnu P5 en RIA. L'explication la plus probable est, en partie, apportée par les auteurs eux-mêmes, et elle met en avant la limite de la technique de GEYSEN M. et col. : le peptide P5 que nous avons sélectionné, entre autres, pour son fort potentiel α -hélicoïdal contient 14 résidus et pouvait donc adopter une structure secondaire plus stable (ou plus facilement stabilisable par un anticorps) que les peptides de 9 résidus utilisés par l'équipe allemande; ainsi, le peptide P5 pouvait être reconnu plus aisément par des anticorps spécifiques d'un épitope conformationnel continu sur la protéine nef native.

Une fois rassemblés, nos résultats suggèrent que les produits des gènes de régulation de VIH, en particulier nef, peuvent être exprimés et immunogènes pendant la phase dite de silence sérologique succédant à l'infection par VIH. Même si ces résultats sont encore préliminaires, ils nous montrent qu'en sélectionnant des sujets à risque et en recherchant dans leur sérum la présence d'anticorps anti-nef il est possible de dépister ceux qui présentent une infection latente par VIH, non détectable par les tests diagnostiques utilisés en routine.

Bien qu'il ait été montré que la transfusion de sang de donneurs déterminés séronégatifs puisse conduire à la transmission de l'infection par



VIH (WARD J.W. et col., 1988.), on ne sait pas, à l'heure actuelle, dans quelle mesure le sang de donneurs possédant des anticorps anti-nef détectables, présentant de l'ADN proviral de VIH et séronégatifs selon les critères usuels, peut être infectieux pour le receveur. Il sera donc nécessaire d'étudier la spécificité, la fréquence et la signification de ces nouveaux marqueurs pour connaître leur valeur diagnostique et pronostique réelle et leur utilité potentielle dans le contrôle des dons de sang. La technique d'amplification de l'ADN, permettant la recherche d'ADN proviral de VIH dans les cellules mononucléaires périphériques du sang, bien que très sensible et spécifique, si effectuée finement, ne peut pas être utilisée en routine car elle constitue une technique lourde et délicate à mettre en oeuvre.

Un test diagnostique, basé sur la détection d'anticorps anti-nef suivie d'une confirmation par la détection de la présence d'ADN proviral de VIH constituerait toutefois un procédé très intéressant de dépistage précoce de l'infection. Il serait plus performant car il n'existe, à l'heure actuelle, aucun diagnostic efficace de l'infection pendant la période de latence ("silence immunologique"). Un tel procédé serait utile également pour étudier les périodes de silence sérologique rencontrées lors de l'infection.

Comme nous l'avons déjà vu, la détection des anticorps anti-nef est plus sensible lorsqu'elle est effectuée en RIA plutôt qu'en transfert de Western, et lorsque des peptides dérivés de nef sont utilisés comme antigène, plutôt que la protéine recombinante elle-même. Or, la mise en oeuvre d'un test radioimmunologique nécessite des habilitations et des protections spécifiques qui rendent cette technologie difficile à utiliser en routine. C'est pourquoi nous avons tenté de développer, en collaboration avec un partenaire industriel et l'équipe du professeur CAPRON, un test immunoenzymatique

(ELISA) dans lequel les antigènes susceptibles d'être reconnus par les anticorps anti-*nef* étaient composés de peptides immunodominants, dérivés de la protéine *nef*, fixés au fond des puits de plaques de microtitration. Malheureusement, nous ne sommes pas encore parvenus à être assez sensibles pour détecter les anticorps anti-*nef* avec une fréquence aussi élevée qu'en RIA. Et, lorsque nous parvenions à atteindre une sensibilité acceptable, cela était au détriment de la spécificité. Nous révélions alors trop de sujets faussement positifs, rendant ainsi le test inutilisable. Le manque de sérums positifs vis-à-vis de *nef* (en RIA/peptides) et de protéine *nef* recombinante pure n'a pas facilité la calibration de notre test tout au long de son développement. De son côté, notre partenaire industriel qui essayait de développer un test ELISA de détection des anticorps anti-*nef*, en utilisant la protéine recombinante comme antigène, a rencontré des difficultés similaires. Ceci nous a permis de confirmer que les difficultés que nous avons rencontrées n'étaient pas dues spécifiquement au matériel peptidique utilisé en tant qu'antigène mais bien à la technologie ELISA, pas assez sensible actuellement pour révéler *in vitro* le signal très faible que nous recherchions. Ce projet est donc pour l'instant en suspens.

Finalement, mis à part leur intérêt diagnostique potentiel, nos observations pourraient avoir des implications certaines dans le développement de stratégies vaccinales anti-VIH. Les candidats vaccins développés jusqu'à présent sont basés uniquement sur l'immunisation par les protéines recombinantes *gp160* ou *gp120*, produits du gène structural *env* ou même le virion VIH entier inactivé (ZAGURY D. et col., 1988, SALK J., 1987 et LEVINE A.M. et col., 1988.) mais ils semblent inefficaces dans la prévention de l'infection par VIH dans les modèles expérimentaux utilisés (HU S.L. et col., 1987 et BERMAN P.W. et col., 1988.). De plus, les anticorps dirigés contre le produit de *env* peuvent jouer un rôle dans l'infection virale des

cellules possédant un récepteur Fc des immunoglobulines et ce, par l'intermédiaire de ce récepteur Fc (ROBINSON W.E. et col., 1988.).

Le fait que la protéine *nef* puisse être exprimée *in vivo* avant l'initiation de la réplication virale nous amène à reconsidérer les vaccins basés uniquement sur l'utilisation de protéines du virion. Les protéines de régulation ou des peptides bien sélectionnés à partir de leur séquence, pourraient diriger effectivement la réponse immune vers la destruction des cellules infectées à un stade précoce de l'infection par VIH, avant l'initiation de la synthèse virale, et pourraient donc être considérés comme autant de vaccins potentiels contre VIH.

D - CONCLUSION

Il apparaît ici que la protéine *nef* est immunogène chez l'homme et que des anticorps anti-*nef* sont présents et persistent chez des individus infectés, en l'absence de toute synthèse détectable de virions VIH-1, *in vivo*.

L'utilisation de peptides synthétiques, sélectionnés sur la base de la séquence de *nef*, s'est révélée plus sensible que l'emploi de la protéine elle-même pour détecter des anticorps spécifiques chez des sujets infectés. Ces résultats mettent en évidence l'intérêt d'utiliser en diagnostic des peptides synthétiques (hormis leur faible coût de fabrication). Ces derniers, judicieusement choisis (certains présentant une conformation privilégiée), peuvent s'avérer plus performants que la protéine recombinante qui a peu de chance en se repliant (si toutefois elle se replie), d'adopter une structure spatiale identique à celle de la protéine naturelle qui a été présentée au système immunitaire. La protéine recombinante peut aussi faire disparaître

des épitopes B présents à la surface de la protéine native ou faire apparaître des épitopes inexistant dans cette dernière. Le peptide synthétique, lui, peut mimer un épitope B séquentiel (relativement rares dans les protéines), un épitope B conformationnel continu (boucle, hélice α) ou, partiellement, un épitope B conformationnel discontinu, par contre, il ne peut en aucun cas masquer un épitope B naturel. Ces éléments peuvent expliquer les observations que nous avons faites dans la recherche des anticorps anti-nef.

Le même raisonnement peut être extrapolé à une nouvelle stratégie vaccinale anti-VIH, basée sur l'utilisation de peptides synthétiques.

IV - MODULATION DE L'ORGANISATION α -HELICOIDALE D'UN PEPTIDE SYNTHETIQUE ET CORRELATION AVEC SON ANTIGENICITE

A - INTRODUCTION

Les peptides synthétiques sont de plus en plus couramment utilisés comme antigène dans les nouveaux tests sérodiagnostiques. Au cours de ces tests, les peptides interagissent avec des anticorps qui sont dirigés contre des zones d'acides aminés présentés au système immunitaire dans le contexte étroit de la protéine repliée dans sa conformation naturelle. Parmi les différentes conformations qu'un peptide peut adopter au sein d'une protéine, l'hélice α présente l'avantage d'être reproductible par des peptides synthétiques de taille moyenne.

Notre but a été d'évaluer l'influence des différents degrés d'organisation α -hélicoïdale (analysés par dichroïsme circulaire en solution aqueuse) d'une séquence peptidique sur sa reconnaissance (antigénicité) par rapport à des anticorps dirigés contre la protéine native. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Docteur P. DRUILHE à l'Institut PASTEUR de PARIS.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Constructions adoptées

Nous avons choisi de travailler avec un peptide de 17 résidus d'acides aminés correspondant à la séquence 13-29 de l'antigène du stade hépatique (LSA pour "liver-stage antigen") du parasite *Plasmodium falciparum*, l'agent pathogène de la malaria (GUERRIN-MARCHAND P. et col., 1987.).

(+) Lys - Glu - Lys - Leu - Gln - Glu - Gln - Gln - Ser - Asp - Leu - Glu - Gln - Glu - Arg - Leu - Ala (-)

Acétyl - Lys - Glu - Lys - Leu - Gln - Glu - Gln - Gln - Ser - Asp - Leu - Glu - Gln - Glu - Arg - Leu - Ala - amide

Alb - Ala - Alb - Lys - Glu - Lys - Leu - Gln - Glu - Gln - Gln - Ser - Asp - Leu - Glu - Gln - Glu - Arg - Leu - Ala - Alb - Alb

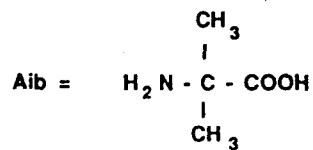


Figure 27 : 3 constructions du peptide LSA 13-29, différenciables au niveau des extrémités N- et C-terminales (Construction 1 en haut, Construction 2 au milieu et Construction 3 en bas). L'acide aminoisobutyrique (Aib) est également figuré.

3 peptides ont été synthétisés, se différenciant au niveau de leurs extrémités N- et C-terminales (Figure 27) :

- Construction 1, dont l'extrémité N-terminale est NH_2 et l'extrémité C-terminale est COOH ;
- Construction 2, dont l'extrémité N-terminale est N^α -acétyle et l'extrémité C-terminale est carboxamide (synthétisée sous forme amide, CONH_2 , sur une résine benzhydrylamine et acétylée en fin de synthèse);
- Construction 3, dans laquelle des résidus d'acide α -amino isobutyrique (Aib), ont été incorporés au niveau des extrémités N-terminale = N^α - (Aib-Ala-Aib) et C-terminale = C^α - (Aib-Aib). Les Aib ont été introduits sous forme de dérivés N^α -BOC, selon un protocole classique de synthèse dans la structure peptidique.

2 - Conformation des constructions peptidiques

La Figure 28 nous montre les spectres de dichroïsme circulaire reflétant la conformation des différentes constructions en milieu aqueux. Le peptide synthétisé en préservant les extrémités ionisables (Construction 1) était dépourvu de toute organisation. La même séquence construite avec des extrémités N^α -acétyle et C^α -amide non ionisables (Construction 2) présentait une organisation α -hélicoïdale naissante. Ces résultats confirment ceux de YORK E.J. et col. montrant que la présence d'une charge positive en position N-terminale et d'une charge négative en position C-terminale diminue très fortement l'organisation α -hélicoïdale à cause de l'interaction défavorable avec le dipôle de l'hélice (orienté en sens inverse), généré par les liaisons hydrogènes parallèles à l'axe de l'hélice (YORK E.J. et col., 1986.) (Figure 43).

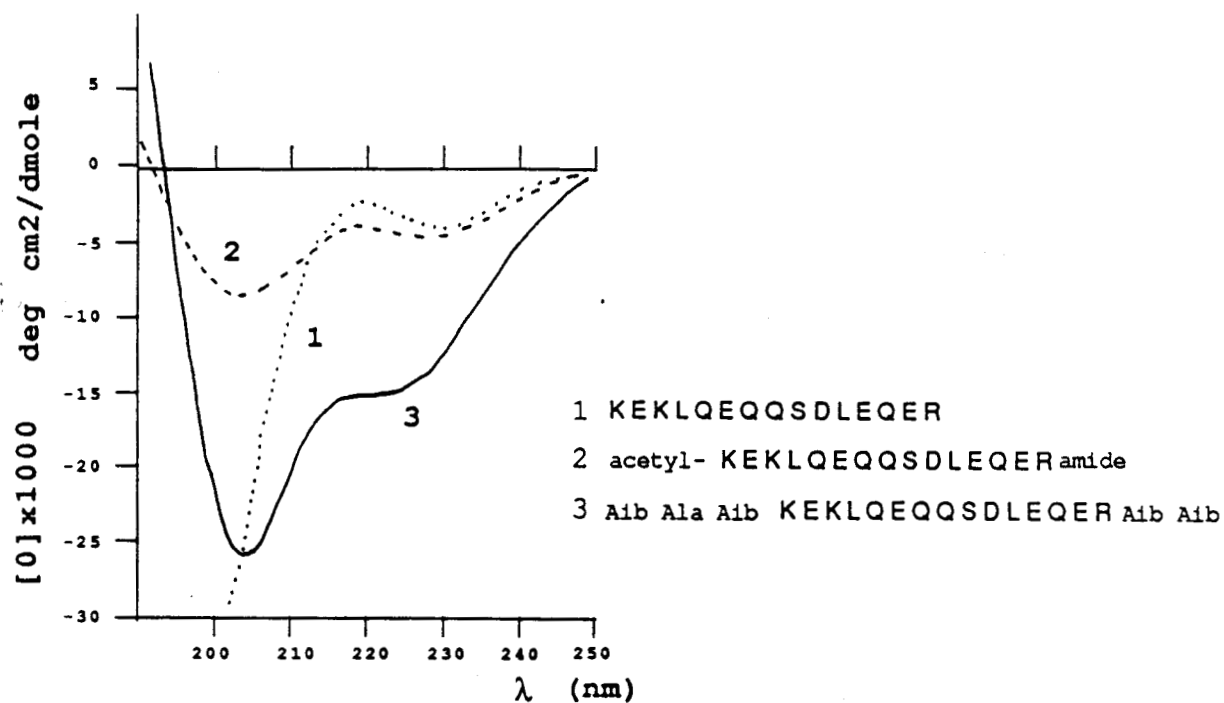


Figure 28 : Spectres de dichroïsme circulaire des 3 Constructions du peptide LSA 13-29 (numérotées dans l'ordre, 1, 2 et 3) à 15 mM, en milieux aqueux (NaCl 100 mM) et à température ambiante. Les spectres sont exprimés sous forme d'ellipticité molaire ($\text{deg.cm}^2/\text{décimole}$) en fonction de la longueur d'onde (λ).

Afin de favoriser cette conformation naissante, nous avons couplé, en positions N- et C-terminales, des résidus Aib (Construction 3) qui restreignent fortement la conformation du peptide dans lequel ils sont introduits (TONIOLO G. et col., 1983.). On a pu ainsi observer une nette augmentation de l'organisation α -hélicoïdale du peptide, 37% des chaînes présentant une conformation α -hélicoïdale.

3 - Corrélation conformation-antigénicité

L'antigénicité des 3 constructions (Construction 1, Construction 2 et Construction 3) a été évaluée par un test immunoenzymatique de type ELISA, selon leur capacité à inhiber la liaison d'anticorps humains de sujets infectés par *Plasmodium falciparum*, à un peptide de 41 résidus utilisé comme antigène, adsorbé au fond des puits (ce peptide correspond à 2,5 unités réptées de l'antigène LSA et il avait été sélectionné auparavant pour sa capacité à mimer l'antigénicité de l'antigène LSA recombinant).

La Construction 1 est complètement incapable d'inhiber la liaison des anticorps à l'antigène adsorbé. Ceci, même à des concentrations élevées, de l'ordre de la micromole de peptide par litre. Par contre la Construction 2 et la Construction 3 sont capables d'inhiber 40 à 80% de la réactivité des anticorps (selon les sérums utilisés) et ceci à des concentrations beaucoup plus faibles. Aucune différence significative n'a été observée dans la capacité d'inhibition de ces deux peptides.

L'ensemble des résultats exposés ici nous montrent que :

- les groupements ionisables terminaux des peptides (NH₂ en position N-terminale et COOH en position C-terminale) jouent un rôle critique

dans l'instabilité de la conformation α -hélicoïdale et, en conséquence, dans la reconnaissance par des anticorps provenant d'une stimulation par la protéine native;

- l'introduction de résidus d'acide α -amino isobutyrique (Construction 3) stabilise très nettement la conformation α -hélicoïdale du peptide du LSA;
- la modification apportée par l'introduction de cet acide aminé non naturel ne diminue en rien la reconnaissance par les anticorps anti-protéine naturelle, mais n'améliore pas la réactivité avec ces anticorps par rapport à l'analogue acétyl-amide (Construction 2).

C - CONCLUSION

Notre étude montre l'intérêt de mimer une conformation à l'aide d'un peptide synthétique. En effet, un peptide α -hélicoïdal, correspondant à une zone très probablement hélicoïdale du LSA natif, est mieux reconnu par les anticorps de sujets infectés par *Plasmodium falciparum* que le peptide non structuré. La Construction 1, dans laquelle le peptide possède des extrémités N- et C-terminales libres, potentiellement chargées, qui défavorisent l'établissement d'une structure α -hélicoïdale, n'est pas reconnue par les sérums de sujets infectés. La Construction 2, dans laquelle les extrémités N- et C-terminales sont bloquées et non chargées, présente un caractère α -hélicoïdal non négligeable en solution aqueuse, et elle est parfaitement reconnue par les anticorps de sujets infectés. Le fait que la Construction 3, aux extrémités N- et C-terminales de laquelle des groupements Aib imposent une contrainte conformationnelle α -hélicoïdale forte en solution, ne soit pas mieux reconnue par les anticorps de sujets infectés montre que les groupements Aib peuvent être responsables d'interactions stériques défavorables avec des anticorps spécifiques du LSA. Ainsi les groupements Aib

semblent s'opposer stériquement au gain d'affinité apporté par la meilleure structuration qu'ils imposent.

Ce travail démontre qu'il est possible de contrôler l'antigénicité d'un peptide synthétique en contrôlant sa conformation en solution. Toutefois, le potentiel conformationnel du peptide semble constituer un paramètre plus important pour l'antigénicité vis-à-vis d'anticorps anti-protéine native, que la conformation qu'il adopte réellement en solution. Ce potentiel peut être amplifié grâce à l'environnement adéquat apporté par les récepteurs que constituent les anticorps spécifiques de la zone que représente le peptide dans l'antigène natif.

V - IDENTIFICATION DES EPITOPES T AUXILIAIRES D'UN ANTIGENE (P24) DE *TOXOPLASMA GONDII*

A - INTRODUCTION

Le protozoaire coccidique *Toxoplasma gondii* est un parasite intracellulaire de l'homme et de divers animaux qui constituent pour lui des hôtes obligatoires. Ce parasite étant à l'origine d'importantes lésions foetales dans la toxoplasmose congénitale et d'encéphalites toxoplasmiques chez les sujets immunocompromis, parmi lesquels les receveurs de greffes (LUFT B.J. et col., 1983.) et les patients souffrant du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (MC CABE R. et REMINGTON J.S., 1988.), un vaccin contre *Toxoplasma gondii* s'avèrerait très utile pour ces différentes populations à risque.

En vue de comprendre comment l'hôte répond à l'infection par *Toxoplasma gondii*, un certain nombre d'expériences ont été effectuées et, toutes, ont indiqué que les cellules T doivent jouer un rôle important dans l'immunité à médiation cellulaire contre la toxoplasmose. Ceci a pu être observé dans différents modèles expérimentaux : souris, hamster et cochon d'inde (FRENKEL J.K., 1967, LINDBERG R.E. et FRENKEL J.K., 1977, PAVIA C.S., 1986a et PAVIA C.S., 1986b.). A l'aide du modèle rat athymique, l'équipe du Professeur CAPRON a montré également que les cellules T étaient nécessaires à la résistance contre l'infection par ce parasite (SANTORO F. et col., 1987 et DUQUESNE V. et col., 1990.).

Parmi les antigènes vaccinnants potentiels, les molécules excrétées-sécrétées (AES) par le parasite semblent constituer d'excellents candidats. L'équipe du Professeur CAPRON a montré que le sérum (DARCY F. et col., 1988.)

et les cellules T (DUQUESNE V. et col., 1990.) du rat FISCHER immunisé avec les antigènes excrétés-sécrétés (AES) sont capables de protéger des rats athymiques qui sont, sans cela, très sensibles à l'infection par *Toxoplasma gondii*. Ainsi, le rôle des AES du tachyzoïte dans l'immunité protectrice contre l'infection par *Toxoplasma gondii* a clairement été établi.

Dans sa stratégie de clonage d'antigènes de *Toxoplasma gondii*, basée sur l'hypothèse que la protection définitive, observée au cours de l'infection naturelle, est due à la présence de formes enkystées de bradyzoïtes dans les tissus de l'hôte, l'équipe du Professeur CAPRON a cloné une molécule de 24 kDa (P24) (CESBRON-DELAUW M.F. et col., 1989.). Cette molécule fait partie des antigènes sécrétés et elle est spécifiquement reconnue par le sérum de lapins immunisés avec les AES et le sérum de sujets infectés de façon chronique. Les protéines recombinantes se sont avérées immunogènes chez la souris et ont permis la production d'anticorps dirigés contre la protéine native. Les études immunocytochimiques qui ont suivi ont permis la localisation de l'antigène natif dans les granules denses des deux formes tachyzoïte et bradyzoïte et ont montré qu'il était synthétisé dans la vacuole parasitophore.

Dans une stratégie vaccinale moderne, il serait intéressant de produire un vaccin dont la composition moléculaire soit parfaitement définie. Un tel vaccin devra comprendre tous les composés procurant une réponse immune protectrice, notamment les épitopes majeurs reconnus par les cellules B et cellules T. Dans cet objectif, la détermination de la structure primaire de la P24 (CESBRON-DELAUW M.F. et col., 1989.) a permis la sélection et la synthèse de peptides dérivés. Ainsi, l'utilisation de 5 peptides synthétiques sélectionnés pour la probabilité qu'ils présentaient d'être des structures épitopiques, a permis d'identifier les épitopes de l'antigène P24 reconnus

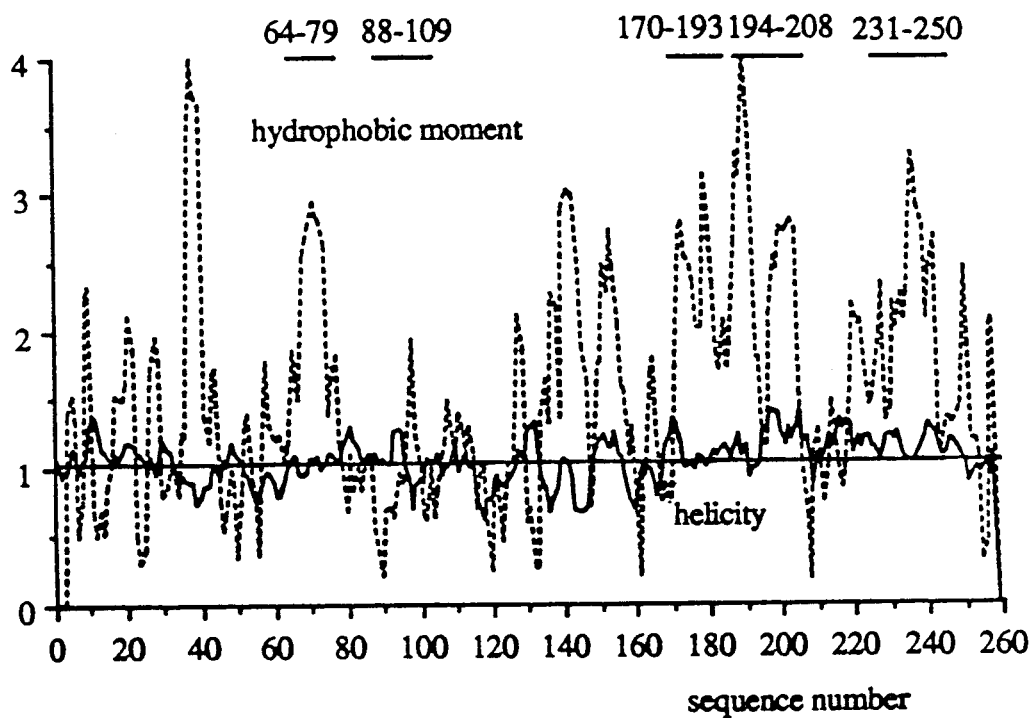
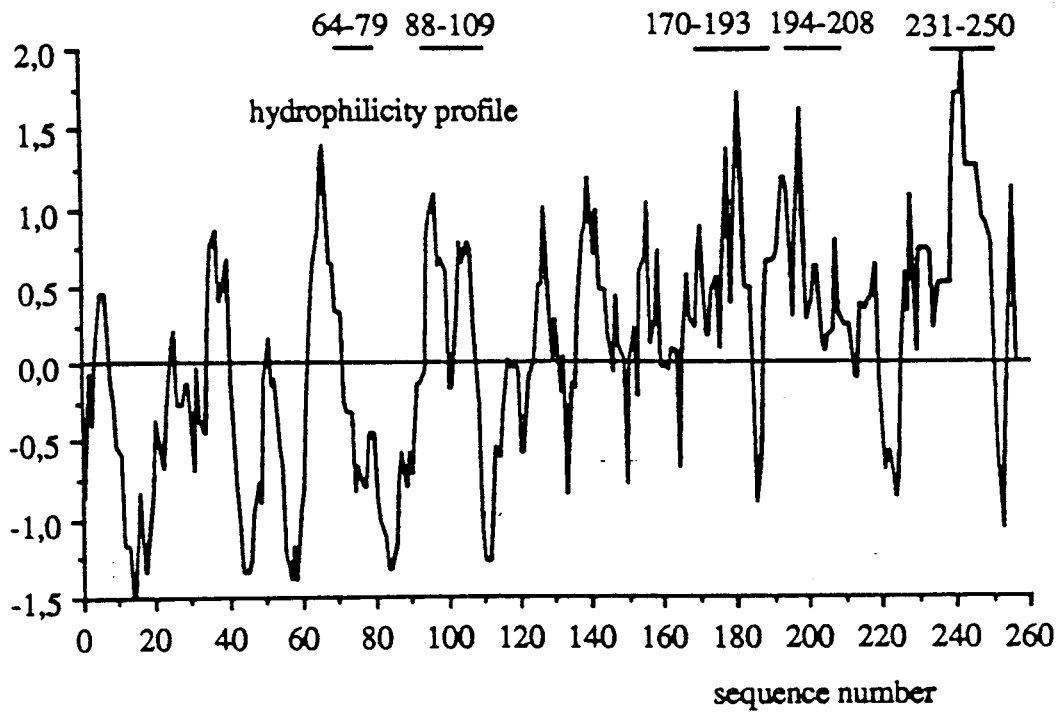


Figure 29 : Analyse de la séquence ("sequence number") de l'antigène P24 selon des critères

(a) d'hydrophilie ("hydrophilicity profile") (HOPP T.P. et WOODS K.R., 1981)

(b) d'hélicité α ("helicity") (CHOU Y. et FASMAN G., 1974a) et d'amphiphilie ("hydrophobic moment") (EISENBERG D. et col., 1982.).

par les cellules T, en collaboration avec l'équipe du professeur A. CAPRON à l'Institut PASTEUR de LILLE. Parmi ces 5 peptides, certains se sont montrés très importants dans l'immunité à médiation cellulaire T.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Sélection des peptides

La numérotation de la séquence P24 a été effectuée selon le plus long clone d'ADNc décrit par CESBRON-DELAUW M.F. et col. (CESBRON-DELAUW M.F. et col., 1986.). La structure primaire de la protéine P24 a permis la prédiction de séquences exposées, selon les critères d'hydrophilie de HOPP T.P. et WOODS K.R. (HOPP T.P. et WOODS K.R., 1981.) (Figure 29a). La prédiction des structures α -hélicoïdale amphiphiles a été examinée selon le potentiel α -hélicoïdal (CHOU Y. et FASMAN G., 1974.) et la mesure du moment hydrophobe (EISENBERG D. et col., 1984.) (Figure 29b).

Le mode de prédiction que nous avons adopté nous a permis d'envisager des régions potentiellement épitopes B ou T, bien que le travail rapporté ici ne s'intéresse qu'à l'étude des épitopes reconnus par les cellules T.

L'existence de "patterns de ROTHBRAD" a également été considérée (ROTHBARD J.B. et TAYLOR W.R., 1988.).

2 - Détermination des épitopes de l'antigène P24 chez le rat FISCHER infecté par *Toxoplasma gondii*

Afin de connaître la cinétique des spécificités cellulaires fines engendrées pendant l'infection par *Toxoplasma gondii*, la réponse cellulaire T

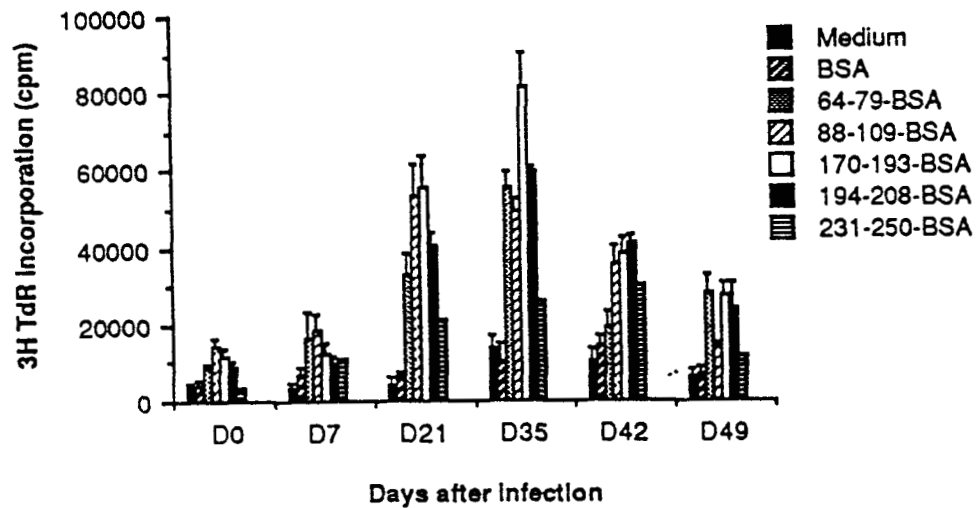


Figure 30 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T de rats FISCHER infectés, après stimulation à l'aide des 5 peptides dérivés de P24 etcouplés à l'albumine sérique bovine ("BSA") aux jours 0 (D0), 7 (D7), 21 (D21), 35 (D35), 42 (D42) et 49 (D49) après l'infection ("days after infection").

anti-P24 a été étudiée chez le rat, à différents moments et à l'aide de plusieurs peptides de la P24.

Pour obtenir des lymphocytes T spécifiques, les ganglions lymphatiques inguinaux et mésentériques ont été prélevés à J₀ puis 7, 21, 35, 42 et 49 jours après l'infection par un million de tachyzoïtes.

Pour cette étude, les peptides ont été couplés sur albumine sérique bovine (ASB) afin d'être portés par cette protéine. En effet, les peptides de P24 non portés étaient incapables de stimuler les lymphocytes T dans les conditions opératoires utilisées. La Figure 30 montre la stimulation, à une concentration antigénique de 10 µg (poids du peptide quelque soit la quantité d'ASB)/ml, des cellules T de rats infectés. La cinétique de la réponse spécifique des peptides de la P24 montre une variation des peptides reconnus par les lymphocytes T au cours de l'infection parasitaire. A J₀, aucun lymphocyte T n'était stimulé par les différents peptides portés, pas plus que par l'ASB témoin. Les principaux peptides stimulant les lymphocytes T étaient les peptides 88-109 (à J₂₁), 170-193 (à J₂₁ et J₃₅) et 194-208 (à J₃₅ et J₄₂) portés. L'ASB seule n'a jamais stimulé les lymphocytes T des rats infectés.

Ces premiers résultats montrent que la molécule P24 que le parasite présente au système immunitaire peut induire une réponse cellulaire T spécifique durant l'infection chez le rat.

3 - Déterminations des épitopes de l'antigène P24 chez le rat FISCHER immunisé avec les AES

Comme l'antigène P24 est présent dans les produits excrétés-sécrétés, la réponse cellulaire T, anti-peptide de la P24, spécifique des AES a été

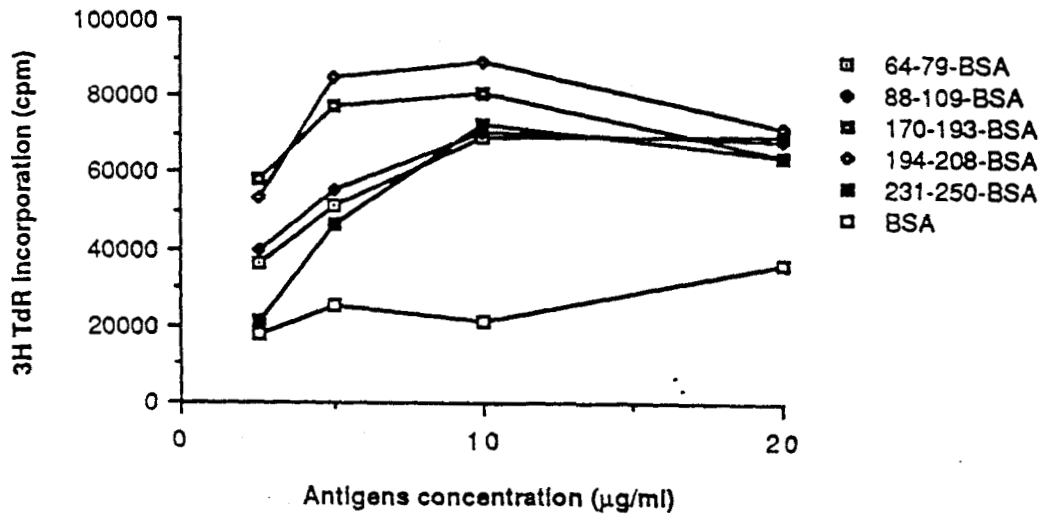


Figure 31 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T de rats FISCHER immunisés avec les antigènes excrétés-sécrétés, après stimulation par différentes concentrations ("antigen concentration") des 5 peptides dérivés de P24 et couplés à l'albumine sérique bovine ("BSA").

étudiée. Pour cela, les cellules T ont été prélevées 5 jours après la seconde injection.

La plupart des peptides de la P24 étaient capables de provoquer, *in vitro*, la prolifération des cellules T spécifiques des AES (Figure 31). Toutefois parmi les 5 peptides étudiés, le 170-193 et le 194-208 ont induit les réponses les plus fortes. Au contraire, une prolifération plus faible a été obtenue avec les autres peptides de la molécule P24 (64-79, 88-109 et 231-250) et aucune prolifération n'a été observée avec la protéine porteuse seule (ASB).

4 - Détermination des épitopes de l'antigène P24 chez le rat FISCHER immunisé avec un virus recombiné par le gène de la P24 (VVTG 2170)

L'immunisation des rats FISCHER avec la construction VVTG 2170 a été réalisée afin de connaître les épitopes T de cette molécule à l'aide des 5 peptides synthétiques.

A l'aide de 2 protocoles d'immunisation (à la base de la queue : Figure 32 et par voie intrapéritonéale : Figure 33), il a été possible d'obtenir une prolifération importante avec les peptides 88-109 et 194-208. Quand la voie intrapéritonéale a été utilisée, les cellules ganglionnaires (Figure 33b) et les cellules de la rate (Figure 33a) étaient stimulées par les mêmes peptides.

L'analyse de l'ensemble des résultats nous montrent que les lymphocytes T de rats infectés ou de rats immunisés avec les AES ou la protéine P24

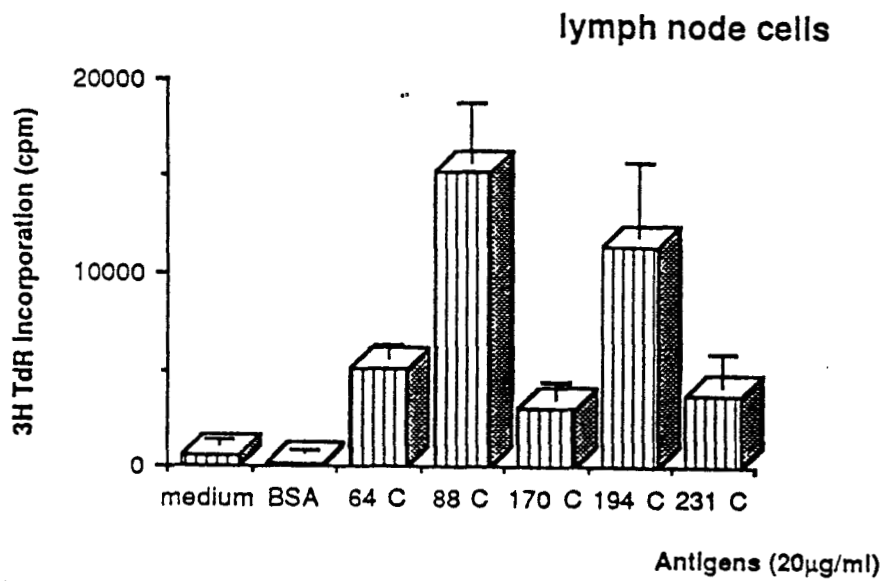


Figure 32 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T de rats FISCHER immunisés à la base de la queue avec la protéine P24 recombinante exprimée dans un virus de la vaccine, après stimulation par les 5 peptides dérivés de P24 et couplés à l'albumine sérique bovine ("BSA").

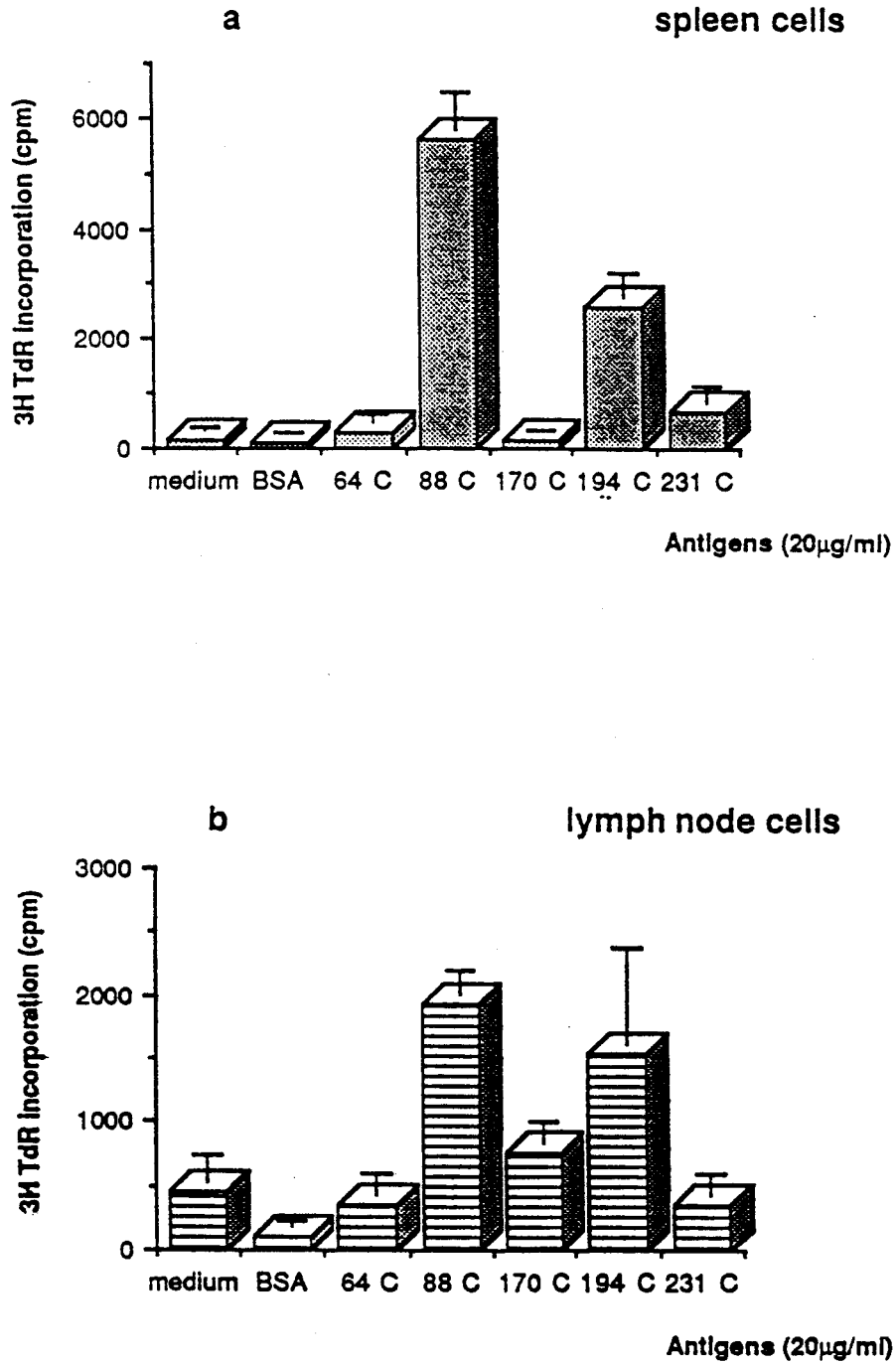


Figure 33 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T (a) de la rate ("spleen cells") ou (b) ganglionnaires ("lymph node cells") de rats FISCHER immunisés par voie intrapéritonéale avec la protéine P24 recombinante exprimée dans un virus de la vaccine, après stimulation par les 5 peptides dérivés de P24 et couplés (64C = 64-79 couplé, etc.) à l'albumine sérique bovine ("BSA").

recombinante peuvent être stimulés par des peptides synthétiques. Toutefois, la réponse cellulaire T vis-à-vis des différents peptides varie au cours de l'infection : au début de l'infection, les cellules T reconnaissent le peptide 88-109; par contre à 35 jours après l'infection, c'est le peptide 170-193 qui est le mieux reconnu; à partir de 42 jours après l'infection la réponse cellulaire diminue globalement. Quand on regarde la réponse générée par l'immunisation avec les AES, les peptides 170-193 et 194-208 permettent d'obtenir la meilleure réponse proliférative. Si l'antigène P24 est présenté au système immunitaire par le virus de la vaccine, les lymphocytes T obtenus après immunisation sous-cutanée ou intrapéritonéale reconnaissent principalement les peptides 88-109 et 194-208.

Les différentes voies d'injection et les différents modes de présentation au système immunitaire qui en découlent peuvent peut-être expliquer l'induction de réponses cellulaires T variées comme celles observées contre la molécule P24 au cours de l'infection ou après immunisation par les AES ou par le virus de la vaccine recombiné. Le rôle des cellules présentatrices et l'environnement moléculaire de l'antigène présenté constituent 2 paramètres certainement cruciaux dans l'induction de la réponse immune.

Dans les conditions expérimentales utilisées ici, ni les cellules ganglionnaires ni les cellules de la rate n'étaient stimulables par les peptides synthétiques non couplés à une protéine porteuse (ASB), pas plus que par la protéine porteuse seule. Il existe plusieurs explications possibles à ce phénomène. On peut penser notamment que le couplage peut stabiliser la conformation potentielle du peptide ou alors qu'il permet une dégradation modérée du peptide par les cellules présentatrices de l'antigène.

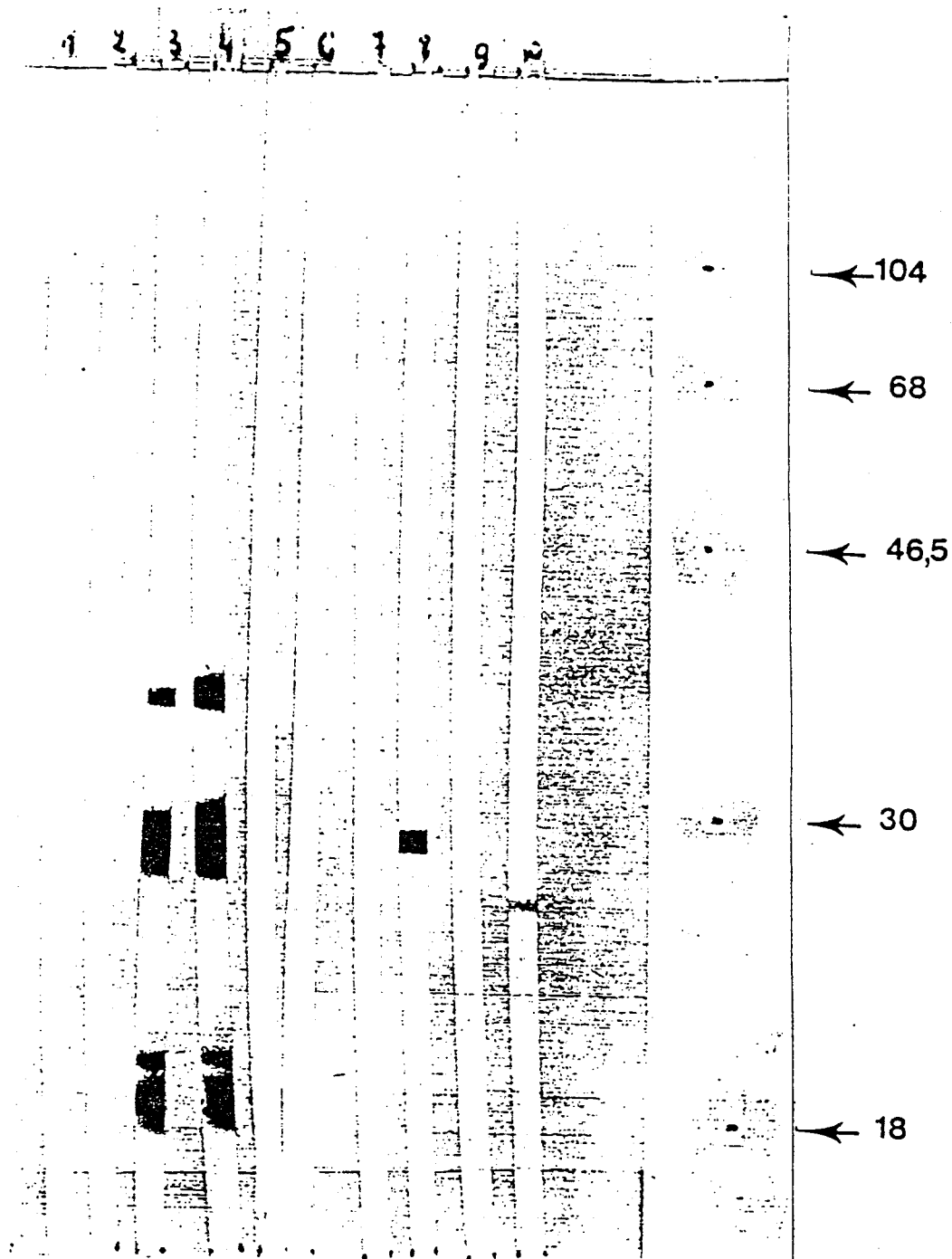


Figure 34 : Analyse par transfert de Western des antigènes de *Toxoplasma gondii* à l'aide des sérums suivants :

- rat FISCHER non infecté (couloir 1)
- rat FISCHER athymique non infecté (couloir 2)
- rats FISCHER immunisés par des antigènes excrétés-sécrétés (couloir 3 et 4)
- rats FISCHER immunisés par le peptide 170-193 de p24 (couloir 5 et 6)
- rats FISCHER athymiques infectés ayant reçu 10^4 lymphocytes spécifiques du peptide 170-193 (couloir 7 et 8)
- rats FISCHER athymiques infectés ayant reçu 10^4 lymphocytes spécifiques de l'albumine sérique bovine (couloir 9) ou l'anticorps monoclonal (TG 17-43) spécifique du peptide 170-193 (couloir 10).

5 - Transfert *in vivo* des cellules T spécifiques du peptide 170-193

La préparation de cellules T spécifiques du peptide 170-193 a été retenue pour 2 raisons : (I) les résultats exposés précédemment où les cellules T sont prélevées sur des rats infectés ou immunisés avec les AES, nous montrent que ce peptide contient un ou plusieurs épitopes T immunodominants; (II) un anticorps monoclonal anti-P24 a été préparé dans le laboratoire du Professeur CAPRON et cet anticorps ne reconnaît que le peptide 170-193 démontrant ainsi que celui-ci contient un épitope reconnu par les cellules B.

Aucune réponse anticorps anti-P24 n'a pu être mesurée pendant l'infection ou après immunisation par les AES ou le peptide 170-193 dans le modèle rat (Figure 34). Toutefois l'immunisation avec ce peptide peut induire une réponse cellulaire T (Figure 35). En effet, ces cellules T prolifèrent *in vitro* en présence de peptide 170-193 couplé sur ASB (Figure 35a) ou de tachyzoïtes irradiés représentant l'antigène natif (Figure 35b) mais, ni avec le peptide non couplé, ni avec la protéine porteuse seule (ASB). On peut également ajouter que les cellules T spécifiques du peptide 170-193 ne sont pas stimulées par les autres peptides de la P24, tels les peptides 64-79 et 231-250 (Figure 35a). Qui plus est, les cellules T spécifiques de l'ASB n'étaient pas stimulées par les tachyzoïtes irradiés, écartant ainsi tout effet mitogène du parasite lui-même. Ces résultats confirment la présence d'au moins 1 épitope T au sein de la séquence 170-193 de la P24.

En vue d'apprécier l'effet protecteur des lymphocytes spécifiques du peptide 170-193, un transfert passif de 10^4 cellules T a été effectué dans

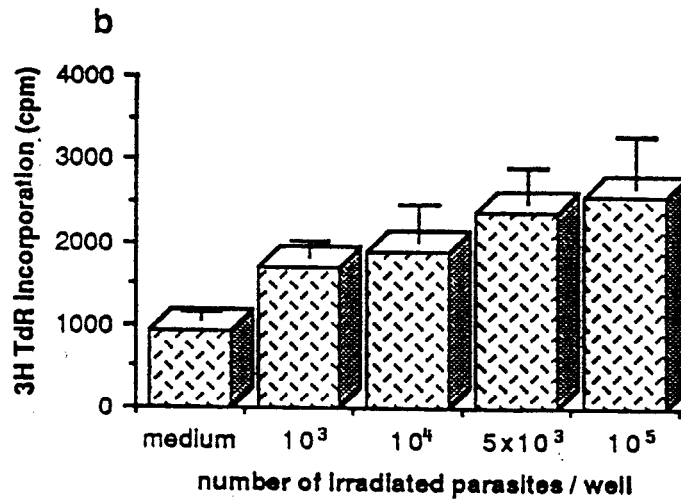
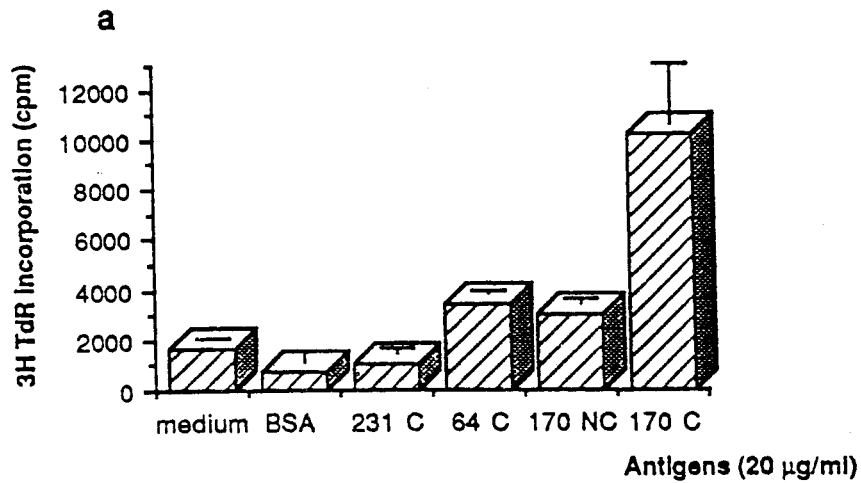


Figure 35 : (a) Prolifération *in vitro* des lymphocytes T de rats FISCHER immunisés avec le peptide 170-193 de P24, après stimulation par les peptides 64-79, 170-193 et 231-250 couplés (64C, 170C et 231C) à l'albumine sérique bovine ("BSA") et par le peptide 170-193 non couplé (170 NC).
(b) Dans un test parallèle, les mêmes lymphocytes T ont été stimulés par des parasites irradiés en différents nombres ("number of irradiated parasites").

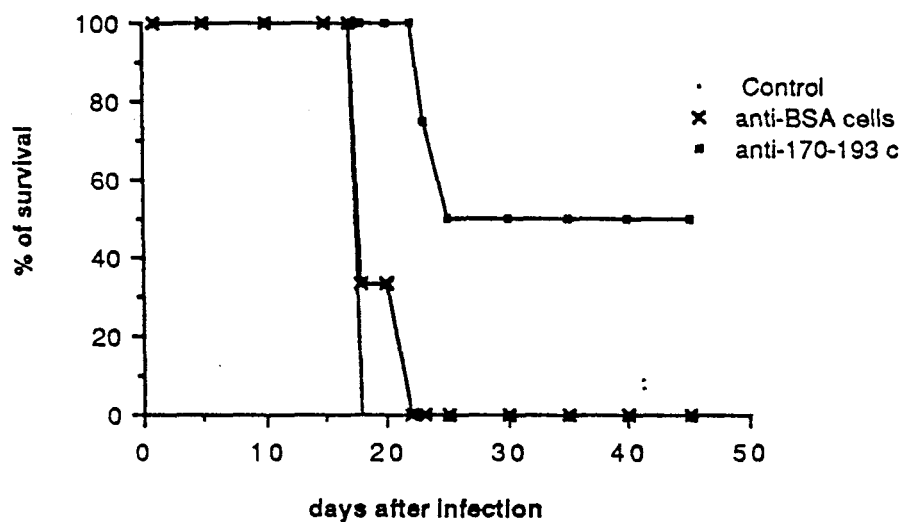


Figure 36 : Taux de survie ("% of survival") en fonction du nombre de jours suivant l'infection par 10^3 tachyzoïtes ("days after infection") de rats athymiques ayant reçu 10^4 lymphocytes de rats FISCHER immunisés soit avec le peptide 170-193 couplé à l'albumine sérique bovine ("anti-170-193C") soit avec de l'albumine sérique bovine seule ("anti BSA cells"). Des rats athymiques témoins n'ont pas reçu de lymphocytes. Il y avait 8 rats athymiques dans chaque groupe.

des rats athymiques, 1 jour avant leur infection par 10^3 tachyzoïtes. 50% des rats ayant reçu les cellules T spécifiques du peptide 170-193 étaient complètement protégés (Figure 36), même après injection d'une seconde dose infectante comprenant 10^3 tachyzoïtes. Il apparaît donc que les lymphocytes T spécifiques du peptide 170-193 sont impliqués dans des mécanismes protecteurs mettant ainsi en évidence le rôle fonctionnel de cet épitope.

Deux des rats athymiques protégés par les cellules T spécifiques du peptide 170-193 ont été saignés et la réponse IgG a pu être analysée par transfert de Western (Figure 34). L'un des rats présente une réponse anticorps contre un ou plusieurs autres antigènes de 30 kDa. Ceci démontre clairement que l'épitope T présent dans la séquence 170-193 de P24 peut induire une réponse T fonctionnelle *in vivo* (contre un autre antigène). Par contre, l'autre rat ne présentait aucune réponse IgG mesurable, suggérant par là que la production d'anticorps observée chez le rat répondeur n'était pas nécessaire pour assurer la protection observée contre le parasite.

Les lymphocytes T spécifiques du peptide 170-193 ne sont donc probablement pas directement impliqués dans la production d'anticorps. Toutefois, seule la réponse IgG a été mesurée et il ne peut pas être exclu que d'autres isotypes tels l'IgE ou l'IgA ne soient produits et que ces anticorps ne soient impliqués dans l'immunité anti-*Toxoplasma gondii* (RIDEL P.R. et col., 1988 et GODARD I. et col., 1990.).

D'une façon tout à fait différente, l'activité principale de ces cellules pourrait être due à leur implication dans des mécanismes indépendants de la production d'anticorps. On peut penser notamment à l'induction de lymphocytes T cytotoxiques. Récemment, il a été démontré que des lymphocytes T, porteurs d'un phénotype correspondant aux lymphocytes T

cytotoxiques, sont directement impliqués dans la cytotoxicité contre des parasites intracellulaires (KHAN I.A. et col., 1988.). Toutefois, les lymphocytes T induits après immunisation avec le peptide 170-193 peuvent être directement cytotoxiques pour le parasite ou, plus probablement, ils peuvent apporter une aide à l'induction de lymphocytes T cytotoxiques, par l'intermédiaire de la production d'interleukine 2. Il reste à comprendre le rôle exact joué par ces lymphocytes T spécifiques du peptide 170-193 dans la résistance des rats athymiques infectés par *Toxoplasma gondii*.

C - CONCLUSION

Le but de cette étude a été de connaître, grâce à l'utilisation de peptides synthétiques, les épitopes reconnus par des cellules T, éduquées contre la molécule P24 native, pendant l'infection ou après immunisation avec les AES ou la molécule P24 exprimée dans un virus recombiné de la vaccine.

La capacité de prédire les séquences peptidiques induisant une réponse cellulaire T met en évidence l'utilisation potentielle d'immunogènes synthétiques en tant que vaccin. En effet, l'immunité cellulaire T est nécessaire, non seulement à une défense immune directe contre les pathogènes, mais aussi pour aider à la production d'anticorps et à l'induction d'une réponse T cytotoxique. C'est pourquoi un bon vaccin ne doit pas contenir seulement les séquences permettant la production d'anticorps, mais également celles qui permettront l'activation des cellules T ayant un effet auxiliaire pour la production d'anticorps, ou qui induiront des mécanismes cellulaires protecteurs indépendants de la production d'anticorps.

Le travail présenté ici met en évidence, dans l'antigène P24, la présence d'épitopes T immunodominants qui induisent, très probablement, et de

manière préférentielle, une immunité à médiation cellulaire. C'est la première détermination des épitopes T immunodominants d'un AES au cours de la toxoplasmose.

D'une façon tout à fait intéressante, il a été observé qu'un des épitopes T immunodominants, le peptide 170-193, contient également un épitope reconnu par les cellules B, puisqu'un anticorps monoclonal anti-P24 reconnaît ce peptide (CHARIF H. et col., communication personnelle.).

L'étude d'autres antigènes protecteurs dans la toxoplasmose est actuellement en cours dans le laboratoire du Professeur CAPRON. L'utilisation de peptides synthétiques parfaitement définis permettra la caractérisation des épitopes B et T contenus au sein de ces molécules. Ceci pourrait permettre le développement d'un vaccin synthétique qui induirait une immunité efficace dans une large population.

VI - RECHERCHE DES EPITOPES T AUXILIAIRES DE LA PROTEINE NEF DE VIH-1

A - INTRODUCTION

Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent infectieux responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (BARRE-SINOUSSE F. et col., 1984, GALLO R. et col., 1984 et LEVY J. et col., 1984.). L'infection par VIH induit un dysfonctionnement progressif du système immunitaire, suivi d'une déplétion de la population cellulaire T auxiliaire CD4⁺, conduisant ainsi à l'insuffisance immune terminale et au développement d'infection opportunistes caractéristiques du SIDA (LANE C. et col., 1983, SHEARER G. et col., 1986, PETIT C. et col., 1988 et FAUCI A., 1988.).

Jusqu'à présent, tous les candidats vaccins anti-VIH et anti-VIS (virus d'immunodéficience simienne) utilisés dans le modèle expérimental primate, tous les essais de vaccin en phase clinique I chez l'homme et toutes les immunisations de sujets infectés, en vue de prévenir le SIDA, ont été développés avec le virion inactivé ou des protéines recombinantes ou des peptides de l'enveloppe virale (BERZOFKY J. et col., 1988, DESROSIERS et col., 1989 et MURPHEY-CORB M. et col., 1989.) et se sont montrés très décevants.

Le génome de VIH ne code pas uniquement pour les 3 protéines structurales *gag*, *pol* et *env*, constitutives du virion et caractéristiques des rétrovirus. On peut, en effet, observer 6 protéines régulatrices supplémentaires, absentes du virion mais exprimées dans la cellule infectée (FAUCI A., 1988.). Les cellules infectées expriment d'abord 3 produits de gènes régulateurs, *nef*, *tat* et *rev*, et, seulement après qu'une certaine quantité de protéine *rev* ne soit

présente (seuil), les autres protéines virales sont synthétisées. Parmi les 3 produits de gène de régulation exprimés précocement, *nef* semble être prédominant (ROBERT-GUROFF M. et col., 1990.).

Nef ("negative enhancer factor" ou 3' *orf* ou *F*) code pour une protéine de 27 kDa, capable de fixer le GTP, d'être phosphorylée (ALLAN J. et col., 1985, ARYA S. et GALLO R., 1986, FRANCHINI G. et col., 1986 et GUY B. et col., 1987.), et qui semble réguler de façon négative l'expression de la molécule CD4 à la surface de la cellule infectée (GUY B. et col., 1987.). Il a été proposé (KIM S. et col., 1989 et HAMMES S. et col., 1989.) que *nef* puisse agir comme un facteur rendant silencieuse l'expression de VIH (LUCIW P. et col., 1987, AHMAD N. et VENKATESAN S., 1988 et NIEDERMAN T. et col., 1989.), et qu'ainsi cette protéine soit responsable de l'établissement de la phase latente de l'infection par VIH (CHENG-MAYER C. et col., 1989.). *Nef* est exprimée dans des lignées cellulaires T infectées par VIH et elle a été trouvée à la surface des cellules mononucléaires de sujets infectés par VIH (DURDA P. et col., 1988 et MAC SHARRY J. et col., 1990.). La protéine *nef* est immunogène chez certains sujets infectés : des anticorps anti-*nef* ont été détectés chez environ la moitié des sujets infectés, durant la phase clinique silencieuse précédant le SIDA, tôt après l'infection (RANKI A. et col., 1987, KHALIFE J. et col., 1988 et AMEISEN J.C. et col., 1989.); des cellules T cytotoxiques spécifiques de *nef* ont pu être identifiées (CULMANN B. et col., 1989 et KOENING S. et col., 1990.).

Une stratégie vaccinale basée sur l'utilisation de cette protéine pourrait permettre le ciblage de mécanismes effecteurs immuns vers les cellules infectées, avant le début d'une synthèse significative de virions et pourrait ainsi prévenir la libération et la propagation de VIH, liées à la destruction des cellules infectées.

Un bon vaccin doit inclure les composants nécessaires à la production d'une réponse immune protectrice et, en particulier, des épitopes T auxiliaires. En effet, l'immunité cellulaire T semble constituer un mécanisme de défense majeur contre les infections virales : l'immunité cellulaire T auxiliaire est essentielle pour induire et réguler aussi bien une réponse anticorps qu'une activité cellulaire T cytotoxique, mémorisables par le système immunitaire. La réponse cellulaire T auxiliaire est différente de la réponse cellulaire B puisqu'elle est restreinte à un nombre limité de sites antigéniques, par, et en association étroite avec, les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité et qu'en général elle nécessite une dégradation enzymatique de l'antigène (HEBER-KATZ E. et col., 1983, SCHWARTZ R., 1985 et ASHWELL J. et SCHWARTZ R., 1986.). Les épitopes T semblent présenter des caractéristiques physico-chimiques particulières et la propriété d'adopter une conformation α -hélicoïdale amphiphile a pu être reliée à la faculté qu'ont certains peptides d'être reconnus par les cellules T auxiliaires (DE LISI C. et BERZOFKY J., 1985, MARGALIT H. et col., 1987 et SPOUGE J. et col., 1987.).

Notre approche a donc consisté à prédire les épitopes T auxiliaires de la protéine nef à partir de la séquence de l'isolat VIH LAVBRU (WAIN-HOBSON S. et col., 1985.), à synthétiser les peptides correspondant aux régions sélectionnées et à les tester dans les modèles rat et chimpanzé, en collaboration avec l'équipe du Professeur A. CAPRON à l'Institut PASTEUR de LILLE. Même si le développement d'un SIDA, postérieur à une infection par VIH n'a jamais été observé dans ces espèces (FULTZ P, 1989.), les chimpanzés (*Pan troglodytes*) constituent la seule espèce, avec le gibbon et l'homme, qui puisse être effectivement infectée par VIH-1 et semble ainsi constituer un bon

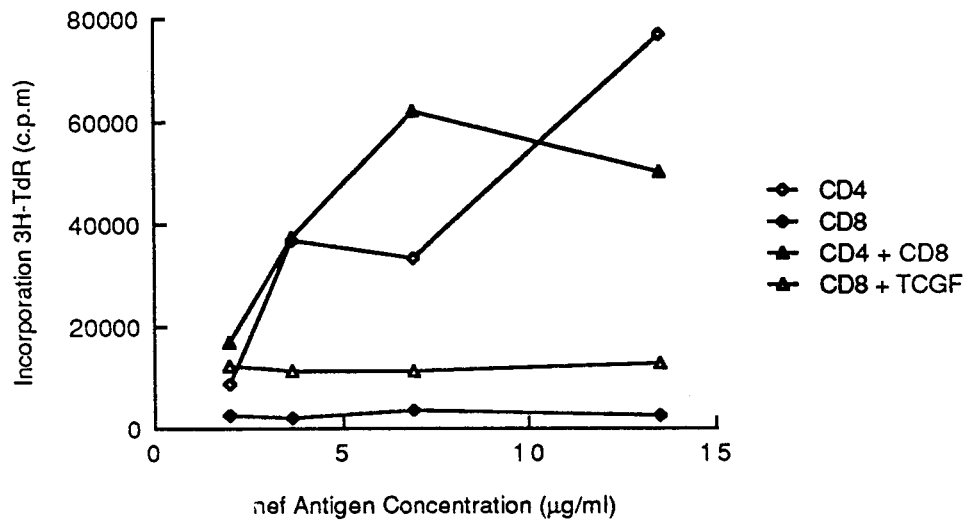


Figure 37 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T spécifiques de *nef* enrichis en population CD4⁺ ou en CD8⁺, par différentes concentrations de la protéine *nef* ("nef antigen concentration").

modèle d'étude préliminaire de l'immunogénicité obtenue avec un vaccin anti-VIH-1.

B - RESULTATS

1 - Réponse proliférative des populations cellulaires T, enrichies en cellules CD4⁺ et CD8⁺, de rats immunisés par l'antigène protéique *nef*

Les lymphocytes T sont fonctionnellement et phénotypiquement hétérogènes. C'est pourquoi les cellules T purifiées de ganglions de rats LOU M ont été séparées en 2 sous-populations, CD4⁺ et CD8⁺ afin d'étudier leurs proliférations respectives vis-à-vis de la protéine *nef*.

Les lymphocytes T CD4⁺ enrichis montrent une réponse proliférative significative contrairement aux cellules T CD8⁺ (Figure 37). De plus, quand les 2 sous-populations cellulaires sont remélangées selon leurs proportions initiales, déterminée par cytofluorométrie, aucune différence n'est observée par comparaison avec la sous-population CD4⁺ seule. Les cellules T CD8⁺ ne prolifèrent donc pas dans les conditions expérimentales utilisées, même en présence de cellules T CD4⁺ aptes à aider leur prolifération. Ces résultats démontrent qu'après immunisation de rats avec la molécule protéique *nef* recombinante, une forte réponse T auxiliaire est observée, mais pas de réponse T potentiellement cytotoxique.

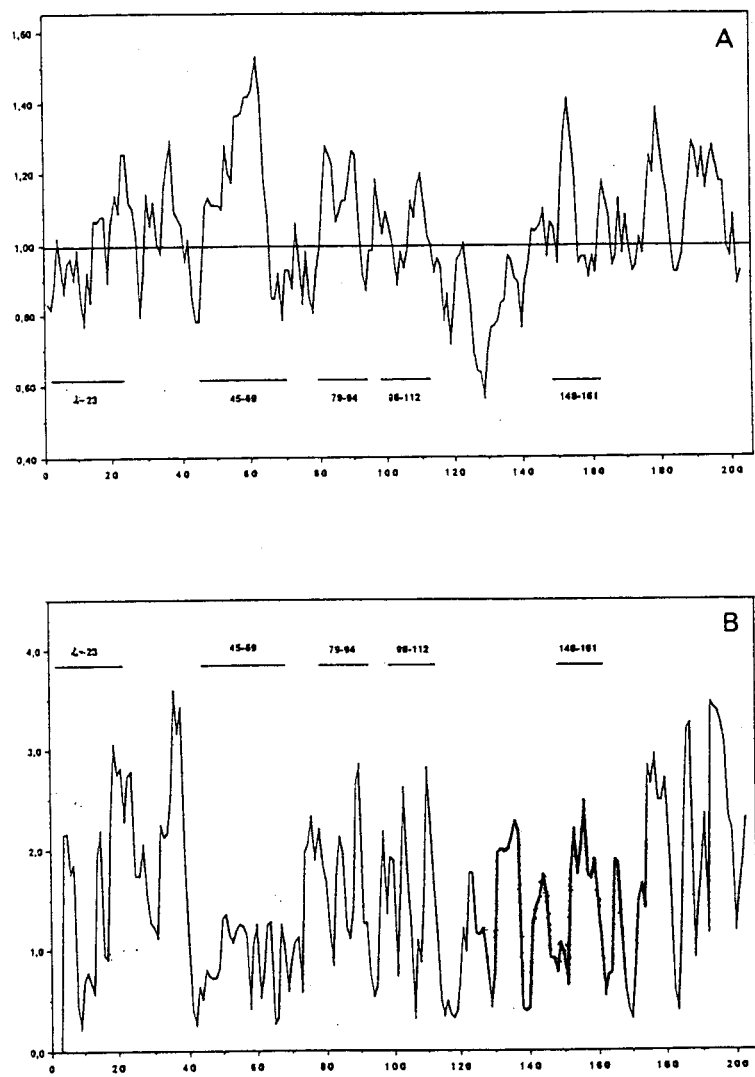


Figure 38 : Analyse de la séquence de la protéine nef de VIH-1 LAV_{bru} (numérotée de 1 à 206 sur l'axe horizontal) selon des critères (A) d'hélicité α ("helicity") (CHOU Y. et FASMAN G., 1974a) et (B) d'amphiphilie ("hydrophobic moment") (EISENBERG D. et col., 1982.)

2 - Sélection des peptides

L'identification des épitopes T de la protéine *nef* recombinante de 27 kDA a été envisagée en utilisant des peptides synthétiques sélectionnés à partir de la structure primaire de l'isolat LAVBRU.

L'hélicité α , et plus précisément l'hélicité α amphiphile, avait pu être corrélée avec les déterminants reconnus par les cellules T (DE LISI C. et BERZOFSKY J., 1985.). La tendance α -hélicoïdale a été prédite en utilisant la méthode de CHOU Y. et FASMAN G. (CHOU Y. et FASMAN G., 1974a.) (Figure 38 A) et l'amphiphilie a été estimée en calculant le moment hydrophobe selon la méthode d'EISENBERG D. suivant une période de 100° (3,6 résidus par tour) typique d'une organisation en hélice α (EISENBERG D. et col., 1982.) (Figure 38 B). Tous les peptides sélectionnés contiennent une séquence présentant un potentiel α -hélicoïdal significatif, associé à un moment hydrophobe élevé excepté le peptide 45-69. Ce peptide a été retenu à cause de son très fort potentiel α -hélicoïdal, mais aussi parce qu'il contient une zone acide, composée de plusieurs résidus d'acides glutamiques, susceptible de lui conférer une résistance vis-à-vis de la dégradation enzymatique opérée dans la cellule présentatrice de l'antigène. Dans les conditions physiologiques normales, cette zone est chargée et confère donc au peptide une bonne solubilité en milieu neutre (pH 7,2). Durant la dégradation antigénique dans le milieu intralysozomal (pH acide), cette zone acide ne sera plus chargée et le peptide, pas ou peu soluble, sera donc moins exposée à la dégradation enzymatique. Nous avons observé que les peptides synthétiques contenant cette zone acide (peptide 45-69 et dérivés) sont insolubles en milieu acide alors que dès que nous remontions le pH vers une valeur neutre (pH 7) ces peptides devenaient parfaitement solubles.

peptide	sequence
2-23	GGKWSKSSV <u>GWPTV</u> RERMRA
45-69	SSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFP
79-94	MTY <u>KAAVDL</u> <u>SHFL</u> KEK
98-112	E <u>GLIHS</u> QRRQ <u>DILD</u> L
148-161	VEPDKVEEANKGEN

Tableau XI :

Séquence des peptides de *nef* sélectionnés. Les "patterns de ROTHBARD" (ROTHBARD J.B. et TAYLOR W.F., 1988.) ont été soulignés.

A côté de ces différents critères, la présence d'un "pattern de ROTHBARD" (ROTHBARD J.B. et TAYLOR W.R., 1988.) dans chaque peptide a été contrôlée et différents motifs consensus sont présents dans toutes les séquences retenues, exceptées les séquence 45-69 et 148-161 (Tableau XI).

3 - Stimulation par les peptides synthétiques dérivés de *nef*, des lymphocytes T de rats et de chimpanzés immunisés avec l'antigène *nef*

La réponse proliférative des lymphocytes T de ganglions inguinaux de rats LOU M immunisés avec *nef* a pu être déterminée par incubation avec l'antigène *nef* ou les peptides 2-23, 45-69, 79-94, 98-112 et 148-161 couplés ou non à l'albumine sérique bovine (ASB). Tous les peptides sélectionnés selon leur potentiel α -hélicoïdal amphiphile stimulent les cellules T spécifiques de *nef* à condition d'être portés sur ASB, alors qu'aucune stimulation n'a été observée avec le porteur seul (Figure 39a). Dans tous les cas, les peptides 45-69 et 79-94 couplés sur ASB ont induit les plus fortes réponses. Aucune réponse proliférative ne semble due à un effet mitogène des peptides testés, puisqu'aucune réponse n'est observée quand des cellules T de rats normaux ont été testées avec ces peptides (Résultats non montrés). Le peptide 45-69 est le seul à provoquer une réponse proliférative des cellules T sans avoir besoin d'être couplé à une protéine porteuse (Figure 39b).

Pour aller plus loin dans notre investigation, 2 chimpanzés (Cheetha = C et Mgbadolite = M) ont été immunisés avec la protéine *nef* recombinante (en utilisant l'hydroxyde d'alumine en tant qu'adjuvant) alors que 2 autres animaux (Bakoumba = B et Julie = J) ont seulement reçu un placebo. Les 2 animaux B et J, servant de contrôle, n'ont jamais répondu à la protéine *nef* ni à n'importe lequel des peptides testés. Par contre, les lymphocytes de M

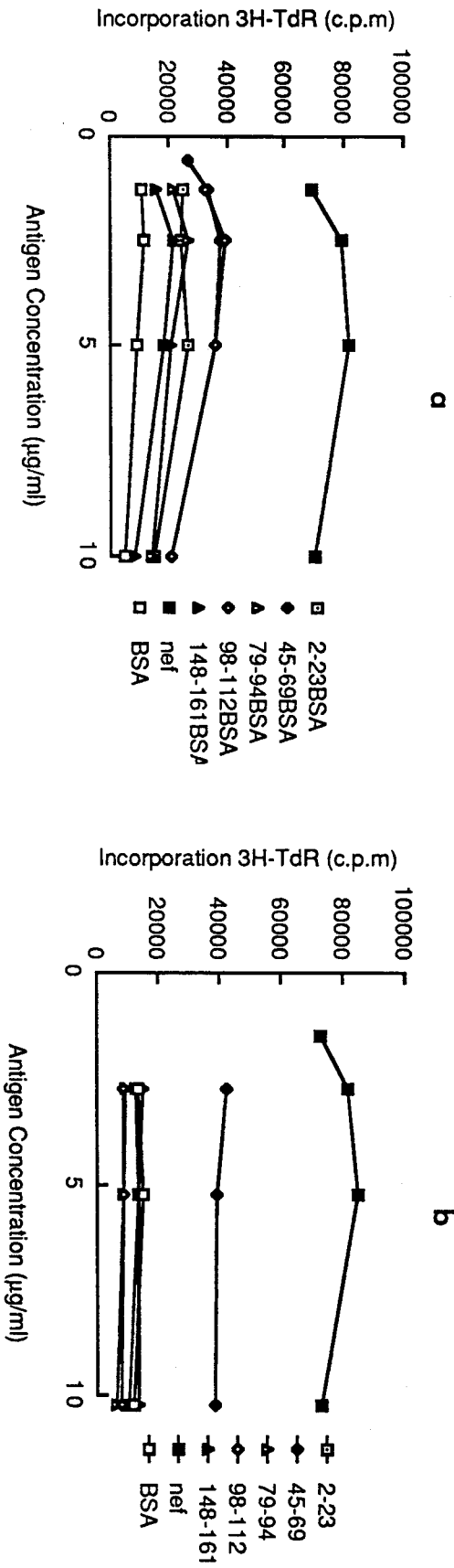


Figure 39 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T de rats immunisés avec la protéine nef recombinante, après stimulation par différentes concentrations ("antigen concentration") de nef ou des 5 peptides de nef (a) couplés (b) ou non à l'albumine sérique bovine ("BSA").

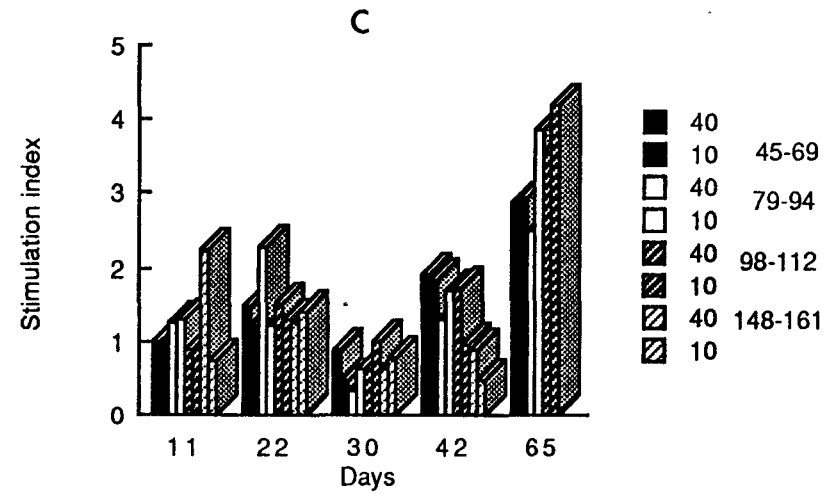
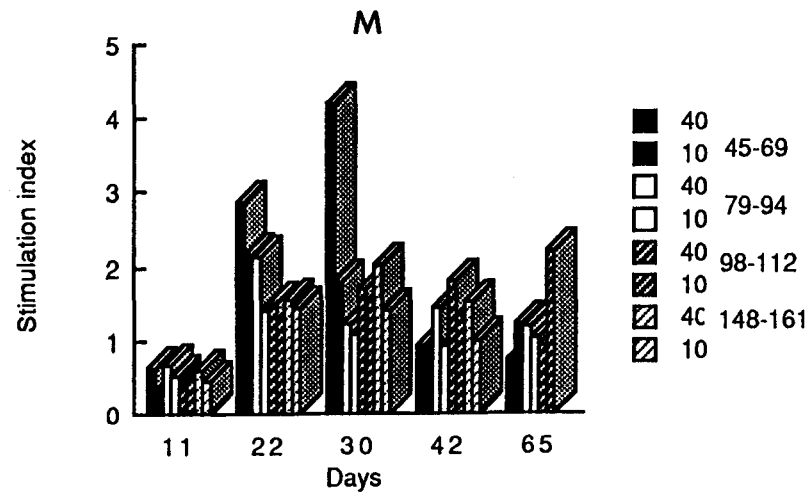


Figure 40 : Cinétique de la réponse lymphocytaire de 2 chimpanzés. La femelle, CHEETHA (C) et le mâle MGBADOLITE (M) ont été immunisés et rappelés avec la protéine *nef* recombinante. Les lymphocytes ont été restimulés *in vitro* à l'aide de 2 doses de peptides (40 et 10 microgrammes/ml) libres. Les résultats ont été exprimés en index de stimulation.

proliféraient 22 et 30 jours après la première injection, à condition d'être stimulés par le peptide 45-69 (Figure 40 M) alors que les lymphocytes de C n'ont répondu significativement qu'après 3 injections et 65 jours après la première, à condition d'être stimulés par le peptide 45-69 mais aussi par les peptides 79-94 et 98-112 (Figure 40 C). Une réponse plus faible a également été observée chez le chimpanzé C, contre les peptides 148-161 et 79-94, respectivement 11 et 22 jours après la première injection. Qui plus est, dans ces expériences, seule la femelle C a présenté une réponse proliférative à la protéine *nef*, et ce, 22 et 65 jours après la première injection. A partir de ces résultats, il est possible de dire que chez le chimpanzé, la protéine recombinante *nef* est immunogène et faiblement antigénique, du point de vue de la réponse cellulaire T.

Pour confirmer la prolifération lymphocytaire T, une population cellulaire T enrichie selon la technique des rosettes de globules rouges de mouton, a été préparée. Des macrophages syngéniques (ayant à leur surface les mêmes molécules de classe I et II du CMH que les cellules T des animaux) et des cellules B ont servi de cellules présentatrices de l'antigène après traitement à la mytomycine C (Figure 41). 2 semaines après la dernière injection, la femelle C et le mâle M ont répondu à différents antigènes testés. Les cellules T de M n'ont répondu qu'à la protéine *nef* et au peptide 98-112. Par contre, non seulement la protéine *nef*, mais tous les peptides testés, ont induit une prolifération des lymphocytes T de C, les peptides 45-69 et 98-112 provoquant la réponse la plus forte (plus forte même qu'à la protéine *nef* ayant servi d'immunogène).

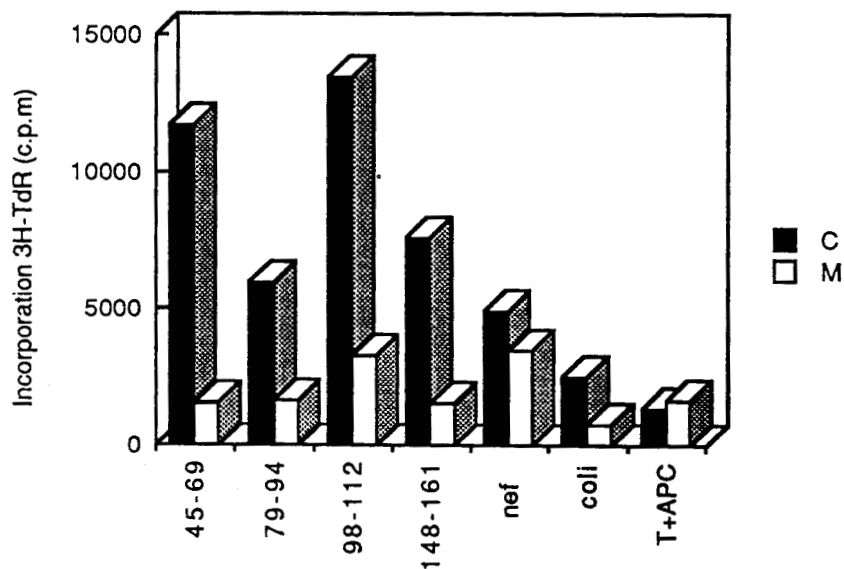


Figure 41 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T de chimpanzés immunisés avec la protéine *nef* recombinante, après stimulation par les peptides libres de *nef*, la protéine *nef* elle-même, un extrait d'E. coli ou les cellules présentatrices de l'antigène seules ("T + APC"), 2 semaines après la cinquième injection. Les cellules T ont été purifiées selon la technique des rosettes de globules rouges de mouton. Les résultats ont été exprimés en index de stimulation.

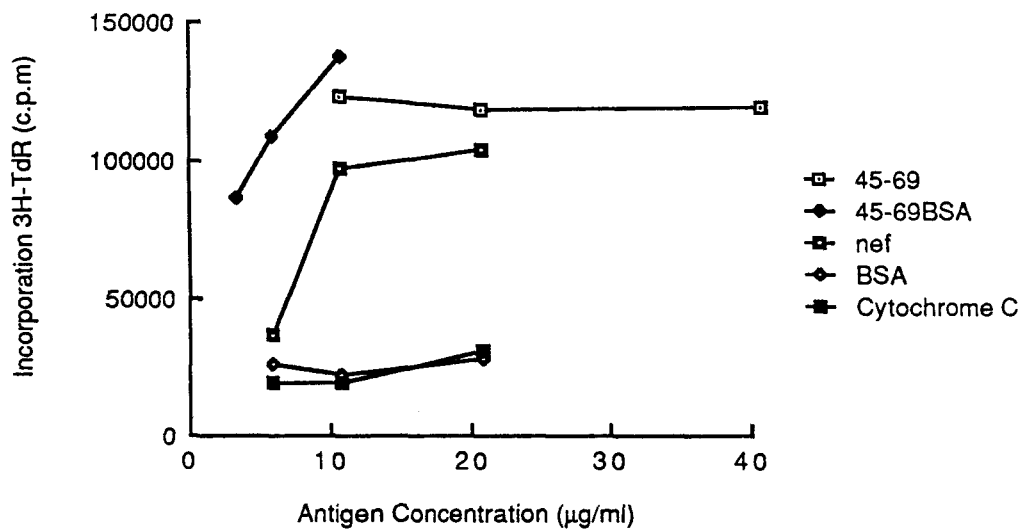


Figure 42 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T de rats immunisés avec le peptide 45-69 de *nef*, après stimulation par différentes concentrations ("antigen concentration") du peptide 45-69 libre ou couplé à l'albumine sérique bovine ("BSA"), de protéine *nef* recombinante, de "BSA" ou de "cytochrome C".

4 - Caractérisation de l'épitope T contenu dans le peptide 45-69

a - Génération de cellules T spécifiques du peptide 45-69

Puisque le peptide 45-69, seul ou couplé à une protéine porteuse, a été capable de stimuler à la fois des cellules T de rats et de chimpanzés, il est très probable qu'il existe un épitope T au sein de cette région de nef. Afin de vérifier cette hypothèse, des cellules T spécifiques du peptide 45-69 ont été préparées en immunisant des rats LOU M avec le peptide 45-69 non porté.

La Figure 42 montre que ces lymphocytes étaient fortement stimulés par le peptide 45-69 couplé sur ASB ou non, mais aussi par la protéine nef. Ni le porteur seul (ASB) ni par la protéine servant de contrôle utilisée (cytochrome C) n'ont provoqué de réponse de ces lymphocytes. Il apparaît donc que le peptide 45-69 testé chez le rat LOU M est immunogène *in vivo* et qu'il contient au moins un épitope T.

b - Identification de l'épitope T minimal contenu dans la zone 45-69 de nef

Pour déterminer la séquence porteuse de l'activité immunologique du peptide 45-69, nous avons sélectionné et synthétisé 3 peptides de 15 résidus couvrant cette région (peptides 45-59, 50-64 et 55-69) (Tableau XII).

Ces peptides ont été synthétisés avec 2 groupes N-terminaux différents, en vue de moduler leur potentiel α -hélicoïdal sans modifier leur séquence : le groupement NH₂ terminal libre (générable par un processus naturel de protéolyse enzymatique dans la cellule présentatrice de l'antigène) qui

peptide	sequence
45-69	SSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFP
45-59	SSNTAATNAACAW
50-64	ATNAACAWLEAQEEE
55-69	AWLEAQEEEEVGFP
50-59	ATNAACAWLE

Tableau XII :

Séquence des différents sous-fragments du peptide 45-69 de *nef*, sélectionnés pour caractériser l'épitope contenu dans ce peptide.

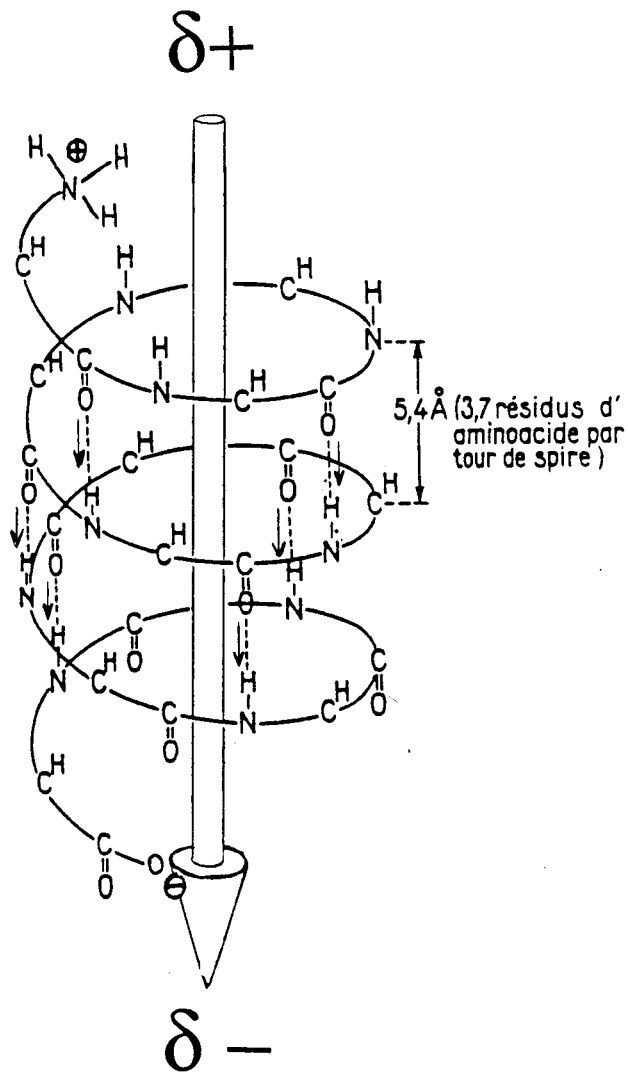


Figure 43 : Hélice α et son moment dipolaire ($\delta+$, $\delta-$) induit par les liaisons hydrogènes stabilisant la structure. Une charge positive N-terminale (NH_3^+) et une charge négative C-terminale (COO^-) défavorisent l'établissement de la structure hélicoïdale.

interagit de façon défavorable avec le dipôle hélicoïdal, et la forme N^α-acétylée de ce groupement (forme artificielle non chargée) plus favorable à l'établissement d'une conformation α-hélicoïdale. En effet, les groupements chargés jouent un rôle crucial dans la stabilité d'une hélice formée par un peptide en solution, et particulièrement un petit peptide (ROTHBARD J. et TAYLOR W., 1988.) : les liaisons hydrogène intracaténares quasiment parallèles à l'axe de l'hélice et qui la stabilisent, induisent l'établissement d'un dipôle, avec une extrémité positive du côté N-terminal et une extrémité négative du côté C-terminal (Figure 43). Ces trois peptides, tout comme le 45-69, ont également été synthétisés sur une résine para-méthylbenzhydrylamine, leur conférant, après clivage, une extrémité C-terminale carboxamide non chargée, favorable à l'établissement de la structure α-hélicoïdale.

La capacité de ces peptides à stimuler *in vitro* les lymphocytes de rats immunisés avec *nef* a été examinée. La Figure 44a nous montre que le peptide 50-64, N^α-acétylé ou pas, stimule fortement les lymphocytes T spécifiques de la protéine *nef*. Une prolifération plus faible est observée en présence du peptide 45-59 mais elle est augmentée par la N^α-acétylation du peptide. Par contre le peptide 55-69 n'induit aucune réponse, qu'il soit N^α-acétylé ou non. Des résultats semblables sont trouvés (Figure 44b) quand les lymphocytes proviennent d'animaux immunisés avec le peptide 45-69. En effet, la réponse obtenue avec le peptide 50-64, N^α-acétylé ou pas, était la plus forte, alors que la réponse proliférative obtenue avec le peptide 45-59 était plus faible mais augmentait avec la N^α-acétylation du peptide. De façon intéressante, la réponse cellulaire T induite par le peptide 50-64 N^α-acétylé est aussi importante que celle obtenue avec le peptide 45-69 utilisé pour immuniser les animaux. Ainsi, ce peptide, bien que ne contenant que 15 acides aminés, est particulièrement antigénique *in vitro*.

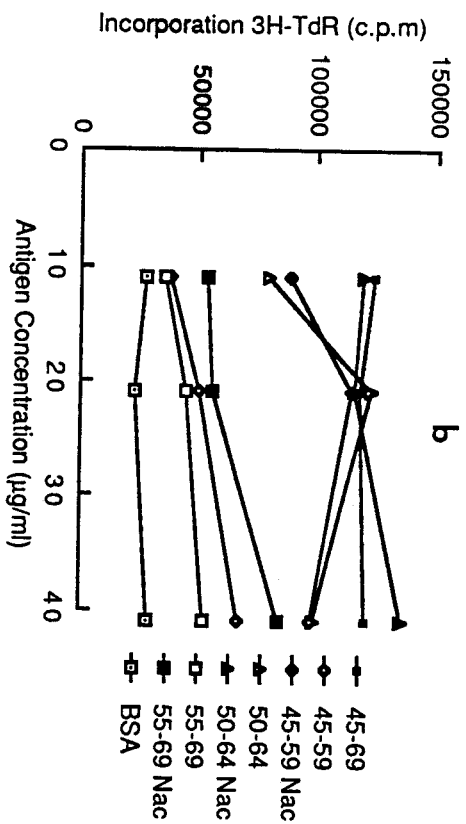
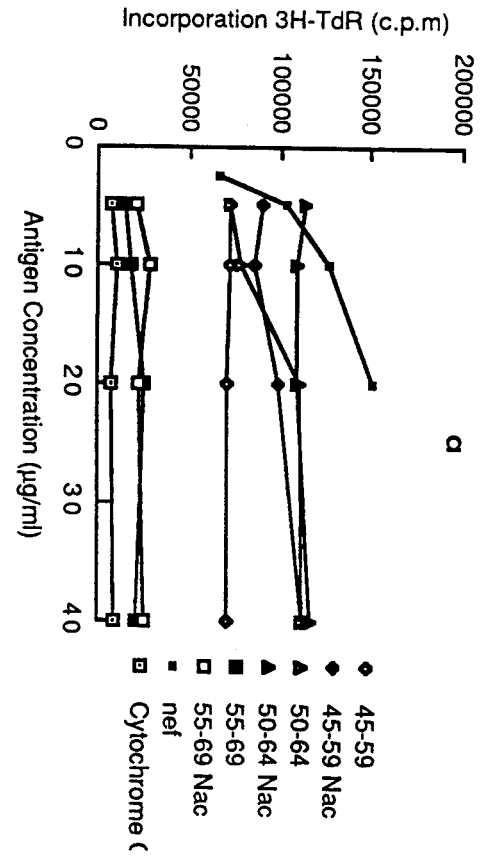


Figure 44 : Prolifération *in vitro* des Lymphocytes T de rats immunisés (a) avec la protéine nef recombinante ou (b) avec le peptide 45-69 de nef , après stimulation par différentes concentrations ("antigen concentration") des sous-fragments du peptide 45-69, N^α-acétylés (Nac) ou pas, ou par la protéine nef recombinante ou par le "cytochrome C" ou par l'albumine sérique bovine ("BSA").

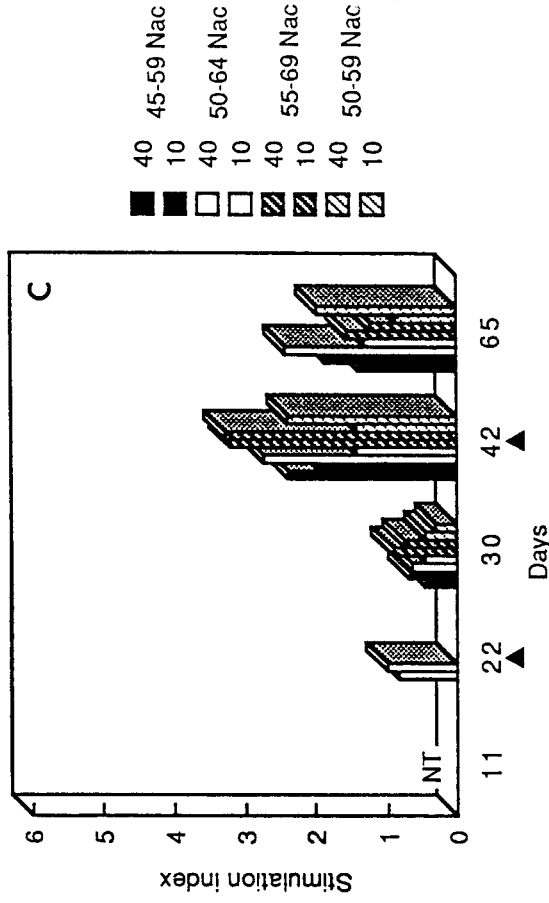
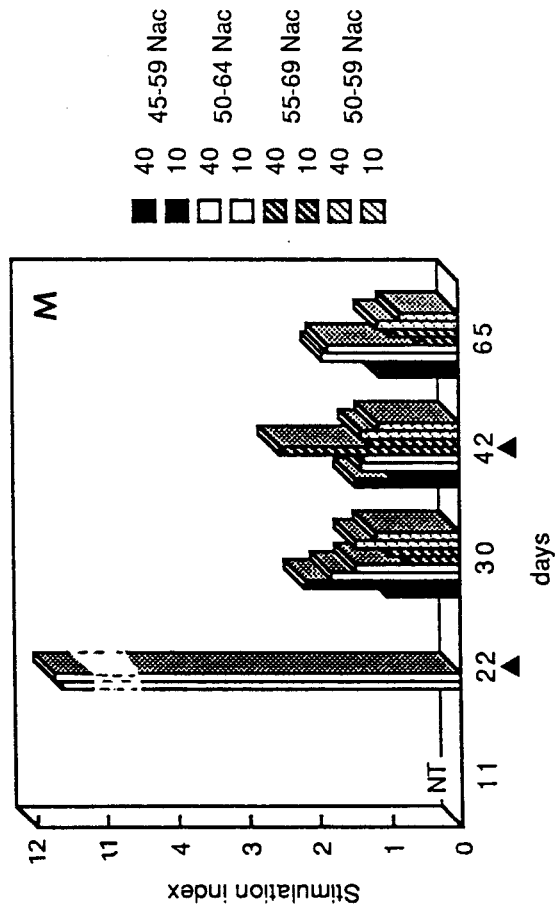


Figure 45 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T des chimpanzés immunisés avec la protéine *nef* recombinante, après stimulation par 2 doses (40 et 10 microgrammes/ml) des sous-fragments du peptide 45-69, N^α-acétylés (Nac) ou pas, à différentes dates ("days") après l'injection de la protéine recombinante.

Qui plus est, les cellules T spécifiques de *nef* provenant des 2 chimpanzés C et M proliféraient en présence du peptide 50-64 comme on vient de l'observer dans le modèle rat. L'effet stimulant de ce sous-fragment était même alors plus important que celui du peptide 45-69 lui-même (Figure 45).

En vue de confirmer que la séquence 50-64 contient effectivement une région épitopique T, les rat LOU M ont été immunisés avec la forme N^α-acétylée de ce peptide. Une prolifération a alors été induite par les peptides 50-64 et 45-69 ainsi que par la protéine *nef* (Figure 46). Par contre, ni l'ASB, ni le cytochrome C, ni l'antigène d'E. coli utilisés comme contrôle ne stimulaient ces lymphocytes T. Le peptide 50-64 est donc, non seulement antigénique, mais également immunogène.

La réponse antigénique obtenue, vis-à-vis des lymphocytes T sensibilisés par *nef* ou le peptide 45-69, avec les peptides 45-59 et 50-64 qui se superposent partiellement, pourrait être due à un épitope T comprenant des résidus portés par les 2 peptides. Toutefois, on ne peut pas exclure la présence de 2 épitopes distincts dans cette région de la protéine *nef*. Nous avons donc synthétisé le peptide 50-59 N^α-acétylé ou non, correspondant à la zone de superposition. Dans la Figure 47 nous pouvons voir que seule la forme N^α-acétylée de ce peptide est capable de stimuler les lymphocytes spécifiques de la protéine *nef* (Figure 47a), du peptide 45-69 (Figure 47b) et du peptide 50-64 (Figure 47c).

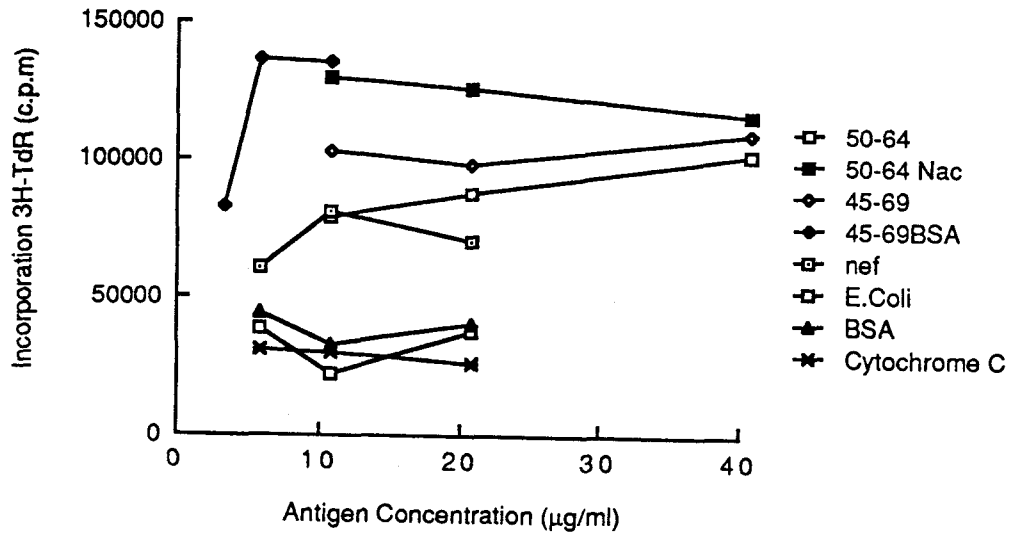


Figure 46 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T de rats immunisés avec le peptide 50-64 N^α-acétylé de nef , après stimulation par différentes concentrations ("antigen concentration") du peptide 50-64 N^α-acétylé ou pas, du peptide 45-69 couplé sur l'albumine sérique bovine ("BSA") ou pas, de la protéine nef recombinante, d'un lysat d'E. coli, de la "BSA" ou du "cytochrome C".

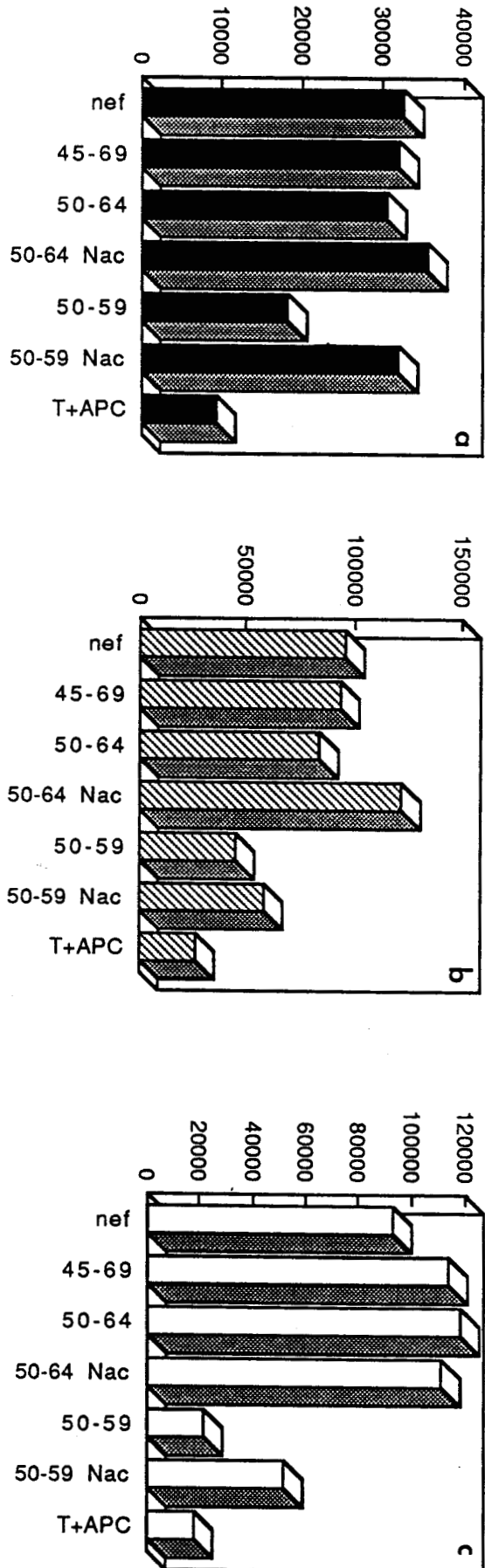


Figure 47 : Prolifération *in vitro* des lymphocytes T de rats immunisés (a) avec la protéine nef recombinante, (b) avec le peptide 45-69 de nef ou (c) avec le peptide 50-64 N^H-acétylé, après stimulation par la protéine nef recombinante, par le peptide 45-69, par certains sous-fragments de ce peptide ou par les cellules présentatrices de l'antigène seules ("T + APC").

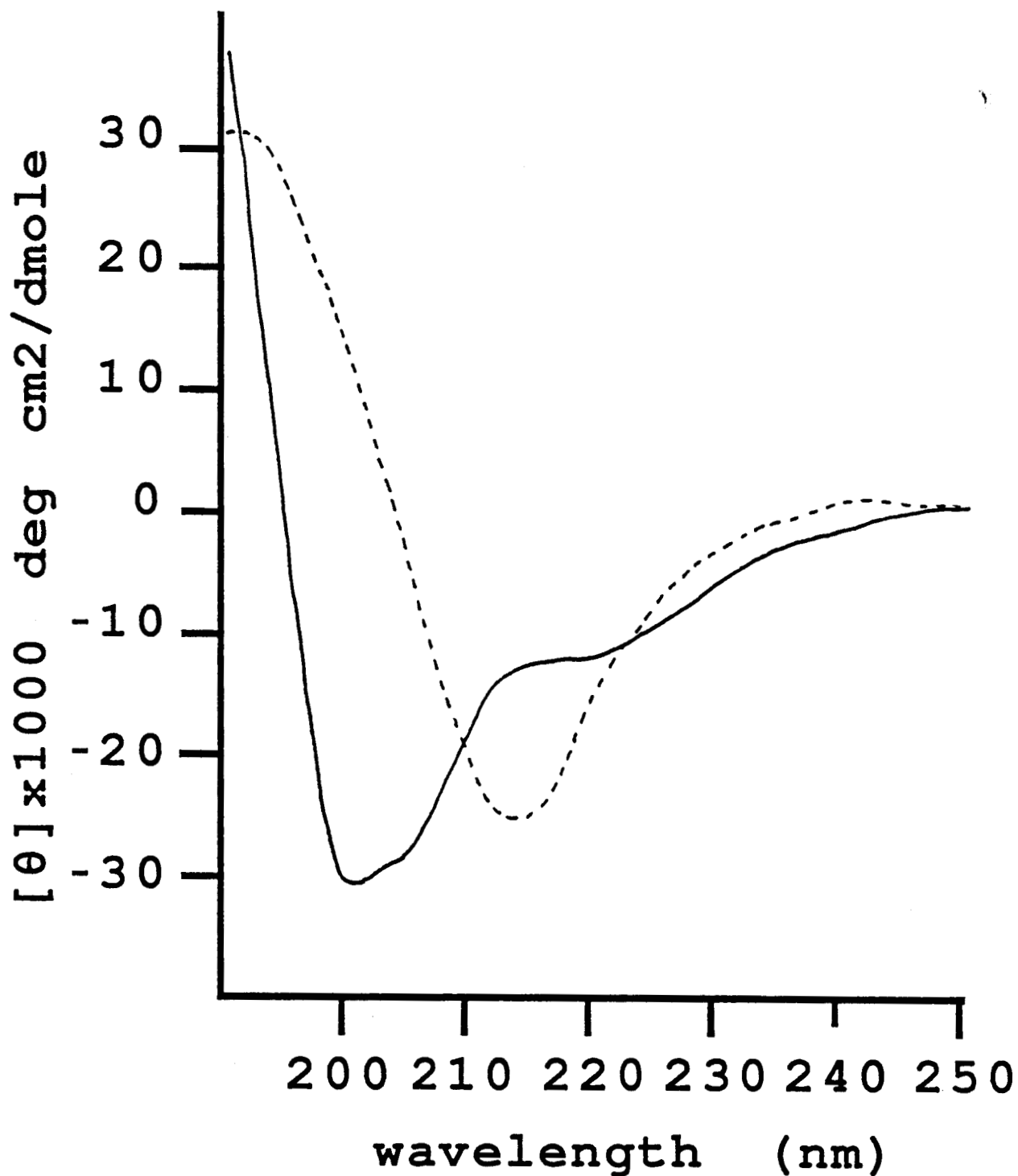


Figure 48 : Spectres de dichroïsme circulaire du peptide 45-69 N^α-acétylé et du peptide 50-64 N^α-acétylé en milieux aqueux (NaCl 0,2M) et à température ambiante. Les spectres sont exprimés sous forme d'ellipticité molaire (deg.cm²/décimole) en fonction de la longueur d'onde ("wavelength").

5 - Etudes conformationnelles

La présence d'une organisation secondaire (structure secondaire) dans les peptides 45-69 et 50-64 N^α-acétylés a été étudiée par dichroïsme circulaire en solution dans un milieu aqueux (Figure 48). Avec deux minima, à 208 nm et 222nm, le spectre de dichroïsme du peptide 45-69 s'est avéré, comme prévu, caractéristique d'une organisation α -hélicoïdale. La proportion hélicoïdale a pu être estimée à 30%, grâce à un calcul effectué à partir du minimum à 222 nm. Le spectre de dichroïsme circulaire du sous-fragment 50-64 N^α-acétylé était caractéristique d'une structure en feuillet plissé β .

Ainsi, seul le peptide 45-69 était assez long pour adopter une structure α -hélicoïdale en solution. Le peptide 50-64, certainement trop court pour présenter une telle conformation, a eu tendance à adopter une organisation en feuillet plissé β . L'implication de l'une ou l'autre des conformation dans l'immunoréactivité n'a pas pu être exploitée à partir des données que nous avons exposées : des études plus poussées et plus détaillées sont actuellement en cours.

6 - Effet auxiliaire *in vivo* par les lymphocytes T spécifiques du peptide 45-69 pour la production d'anticorps anti-*nef*

L'identification, au sein du peptide 45-69, d'au moins un épitope T, capable d'induire et de provoquer une réponse cellulaire proliférative à *nef*, nous a amené à déterminer la capacité de ce peptide à induire une réponse cellulaire T auxiliaire fonctionnelle *in vivo*. Cette réponse a été déterminée *in vivo* dans le modèle rat LOU M, en mesurant la production d'anticorps après immunisation de l'animal avec le peptide 45-69 ou après transfert des

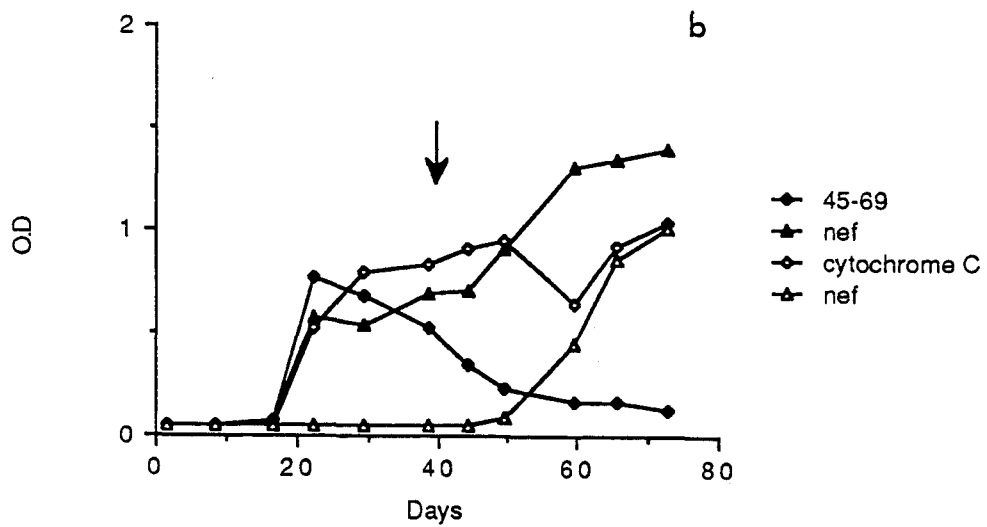
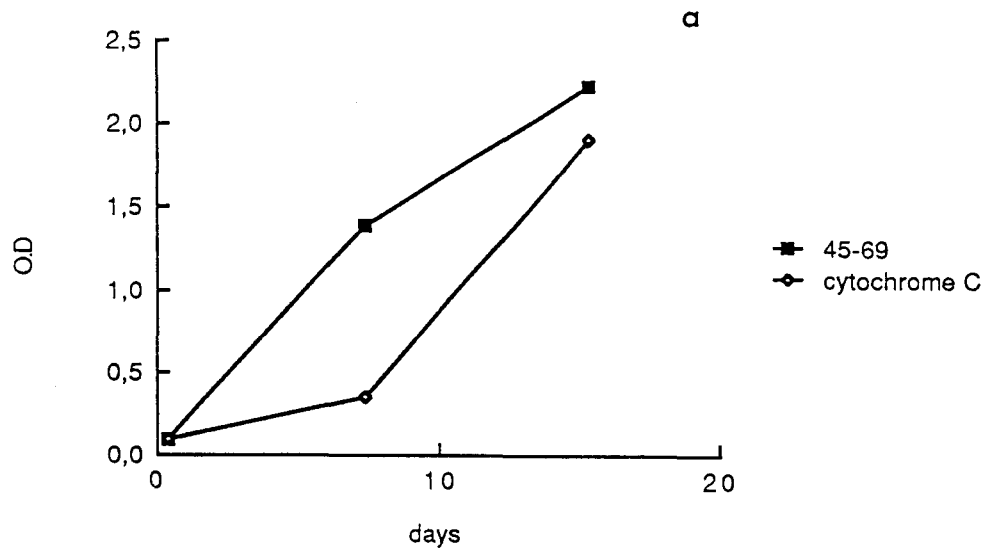


Figure 49 :

Taux d'IgG spécifiques de la protéine *nef*, (a) de 3 rats ayant subi un transfert passif de 10^7 cellules T spécifiques du peptide 45-69 ou de rats témoins ayant reçu des cellules T spécifiques du cytochrome C, 1 jour avant immunisation avec protéine *nef* recombinante, (b) de rats préimmunisés 2 fois avec le peptide 45-69 ou le cytochrome C avant d'être immunisés avec la protéine *nef* recombinante. Ce taux est exprimé en densité optique ("OD").

lymphocytes T spécifiques de 45-69, suivis d'une stimulation par la protéine *nef*. Pour cela, les cellules T spécifiques ont été injectées par voie intraveineuse chez des rats syngéniques (porteurs des mêmes molécules de classe I et II du CMH) (15×10^6 cellules/rat) 1 jour avant immunisation avec 10 microgrammes de protéine *nef* recombinante.

La Figure 49a montre que le transfert passif augmente fortement la production d'IgG spécifiques de *nef*, en comparaison aux sérums d'animaux ayant reçu des cellules T spécifiques du cytochrome C, selon le même protocole. De la même façon, les rats immunisés avec le peptide 45-69 avant la stimulation par la protéine *nef* présentent une nette augmentation de la production d'IgG anti-*nef* (Figure 49b). Il a également été possible d'observer l'induction d'une réponse anticorps aux autres peptides de *nef* (Résultats non montrés). Ainsi, il a été démontré que le peptide 45-69 de *nef* contient un épitope T susceptible de générer une réponse cellulaire T auxiliaire impliquée dans la production d'anticorps anti-*nef*.

C - DISCUSSION

Le but de ce travail était de déterminer les épitopes T auxiliaires de la protéine *nef* de VIH, à l'aide de la protéine recombinante et de peptides synthétiques sélectionnés à partir de la séquence protéique. Il a été possible de montrer que la protéine *nef* recombinante était immunogène puisqu'elle est capable d'induire une réponse cellulaire T spécifique. Les épitopes T ont été recherchés en analysant la capacité de peptides à restimuler les lymphocytes T d'animaux immunisés avec la protéine *nef* entière, et la capacité des lymphocytes spécifiques de ces peptides d'être reconnus par la protéine entière. 5 peptides, contenant chacun 15 à 25 résidus d'acides aminés ont tout d'abord été testés.

Un peptide nous est apparu hautement immunogène et antigénique : il s'agit du peptides 45-69, localisé dans la partie N-terminale de la protéine nef. Le fait que le même site de la protéine soit reconnu par les cellules T spécifiques de nef dans des modèles aussi différents que le rat et le chimpanzé rappelle les travaux concernant la zone T1 de l'enveloppe du virus VIH-1 dans les modèles murins, simiens (CEASE K. et col., 1987.) et humains (BERZOFSKY J. et col., 1988.) ou ceux concernant les sites du circumsporozoïte de la malaria dans les modèles murins (HOSMALIN A. et col., 1989.) et humains (GOOD M. et col., 1987.).

Dans le modèle rat, le peptide 45-69 a été capable d'induire une prolifération cellulaire T spécifique de nef sans être couplé à une protéine porteuse. Par contre, les autres peptides (peptides 2-23, 79-94, 98-112 et 148-161) nécessitaient un couplage sur protéine porteuse (sur ASB) pour induire une prolifération cellulaire T, le porteur ne présentant pas d'effet stimulant par lui-même. Après immunisation par le peptide 45-69, une réponse spécifique a été induite à la fois contre le peptide et la protéine nef. Le peptide, immunogène non porté, contient au moins 1 épitope T présentant une activité auxiliaire fonctionnelle *in vivo* puisqu'une première injection avec le peptide 45-69 ou un transfert passif des lymphocytes T spécifiques de ce peptide à des rats sains, a augmenté la réponse IgG anti-nef, postérieure à l'injection de la protéine. De façon intéressante, l'injection primaire du peptide 45-69 suivie de l'injection secondaire de la protéine nef, a conduit à une augmentation de la réponse à d'autres déterminants de la protéines.

Dans le modèle primate non-humain, le peptide 45-69 a aussi induit une prolifération significative des cellules T d'animaux immunisés avec la protéine nef entière. Même si le peptide 45-69 s'est avéré bon épitope

antigénique chez le chimpanzé, une réponse tardive des cellules T a été observée vis-à-vis du peptide 98-112. Cela reflète très probablement l'aspect dynamique de la réponse immune anti-nef. Le peptide 98-112 était également antigénique chez le rat, mais il nécessitait alors d'être couplé à une protéine porteuse (ASB) pour induire une prolifération des lymphocytes T.

Les cellules présentatrices de l'antigène utilisées dans les expériences présentées ici étaient de natures différentes selon le modèle : cellules thymiques chez le rat et cellules mononucléaires périphériques du sang chez le chimpanzé. Ceci peut constituer une explication à la nécessité que certains peptides ont de fonctionner uniquement couplés à une protéine porteuse. En effet, les processus de dégradation enzymatique et de présentation sont certainement différents dans ces 2 populations cellulaires (dégradations différentes et molécules du CMH différentes).

Le plus petit peptide actif de la séquence 45-69 a pu être étudié en synthétisant différents peptides de cette région et à été identifié sous la forme du peptide 50-59 N^α-acétylé, alors que la forme non acétylée (amine N-terminale libre) de ce peptide est inactive.

L'analyse par dichroïsme circulaire a montré une organisation α -hélicoïdale partielle pour le peptide 45-69, alors que son sous-fragment 50-64 se présentait plutôt dans une conformation β -plissée impliquant très probablement la formation d'agrégats à cause de son caractère fortement hydrophobe. Néanmoins, ces 2 peptides se sont avérés immunogènes et épitopes T. L'absence d'hélicité dans le peptide 50-64 pourrait être due à sa faible longueur qui ne favorise pas une telle organisation en solution aqueuse. Le fait que cette séquence 50-64 soit située au milieu de la séquence 45-69 α -hélicoïdale indique que la séquence 50-64, bien que trop courte pour former

une hélice α par elle-même, possède un fort potentiel pour adopter une telle conformation. Cette tendance peut être amplifiée par un environnement adéquat pour aider à la formation d'une hélice α , et un tel environnement pourrait être fourni par le sillon au sommet des molécules de classe II du CMH. Un intérêt supplémentaire dans l'étude de la tendance α -hélicoïdale nous est apporté par les résultats montrant l'influence de la nature du groupe N-terminal du plus petit peptide actif, le 50-59. En effet, seule la forme N $^{\alpha}$ -acétylée est antigénique vis-à-vis des lymphocytes T spécifiques de la protéine *nef*, du peptide 45-69 N $^{\alpha}$ -acétylé et du peptide 50-64 N $^{\alpha}$ -acétylé. Or, on sait que la présence d'une charge positive en position N-terminale diminue très fortement l'organisation hélicoïdale à cause de l'interaction défavorable avec le dipole de l'hélice, générée par les liaisons hydrogènes parallèles à l'axe de l'hélice (Figure 43). CARBONE F. et col. ont observé que des fragments peptidiques, dont la fonction amine N-terminale est acétylée, adoptent plus facilement une conformation α -hélicoïdale dans un environnement hydrophobe comme l'intérieur de la membrane plasmique (CARBONE F. et col., 1987.). Ainsi, bien que les chaînes latérales du peptide N $^{\alpha}$ -acétylé et du peptide NH₂ soient identiques, ces 2 peptides diffèrent l'un de l'autre par leur stabilité α -hélicoïdale. La forme N $^{\alpha}$ -acétylée qui est antigénique pourrait se révéler la plus facilement accessible pour une bonne présentation au récepteur T. Cette explication est en accord avec les aspects structuraux (forme du sillon au sommet des molécules du CMH). WRAITH D. et col., ont montré que l'interaction d'un peptide de MBP avec une molécule du CMH était optimale quand le peptide était N $^{\alpha}$ -acétylé (WRAITH D. et col., 1989.). La forme N $^{\alpha}$ -acétylée pourrait également conférer une protection vis-à-vis d'une dégradation excessive de l'antigène impliquant des aminopeptidases dont l'action serait bloquée par le groupe acétyle.

La connaissance du rôle des différents acides aminés du peptide 45-69 et plus particulièrement l'identification des résidus impliqués dans l'agrétope (résidus de l'épitope T interagissant avec la molécule du CMH) et l'épitope vrai (résidus de l'épitope T interagissant avec le récepteur T) sont en cours de développement.

D - CONCLUSION

Les résultats présentés ici nous amènent à penser que les critères de localisation des épitope T "putatifs" au sein d'une séquence protéique doivent prendre en compte la tendance α -hélicoïdale des séquences en priorité sur leur degré effectif d'organisation hélicoïdale en milieu aqueux.

On connaît à l'heure actuelle peu de peptides antigéniques qui soient également immunogènes du point de vue de la réponse cellulaire T, sans nécessiter un couplage à une protéine porteuse. Aussi nous avons pu mettre en évidence ici deux peptides qui présentent ces caractéristiques : un peptide de 25 résidus et un de ses sous-fragments de 15 résidus. Ces peptides ne sont pas naturels, en ce sens qu'ils ne pourraient pas provenir d'une dégradation enzymatique dans la CPA ou le milieu extracellulaire, puisque leur extrémité N-terminale est sous forme N^{α} -acétylée. Cette modification qui favorise l'établissement d'une conformation α -hélicoïdale, en faveur d'une bonne interaction avec les molécules du CMH, peut aussi certainement conférer aux peptides immunogènes une bonne résistance aux aminopeptidases et éviter ainsi leur dégradation. Cette hypothèse peut constituer un facteur important pour rendre immunogènes *in vivo* des peptides épitopes T qui, sans cela, ne le seraient pas. Toutefois cela reste à vérifier avec plusieurs épitopes T bien caractérisés. Bien que non naturels, les peptides N^{α} -acétylés actifs que nous avons utilisés présentent d'excellentes réactions croisées avec la protéine

dont ils sont dérivés. Ces considérations nous amènent à penser que ce type de constructions constitue un outil tout à fait efficace dans une nouvelle stratégie vaccinale.

L'identification d'épitopes T auxiliaires de la protéine nef sera certainement d'une grande aide dans la conception de vaccins anti-VIH. En effet, ces épitopes pourraient permettre l'induction précoce, au cours de l'infection, de cellules T produisant des lymphokines qui conduiraient à une augmentation de la réponse immune humorale et de la réponse immune à médiation cellulaire. De plus, comme il apparait de plus en plus évident que la réponse cellulaire T cytotoxique puisse participer au contrôle de l'infection par VIH (WALKER C. et col., 1986 et MARTZ E. et HOWELL D. 1989.), il semble important de savoir quels sont les épitopes T auxiliaires aptes à aider l'induction d'une réponse cytotoxique et si des épitopes bien définis peuvent être reconnus à la fois par les lymphocytes T auxiliaires et les lymphocytes T cytotoxiques.

VII - INDUCTION IN VIVO D'UNE REponse CELLULAIRE T
CYTOTOXIQUE ET D'UNE REponse ANTICORPS SPECIFIQUES DE LA
PROTEINE GP 120 DE VIH-1, A L'AIDE D'IMMUNOGENES
SYNTHETIQUES LIPOPEPTIDIQUES

A - INTRODUCTION

Il a été montré que des peptides synthétiques viraux peuvent être utilisés avec succès pour induire *in vitro* une réponse cellulaire T cytotoxique à partir de cellules de souris immunes (WABUKE-BUNOTI M.A.N. et col., 1984.) ou non (CARBONE F.R. et col., 1988 et MACATONIA S.E. et col., 1989.), ou à partir de cellules mononuclées périphériques chez l'homme (HOGAN K.T. et col., 1988.). Les peptides synthétiques apparaissent donc comme de bons outils pour étudier *in vitro* la réponse cellulaire T cytotoxique contre les virus. Les peptides utilisés pour induire une réponse cytotoxique *in vitro* semblent tous contenir également un épitope capable de stimuler les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, et la génération de cellules T cytotoxiques semble dépendante, au moins dans les stades précoces, de la présence de lymphocytes CD4⁺ (MARTINON F. et col., communication personnelle). Le gros inconvénient de l'induction d'une réponse cellulaire T cytotoxique *in vitro* réside dans le fait que les cellules T cytotoxiques générées ne reconnaissent pas souvent l'antigène viral exprimé naturellement par les cellules cibles, c'est-à-dire les cellules cibles exprimant des antigènes endogènes (il est possible qu'un répertoire de faible affinité soit recruté lors de ces expériences).

In vivo il est quasiment impossible d'induire une réponse cellulaire T cytotoxique anti-virale à l'aide d'un peptide. Habituellement il est nécessaire d'utiliser le virus infectieux ou un virus de la vaccine recombiné

avec un gène du virus à étudier. Seule une équipe allemande est parvenue à obtenir une cytotoxicité *in vivo* à l'aide d'un peptide synthétique (DERES K. et col., 1989.). Ces chercheurs ont synthétisé un peptide pseudolipidique (tripalmitoyl-S-glycérylcystéinyl-séryl-sérine = P₃CSS) dérivé de l'extrémité N-terminale, immunologiquement active, de la principale lipoprotéine d'*Escherichia coli* (lipoprotéine de BRAUN). Ils l'ont alors greffé à un peptide de la nucléoprotéine du virus de la grippe. Cette structure est très difficile à synthétiser et nous avons pensé qu'il était possible d'obtenir la même réponse en utilisant un ou plusieurs synthons pseudolipidiques mitogène beaucoup plus aisés à mettre en oeuvre.

Nous avons donc entrepris, en collaboration avec l'équipe de Professeur J.P. LEVY à l'hôpital COCHIN de PARIS, l'étude des conditions de l'induction *in vivo* d'une réponse cellulaire T cytotoxique en immunisant des souris à l'aide de peptides synthétiques modifiés (lipopeptides) ou pas. Pour cela, nous avons utilisé une séquence connue pour être épitopique T cytotoxique chez la souris (TAKAHASHI H. et col., 1988.) : la séquence 312-327 de la gp120 (codée par le gène *env*) du virus VIH-1 LAV_{bru}. Nous avons aussi utilisé une séquence plus grande comprenant également cet épitope : la séquence 302-335 de la gp120 du virus VIH-1 LAV_{bru}. La séquence 312-327 de gp120 contient également un épitope T auxiliaire, caractérisé chez la souris (TAKAHASHI H. et col., 1990.). Or de tels épitopes semblent représenter une condition nécessaire (mais non suffisante) à l'induction d'une réponse cellulaire T cytotoxique, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

D'autre part, HOPP T.P. avait montré qu'il était possible d'augmenter l'immunogénicité (du point de vue de la réponse anticorps) d'un peptide synthétique en lui greffant 1 acide aminé pseudolipidique (Nε-palmitoyl-lysine) (HOPP T.P., 1984.). Or, la zone de la gp120 que nous avons envisagé

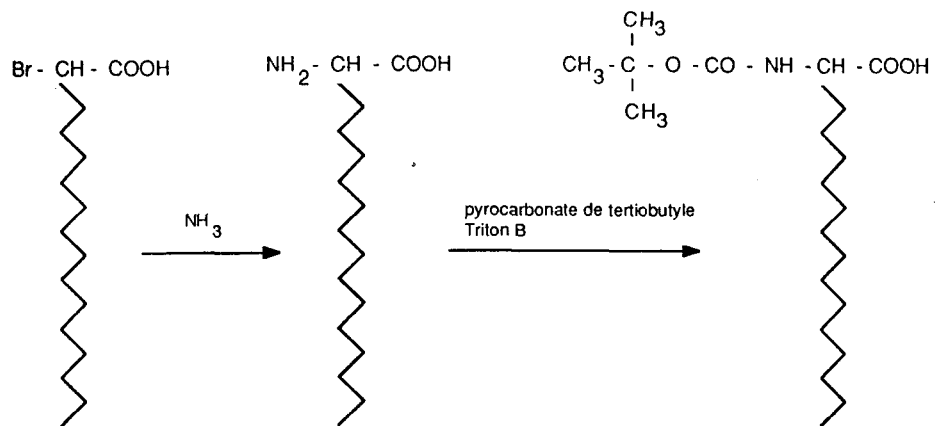


Figure 50 : Etapes de synthèse de l'acide N^α-BOC amino-2 hexadécanoïque.

d'étudier contient également une épitope B neutralisant (RUSCHE J.R. et col., 1988.). Cela signifie que des anticorps dirigés contre cet épitope sont capables de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules cibles saines par le virus VIH-1. Nous avons donc étudié au laboratoire la réponse anticorps chez la souris vis-à-vis des mêmes lipopeptides, parallèlement à la réponse cytotoxique examinée par l'équipe du Professeur J.P. LEVY.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Synthèse de l'acide amino-2 hexadécanoïque (acide aminé libre) (Figure 50)

Avant de synthétiser l'acide tert.-butyloxycarbonyl (BOC) amino-2 hexadécanoïque nous avons préparé l'acide amino-2 hexadécanoïque par substitution nucléophile d'ordre 2 du brome de l'acide bromo-2 hexadécanoïque par l'ammoniaque, dans l'eau, sous pression à 60°C, pendant 15 heures. Le produit brut obtenu étant très difficile à dissoudre, nous avons essayé de nombreux solvants (eau, éthanol, acide formique à 70% dans l'eau, acétate d'éthyle, toluène, toluène/acétonitrile, acétate d'éthyle/acétonitrile ou acide acétique à température ambiante) avant de réussir à le mettre en solution dans l'acide acétique bouillant.

Le rendement de synthèse de l'acide amino-2 hexadécanoïque sous forme d'acétate (cristaux blancs) était de 46% après purification par recristallisations successives dans l'acide acétique. Le produit obtenu a été caractérisé par son point de fusion (144°C, contre 56°C pour l'acide bromo-2 hexadécanoïque), par son comportement en chromatographie sur couche mince de silice ($R_f = 0,82$ dans le système de solvant A, contre 0,5 pour l'acide bromo-2 hexadécanoïque et $R_f = 0$ dans le système de solvant B contre 1 pour l'acide

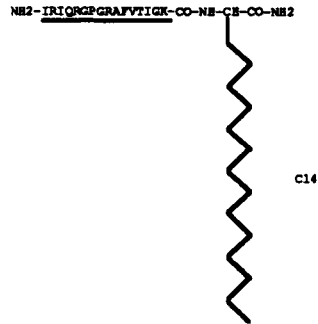
bromo-2 hexadécanoïque) et en spectrométrie de masse PDMS (MM = 270 correspondant à la masse attendue).

2 - Synthèse de l'acide N^α-BOC amino-2 hexadécanoïque (acide aminé N^α-protégé) (Figure 50)

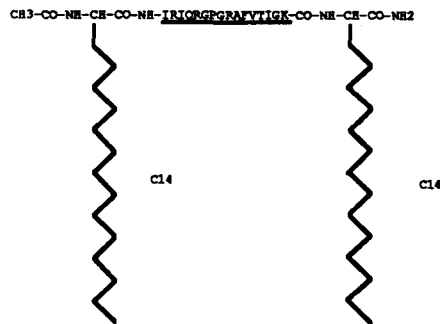
Pour remettre en solution l'acide amino-2 hexadécanoïque, nous lui avons adjoint 1,1 équivalent de détergent, l'hydroxyde de benzyl-triméthylammonium en solution à 40% dans le méthanol, le tout dilué dans le DMF qui s'est révélé le seul solvant efficace. Le détergent a créé un effet dispersif par interaction hydrophobe avec la chaîne aliphatique de l'acide aminé. Après évaporation (DMF incompatible avec l'étape suivante de synthèse) et séchage du produit dissout, celui-ci est plus facilement repassé en solution dans l'alcool tertiobutylique, le détergent étant toujours présent. Néanmoins, cette étape de solubilisation de l'acide amino-2 hexadécanoïque a constitué un facteur très limitant de la synthèse de l'acide BOC amino-2 hexadécanoïque (voir le rendement). Il est intéressant de remarquer que la structure du détergent semble importante pour solubiliser l'acides aminé. En effet, le triton X 100 (octylpnénolpoly(éthylèneglycoléther)_n) s'est révélé inapte à la solubilisation, son utilisation ayant conduit à des rendements de synthèse particulièrement faibles.

Nous avons ensuite ajouté du bicarbonate de potassium et 2,5 équivalents de pyrocarbonate de tertiobutyle (par rapport à l'acide aminé) servant à former le dérivé BOC de l'acide aminé que nous avons préparé. La réaction s'effectuant à pH basique, nous avons ajusté ce dernier entre 8 et 9 à l'aide de carbonate de sodium. Le pH a ainsi été maintenu constant pendant les premières heures de contact et le déroulement de la réaction a été suivi en

Préparation 1



Préparation 2



Préparation 3

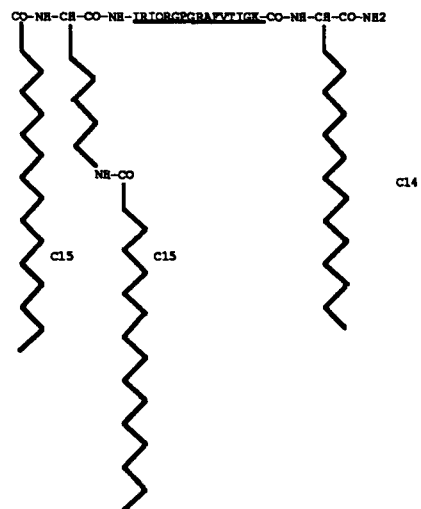


Figure 51 : 3 constructions lipopeptidiques (Préparations 1, 2 et 3) sur la base de la séquence 312-327 de la glycoprotéine d'enveloppe *gp120* du virus VIH-1.

chromatographie sur couche mince de silice en effectuant des prélèvements périodiques (Rf de l'acide BOC amino-2 hexadécanoïque = 1 dans le système de solvant A contre 0,82 pour l'acide amino-2 hexadécanoïque et le Rf de l'acide BOC amino-2 hexadécanoïque = 0,67 dans le système de solvant B contre 0 pour l'acide amino-2 hexadécanoïque).

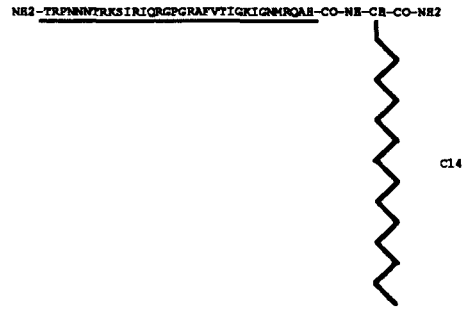
Quand il n'est plus resté d'acide amino-2 hexadécanoïque dans le milieu réactionnel, le produit obtenu a été repris dans de l'eau et acidifié par l'acide chlorhydrique. Ainsi, s'il restait des traces d'acide amino-2 hexadécanoïque, elles se sont retrouvées sous la forme d'un sel de chlorure, soluble dans l'eau et pas dans l'acétate d'éthyle dans lequel l'acide BOC amino-2 hexadécanoïque a été extrait. Après lavage et séchage de la phase organique, le produit de réaction a été cristallisé plusieurs fois dans l'hexane refroidi.

On a ainsi obtenu des cristaux blancs avec un rendement de 16%. Le produit a été caractérisé par son point de fusion (85°C), par son comportement en chromatographie sur couche mince de silice (Rf = 1 dans le système de solvant A et 0 dans le système de solvant B) et en spectrométrie de masse PDMS (MM = 370,8 correspondant à la masse attendue, et MM = 270 correspondant à l'ion moléculaire fragmenté par clivage du groupement BOC).

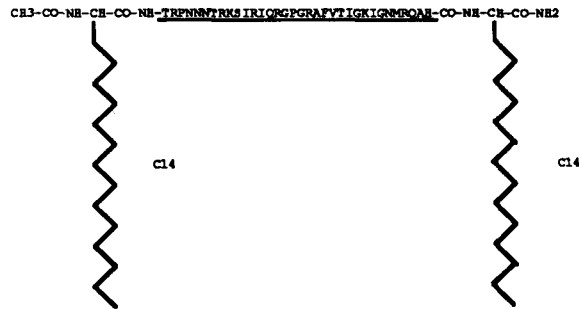
3 - Synthèse des lipopeptides

Le choix des séquences construites sous forme lipopeptidique s'est porté sur la région 312-327 de *gp120* du virus VIH-1 LAV_{bru} (Figure 51) afin d'étudier la réponse T cytotoxique, et sur un peptide plus long : la région

Préparation 1'



Préparation 2'



Préparation 3'

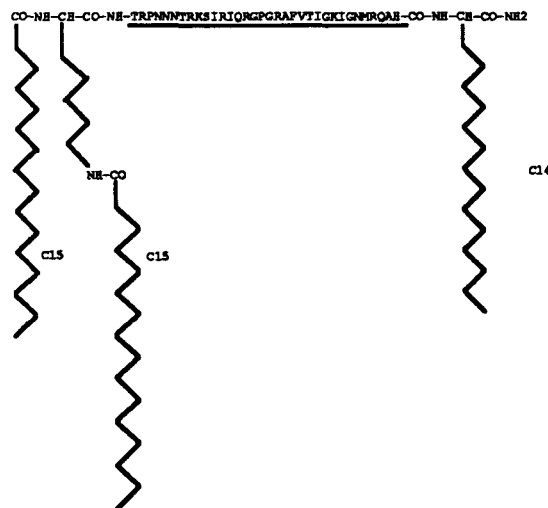


Figure 52 : 3 constructions lipopeptidiques (Préparations 1', 2', et 3') sur la base de la séquence 302-335 de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du virus VIH-1.

302-335 de la même protéine (Figure 52) pour étudier la réponse anticorps. Nous avons effectué 3 préparations avec chacune des 2 séquences (Figure 51 et 52).

La synthèse a été réalisée selon une stratégie en phase solide (MERRIFIELD R.B., 1963.). Tous les lipopeptides ont été synthétisés sur une résine benzhydrylamine (chargée à 0,72 millimole/gramme). Dans tous les cas, le premier acide aminé greffé était l'acide BOC amino-2 hexadécanoïque (2 équivalents). Ceci nous a permis d'obtenir des constructions où l'acide aminé C-terminal était l'acide amino-2 hexadécanoïque sous forme amide afin d'éviter la présence d'une charge à proximité de la chaîne aliphatique hydrophobe (Figures 51 et 52). Après acétylation par l'anhydride acétique en milieu basique, afin de bloquer les sites réactifs libres, nous avons effectué le clivage du BOC N-terminal puis le couplage du premier acide aminé des 2 séquences respectives.

Toutes ces étapes ont été réalisées manuellement, ce qui nous a permis d'effectuer des contrôles très précis des couplages de l'acide aminé pseudolipidique et du premier acide aminé sur celui-ci. L'agent de couplage n'était pas, ici, la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) mais l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxy trisdiméthylaminophosphonium (BOP) en présence d'hydroxybenzotriazole (HOBT) et de diisopropyléthylamine (DIEA). Aussi, grâce à cette méthode de couplage très performante, le rendement de ces deux réactions de couplage a toujours été supérieur à 99,5% malgré le fort encombrement stérique de l'acide BOC amino-2 hexadécanoïque. La suite des synthèses s'est effectuée de façon classique jusqu'au dernier acide aminé des deux séquences retenues.

A ce stade, chacune des 2 peptidyl-résines a été divisée en 3 lots, traités manuellement :

- 1 lot a été conservé tel quel;
- 1 lot a été greffé par l'acide BOC amino-2 hexadécanoïque. Le couplage manuel (au BOP) de ce dernier a été suivi d'un clivage du BOC N-terminal et d'une acétylation de la fonction amine ainsi démasquée. Cela a permis d'éviter la présence d'une charge à proximité de la chaîne aliphatique hydrophobe de l'acide aminé pseudolipidique;
- sur 1 troisième lot a été couplé la N^αN^ε-diBOC lysine. Le couplage manuel (au BOP) de cette dernière a été suivi d'un clivage des 2 groupements BOC et du couplage de l'acide palmitique (au moyen du BOP). Nous avons ainsi obtenu des peptides possédant une dipalmitoyl-lysine en position N-terminale.

Ces couplages ont fait l'objet d'un contrôle étroit qui a révélé des rendements toujours supérieurs à 99,5%. Ces résultats confirment l'intérêt de l'utilisation du BOP comme agent activant en synthèse peptidique, surtout pour coupler les acides aminés pseudolipidiques ou pour effectuer un couplage sur ces derniers.

Les lipopeptides synthétisés ont ensuite été clivés de leur support. Les lipopeptides dérivés de la séquence 312-327 ont été clivés selon la technique "High HF", alors que ceux dérivés de la séquence 302-335, contenant une méthionine(O) ont été clivés selon la technique "Low HF" suivi d'un "High HF" après que leur histidine(DNP) ait été déprotégée. Les rendements de coupures sont assez faibles, compris entre 40 et 70%. L'explication la plus probable est que l'encombrement stérique de l'acide amino-2 hexadécanoïque, directement lié à la résine, a certainement gêné le clivage de la liaison dont on sait qu'elle est déjà difficile à rompre dans les conditions habituellement utilisées.

Injection in vivo	Stimulation in vitro	Cible	Activité cytolytique	
			<J21	>J21
RIEN	<i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327 ^a	-	++
		Vac-env ^b	-	-
Vac-env		<i>gp120</i> 312-327	++*	
		Vac-env	++*	
<i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327	-	++
		Vac-env	-	-
Lipopeptides <i>gp120</i> 312-327				
Préparation 1	<i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327	+++	+++
		Vac-env	+++	+++
Préparation 2	<i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327	-	++
		Vac-env	-	++
Préparation 3	<i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327	-	-
		Vac-env	-	-
<i>gp120</i> 302-336	<i>gp120</i> 302-336 ou <i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327	-	-
Lipopeptides <i>gp120</i> 302-335				
Préparation 1'	<i>gp120</i> 302-336 ou <i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327	+++	+++
Préparation 2'	<i>gp120</i> 302-336 ou <i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327	+++	+++
Préparation 3'	<i>gp120</i> 302-336 ou <i>gp120</i> 312-327	<i>gp120</i> 312-327	-	-

^a Cellules cibles syngéniques en présence de 3 µM de peptide *gp120* 312-327.

^b Cellules cibles syngéniques infectées par un virus de la vaccine permettant l'expression du gène env de VIH.

* TAKAHASHI H. et col., 1988.

Tableau XIII :

Mesure de la réponse cellulaire T cytotoxique vis-à-vis du peptide 312-327 de *gp120*, ou vis-à-vis du produit du gène env exprimé dans le virus de la vaccine, avant ou après les 21 jours suivant l'immunisation in vivo par les préparations lipopeptidiques 1, 2, 3, 1', 2' et 3' (Figures 51 et 52).

Après 2 lavages selon la procédure "TFA-éther", l'identité des lipopeptides a été contrôlée en analyse d'acide aminé après hydrolyse acide totale et, pour certains, en spectrométrie de masse PDMS (certains ne volent pas). Leur homogénéité a été vérifiée en chromatographie sur couche mince de silice et CLHP en phase inverse analytique.

Nous avons donc obtenu les 6 constructions lipopeptidiques représentées dans les Figures 51 et 52.

4 - Induction *in vivo* d'une réponse cellulaire T cytotoxique chez la souris

Les résultats exposés dans le Tableau XIII nous montrent que de fortes réponses cellulaires T cytotoxiques sont inductibles par des lipopeptides *in vivo* et sans adjuvant chez la souris.

Quelle que soit la séquence, la première Préparation (1 ou 1') s'est révélée la plus immunogène *in vivo*. Qui plus est, elle s'est montrée plus active que l'immunisation par le virus de la vaccine exprimant le gène *env* (codant pour la *gp120*) recombinant. Les peptides non modifiés n'ont pas induit de réponse cytotoxique mesurable, exceptée une faible réponse avec le peptide 312-327 après 21 jours, mais cela était certainement dû à une immunisation *in vitro* lors de la stimulation puisqu'on observe le même phénomène avec les cellules de souris non immunisées. Il est possible d'utiliser indifféremment le peptide 312-327 ou le peptide 302-336 comme stimulants ou comme cibles. Parallèlement à ces expériences, il a été vérifié que des constructions lipopeptidiques semblables, opérées avec le peptide 147-158 R⁻ (de la nucléoprotéine du virus de la grippe) utilisé dans l'étude de DERES K. et col.

(DERES K. et col., 1989.), donnent des résultats similaires à ceux exposés ici (MARTINON F. et col., communication personnelle).

L'immunogénicité est inversement proportionnelle à l'hydrophobie de l'immunogène lipopeptidique. En effet, quelle que soit la séquence, la première Préparation (1 ou 1') est la moins hydrophobe et la troisième Préparation (3 ou 3') la plus hydrophobe, et la séquence 312-327 a un caractère plus hydrophobe que la séquence 302-335. Cette propriété physicochimique est directement reliée à la solubilité des produits dans les solvants aqueux utilisés lors des manipulations immunologiques. Or, sachant que les immunogènes sont filtrés avant d'être injectés, on peut se demander si les structures les plus hydrophobes ont réellement été injectées en quantité suffisante pour induire une réponse, car il est très probable que de telles structures aient au moins le même potentiel que les moins hydrophobes. En résumé, les résultats nous montrent qu'une structure lipopeptidique relativement simple est capable d'induire *in vivo* une réponse cellulaire T cytotoxique mais il est encore un peu tôt pour conclure que la première Préparation (1 ou 1') (la plus simple et la moins hydrophobe) est effectivement la plus active.

Les résultats obtenus ici sont en désaccord avec ceux provenant des travaux de CARBONE F.R. et BEVAN M.J. et de ISHIOKA G.Y. et col. qui ont obtenu des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'antigène après immunisation *in vivo* par des peptides de l'ovalbumine (CARBONE F.R. et BEVAN M.J., 1989, ISHIOKA G.Y. et col., 1989.). Toutefois, ces auteurs n'indiquent pas l'importance de l'adjuvant dans leur conditions d'immunisation, mais ils laissent supposer qu'un adjuvant même "doux" serait nécessaire à l'obtention d'une telle réponse.

Plus récemment, AICHELE P. et col. ont réussi à induire une réponse T cytolytique par injections répétées *in vivo* d'un peptide synthétique en émulsion dans l'adjuvant incomplet de FREUND (AICHELE P. et col., 1990.). Ce dernier travail ainsi que celui de DERES K. et col. sont en accord avec nos résultats et suggèrent que les peptides seuls ne semblent pas capables de stimuler des lymphocytes T cytotoxiques *in vivo* (DERES K. et col., 1989.).

Nous ne connaissons pas à l'heure actuelle les raisons pour lesquelles les lipopeptides ont un pouvoir immunogène T cytotoxique nettement supérieur aux peptides seuls, et au moins équivalent au virus de la vaccine exprimant le gène entier. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. (I) DORES K. et col. ont proposé un mécanisme possible impliquant l'activation de certaines cellules immunitaires par la structure lipidique, provoquant la sécrétion de cytokines activatrices des lymphocytes T cytotoxiques (DORES K. et col., 1989.). Cette hypothèse est étayée par la démonstration du pouvoir mitogène du complexe lipopeptidique impliqué dans leur construction, mais elle n'est pas valable dans le cas de nos constructions lipopeptidiques. En effet, aucun effet mitogène n'a pu être mis en évidence avec chacune des 6 molécules que nous avons synthétisées. (II) Les mêmes auteurs ont également évoqué un rôle protecteur des lipides contre la dégradation du peptide *in vivo*. Cette protection augmenterait la demi-vie du lipopeptide, lui permettant d'être présent plus longtemps dans l'organisme et augmentant ainsi ses chances d'être repéré par le système immunitaire. (III) Il est possible également que les chaînes lipidiques permettent aux peptides de traverser plus facilement les membranes cellulaires et d'être guidés, plus rapidement ou plus efficacement, vers les voies métaboliques de dégradation des antigènes endogènes conduisant à une présentation par les molécules de classe I du CMH. (IV) D'autre part, les structures lipopeptidiques injectées (par voie intrapéritonéale qui est très semblable à la voie intraveineuse) ne restent certainement pas longtemps

Injection <i>in vivo</i>	Réponse anticorps <i>in vitro</i> (Ag = gp 120 302-336)			
	IgM		IgG	
	J13	J47	J13	J47
gp120 302-336 (SC)	-	-	-	-
RIEN	-	-	-	-
Préparation 1' (SC)	-	-	-	+
Préparation 2' (SC)	-	-	-	+
Préparation 3' (SC)	-	-	-	+++
Préparation 1' (SC, Adj. FREUND)	-	-	-	+++
Préparation 2' (SC, Adj. FREUND)	-	+	-	+++
Préparation 3' (SC, Adj. FREUND)	-	+	-	+++
Préparation 1' (SC, SiC18)	-	+	-	-
Préparation 2' (SC, SiC18)	-	+	-	-
Préparation 3' (SC, SiC18)	-	++	-	+++
Préparation 1' (SC, Squalène)	-	-	-	++
Préparation 2' (SC, Squalène)	-	-	-	+++
Préparation 3' (SC, Squalène)	-	+	-	+++
Préparation 1' (IP)	-	-	-	+
Préparation 2' (IP)	-	+	-	+
Préparation 3' (IP)	-	+	-	+

Tableau XIV :

Mesure de la réponse anticorps vis-à-vis du peptide 302-336 de gp120, 13 et 47 jours après l'immunisation *in vivo* par les préparations lipopetidiques 1', 2' et 3' (Figure 52).

telles quelles dans la circulation. Elles sont sans doute rapidement intégrées à des structures lipoprotéiques (on pense aux LDL par exemple), puis captées par des cellules possédant un récepteur spécifique des lipoprotéines pour rejoindre un métabolisme identique à celui que nous venons d'envisager. Il va de soi que toutes ces hypothèses ne sont ni exhaustives ni exclusives les unes par rapport aux autres.

5 - Induction *in vivo* d'une réponse anticorps chez la souris

Parallèlement à la réponse cytotoxique, nous avons étudié au laboratoire, la réponse anticorps chez la souris vis-à-vis des 3 Préparations lipopeptidiques dérivées de la séquence 302-335 de *gp120*. Pour cela nous avons utilisé le même type de souris que celles qui ont servi à l'étude de la réponse T cytotoxique, à savoir des souris Balb/c (d'haplotype H-2^d). L'antigène qui nous a permis de mesurer la réponse était le peptide 302-336 de *gp120*.

Les résultats exposés dans le Tableau XIV nous montrent qu'une réponse anticorps est inductible *in vivo* par des lipopeptides chez la souris. Il est toutefois nécessaire d'effectuer au moins un rappel pour obtenir une telle réponse.

En utilisant les mêmes conditions d'immunisation que dans l'étude de la cytotoxicité (injection par voie intrapéritonéale sans adjuvant), la réponse anticorps mesurée est très modeste, tant en IgM qu'en IgG. Nous avons également testé plusieurs effets adjuvants par voie sous-cutanée. Les billes de silice greffées en C18 se sont révélées peu adjuvantes sauf peut-être pour la réponse IgM qui, bien que relativement tardive, a été la plus forte dans ces conditions. L'adjuvant de FREUND et le squalène ont permis les plus fortes réponses. Sans adjuvant et par voie sous-cutanée, la réponse n'est pas

négligeable : la Préparation 3' permet une réponse aussi forte qu'avec l'adjuvant de FREUND ou le squalène. Nous n'avons pas obtenu de réponse chez les souris immunisées avec le peptide 302-336 seul, ni chez les souris non immunisées.

Quand l'adjuvant s'avère efficace (adjuvant de FREUND ou squalène) la Préparation lipopeptidique ne semble pas influencer la réponse. Par contre, sans adjuvant ou avec les billes de silice greffées la réponse la plus forte est obtenue avec la Préparation la plus hydrophobe. Donc, contrairement à l'immunogénicité T cytotoxique, l'immunogénicité B semble dépendante de l'hydrophobie de l'immunogène lipopeptidique. Cette propriété a pu être mise en évidence car, contrairement aux immunisations effectuées pour étudier la réponse T cytotoxique, nous n'avons pas filtré les solutions lipopeptidiques injectées aux souris. Il est possible qu'il y ait eu un effet de concentration au point d'injection et une augmentation de la demi-vie par diminution de la diffusion des molécules peu solubles. Cela contribuerait à une exposition prolongée au système immunitaire. Par contre, un effet mitogène de la partie pseudolipidique est peu probable, pour les mêmes raisons que celles exposées dans l'étude de la cytotoxicité.

C - CONCLUSION

C'est la seconde fois qu'est mise en évidence la possibilité d'induire *in vivo* une réponse cellulaire T cytotoxique forte (aussi forte qu'avec un virus recombinant exprimant l'antigène) à l'aide d'un lipopeptide. La première fois, DERES K. et col. ont utilisé un synthon pseudolipidique complexe dont la synthèse est difficile à mettre en oeuvre (DERES K. et col., 1989.).

L'acide aminé pseudolipidique que nous avons utilisé (acide amino-2 hexadécanoïque) pour obtenir cette réponse est relativement facile à synthétiser et il est possible d'obtenir rapidement des quantités conséquentes de matériel. Le réactif de départ (acide bromo-2 hexadécanoïque) est racémique puisqu'il présente les 2 configurations R et S au niveau de son carbone α asymétrique. Il va de soi que le protocole de synthèse adopté a également conduit aux deux énantiomères de l'acide aminé protégé (acide BOC amino-2 hexadécanoïque R,S) dans la proportion probable 50/50. Nous ne savons donc pas, à l'heure actuelle, si l'activité mise en évidence est portée par l'énantiomère R, par le S ou indifféremment par les deux. L'un de nos objectifs est donc de séparer les deux diastéréoisomères obtenus après greffage sur le peptide, et de tester leurs activités respectives. Nous avons déjà obtenu une séparation analytique en CLHP en phase inverse sur une colonne greffée en C4 et dans des conditions très résolutive. Nous espérons pouvoir reproduire ces résultats en CLHP préparative à l'aide d'une colonne de plus grande taille. Cette stratégie nous semble beaucoup plus facile à mettre en oeuvre, que la synthèse stéréospécifique de l'acide BOC amino-2 hexadécanoïque.

D'autre part, nous avons d'ores et déjà envisagé de nouvelles constructions lipopeptidiques afin de répondre à d'autres questions :

- savoir si des synthons pseudolipidiques encore plus faciles à mettre en oeuvre sont toujours actifs;
- connaître le positionnement du, ou des, synthons pseudolipidiques permettant une activité maximale;
- connaître la voie métabolique qui permet d'induire une réponse cellulaire T cytotoxiques avec des structures lipopeptidiques.

Nous avons vu que les peptides utilisés seuls ne sont pas capables d'induire *in vivo* une réponse T cytotoxique, pas plus qu'une réponse anticorps chez la souris. Ceci démontre clairement que les 2 types de réponses obtenues avec nos préparations lipopeptidiques ne sont pas dues au seul fait de la présence d'un épitope T auxiliaire (en plus de l'épitope T cytotoxique et de l'épitope B) dans la séquence utilisée (TAKAHASHI H. et col., 1990.) mais également à (ou aux) l'acide(s) aminé(s) pseudolipidique(s) greffé(s).

La région 312-327 de *gp120* contient à la fois 1 épitope B neutralisant (RUSCHE J.R. et col., 1988), 1 épitope T auxiliaire (TAKAHASHI H. et col., 1990.) et un épitope T cytotoxique (TAKAHASHI H. et col., 1988.) chez la souris. Grâce aux structures lipopeptidiques que nous avons employées, nous sommes parvenus à induire à la fois une réponse anticorps et une réponse cytotoxique dans ce modèle. Des essais sont actuellement en cours chez le chimpanzé afin d'étudier les effets de ces 2 types de réponse sur l'infection par le virus VIH-1.

CONCLUSION GENERALE

Le but de notre étude est de mieux comprendre les interactions entre peptides et récepteurs impliqués dans la réponse immune, afin de dégager des relations entre les structures identifiées, et leur activité antigénique, ou immunogénique. Nos travaux sont menés dans le cadre de recherches concernant la synthèse chimique de molécules vaccinales, ou de réactifs d'aide au diagnostic, dans des modèles parasitaires et viraux.

Du point de vue de l'antigénicité, nous avons cherché à mettre au point des réactifs d'aide au diagnostic. Les progrès de la synthèse peptidique, nos connaissances et notre maîtrise des réactions secondaires et de méthodes de contrôles performantes, nous ont permis de développer la synthèse totale de protéines par voie chimique (modèle vpr du virus d'immunodéficience humaine). Cette méthode permet de s'affranchir de contaminants issus de l'organisme producteur inhérent à la synthèse par génie génétique. Une appréciation fine de la nature des contaminants issus d'une production par synthèse chimique nous a amené à définir un protocole de synthèse sans "capping", conduisant à un produit de qualité acceptable par rapport à l'utilisation envisagée. La protéine totalement synthétique (il s'agit de l'une des miniprotéines les plus longues ainsi préparées à l'heure actuelle), obtenue avec de très bon rendements, est reconnue par des sérums humains d'infection. L'obtention d'une protéine n'adoptant pas une structuration tertiaire ou quaternaire native (fonctionnelle) n'est pas très intéressante du point de vue de l'étude de l'immunoréactivité qui ne peut être que partielle, et finalement réduite à la structure primaire. A ce niveau, nous avons envisagé un réductionnisme des outils d'étude de l'immunoréactivité, en utilisant des peptides synthétiques naturels ou modifiés contenant une vingtaine de résidus ou même moins. La méthodologie de synthèse que nous avons réussi à mettre en oeuvre pour une protéine entière, a pu être utilisée très facilement pour des peptides de tailles relativement modestes.

L'étude de la reconnaissance des peptides de *nef*, sélectionnés selon des critères de choix d'épitopes séquentiels, par des sérums de sujets infectés nous a montré que, dans une technique de détection ELISA, des peptides naturels pouvaient constituer des antigènes plus performants que la protéine elle-même. Néanmoins, l'application diagnostique de ces résultats, qu'ils concernent l'utilisation de la protéine recombinante ou des peptides de synthèse, est rendue très difficile en raison de la faiblesse de la réponse immune recherchée.

Toujours en vue de mettre au point des réactifs d'aide au diagnostic nous avons démontré qu'il est possible d'améliorer l'antigénicité d'un petit peptide par introduction d'une contrainte conformationnelle (modèle *Plasmodium falciparum*) : l'introduction d'acides aminés α,α disubstitués, tels que l'acide α -amino isobutyrique, aux extrémités d'un peptide reproduisant un épitope conformationnel présent à la surface du stade hépatique de ce parasite, contribue à améliorer sa réactivité vis-à-vis de sérums humains d'infection.

Les peptides synthétiques sélectionnés selon des critères de choix des épitopes T faisant intervenir des notions conformationnelles, se sont révélés être d'excellents outils pour identifier (cartographier) les déterminants antigéniques T auxiliaires des protéines. L'analyse épitopique de la protéine *nef* a permis de montrer que parmi plusieurs épitopes majeurs, l'un est plus antigénique que les autres, sans nécessiter un quelconque couplage sur une protéine porteuse. De même nous avons révélé des épitopes majeurs d'une protéine appartenant aux antigènes excrétés/secrétés de *Toxoplasma gondii*, dont l'un est particulièrement antigénique.

Du point de vue de l'immunogénicité, nous avons mis en évidence plusieurs peptides actifs, parmi lesquels plusieurs possédaient une structure modifiée par rapport à la séquence naturelle. Néanmoins, la réponse déclenchée est restée spécifique de l'antigène natif.

En particulier, nous avons mis en évidence une immunogénicité vis-à-vis de la stimulation de cellules T auxiliaires au moyen d'un peptide de nef modifiés par introduction de groupes acétyle et amide aux extrémités N- et C-terminales, respectivement. Ce peptide s'est révélé plus actif que le peptide "naturel" (non modifié). Il est possible que le blocage des extrémités N- et C-terminales du peptide ait induit une résistance accrue au catabolisme et ainsi augmenté la demi-vie de la molécule dans l'organisme. L'absence de fonctions ionisables aux extrémités du peptide peut également avoir conduit à la stabilisation d'une structure hélicoïdale du peptide interagissant avec la structure du CMH et le récepteur T.

Par ailleurs, nous avons pu dégager une activité immunogénique polyvalente *in vivo*, vis-à-vis de la stimulation de cellules T cytotoxiques et de cellules B, spécifiques d'une région de la gp120, grâce à l'utilisation de peptides modifiés par l'introduction de motifs pseudolipidiques. Les peptides non modifiés sont totalement inactifs. En ce qui concerne la réponse cellulaire T cytotoxique, une telle activité n'apparaît en principe qu'après un transit intracellulaire et une présentation "réservée" à des protéines (endogènes) produites à l'intérieur d'une cellule, notamment au cours d'infections par des virus. Il apparaît donc que la modification par les motifs pseudolipidiques employés ait permis une prise en charge par les systèmes de présentation adéquats, selon un mécanisme qui reste à élucider.

Nos résultats montrent que la modification chimique de peptides peut permettre d'améliorer leur activité par rapport aux peptides "naturels" (non modifiés). Les modifications réalisées dans le cadre de ce travail visaient à

- renforcer le potentiel hélicoïdal et/ou la stabilité vis à vis du catabolisme afin d'améliorer l'antigénicité ou l'immunogénicité;
- introduire des substitutions capables d'orienter, par un mécanisme encore mal compris, le peptide vers une voie métabolique normalement interdite aux immunogènes d'origine exogène. Un tel résultat est particulièrement encourageant, puisque c'est le premier exemple, à notre connaissance, d'induction d'une réponse cytotoxique dirigée contre des cellules porteuses de VIH, générée par une construction synthétique.

En résumé, notre travail a permis de faire progresser nos connaissances de l'antigénicité et de l'immunogénicité des peptides de synthèse. Cette approche devrait déboucher à terme sur la mise au point de molécules vaccinales chimiquement déterminées, ou de méthodes de diagnostic plus spécifiques.

METHODES UTILISEES

METHODES UTILISEES	p 163
I - SYNTHESE PEPTIDIQUE*	p 163
A - PRINCIPE	p 163
B - CHOIX DES RESINES SUPPORT	p 164
C - GROUPEMENTS PROTECTEURS UTILISES	p 165
D - ACTIVATION ET COUPLAGE	p 166
E - DEPROTECTION DE L'HISTIDINE (DNP)	p 168
F - CLIVAGE DU PEPTIDE ET DES GROUPES PROTECTEURS SEMI-PERMANENTS	p 168
G - LAVAGE DU PEPTIDE SELON LA TECHNIQUE "TFA-ETHER"	p 169
H - CONTROLES	p 169
1 - Contrôles d'homogénéité	p 169
a - Chromatographie sur couche mince de silice	p 170
b - Chromatographie liquide haute pression (CLHP) en phase inverse analytique	p 171
2 - Contrôles d'identité	p 171
a - Analyse d'acides aminés	p 171
b - Spectrométrie de masse PDMS ("Plasma desorption mass spectrometry")	p 173
c - Microséquence peptidique	p 173
I - PURIFICATION	p 174
1 - Filtration sur gel (tamisage moléculaire)	p 175
2 - Chromatographie liquide haute pression (CLHP) en phase inverse préparative	p 176
3 - Chromatographie d'échange ionique	p 176
II - COUPLAGE D'UN PEPTIDE SYNTHETIQUE SUR UNE PROTEINE PORTEUSE*	p 176
A - COUPLAGE HOMOBIFONCTIONNEL	p 177
B - COUPLAGE HETEROBIFONCTIONNEL	p 177
III - DICHROISME CIRCULAIRE	p 178

IV - PREPARATION DE L'ACIDE BOC AMINO-2 HEXADECANOIQUE*	p 179
A - SYNTHÈSE DE L'ACIDE AMINO-2 HEXADECANOIQUE	p 179
B - SYNTHÈSE DE L'ACIDE N ^α -BOC AMINO-2 HEXADECANOIQUE	p 180
V - ÉTUDE DE LA RÉPONSE T CYTOTOXIQUE ANTI-LIPOPEPTIDE ⁺	p 181
VI - ÉTUDE DE LA RÉPONSE ANTICORPS ANTI-LIPOPEPTIDES*	p 182
VII - MILIEUX ET REACTIFS UTILISÉS POUR LA RESTIMULATION DES LYMPHOCYTES T [°]	p 183
VIII - RESTIMULATION DES LYMPHOCYTES T [°]	p 183
A - RATS LOU M	p 183
B - RATS FISCHER	p 183
C - CHIMPANZES	p 185
IX - SÉPARATION DES CELLULES T PORTEUSES DES MARQUEURS CD ₄ OU CD ₈ [°]	p 186
X - ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ AUXILIAIRE DES CELLULES T SPÉCIFIQUES D'UN PEPTIDE [°]	p 186
XI - CHOIX DES SÉRUMS À TESTER VIS-A-VIS DE NEF [°]	p 187
XII - CHOIX DES SÉRUMS À TESTER VIS-A-VIS DE VPR [°]	p 189
XIII - TEST RADIOIMMUNOLOGIQUES (RIA) EN PHASE SOLIDE [°]	p 189
XIV - ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE / URÉE- SDS* [°]	p 190
XV - TRANSFERT DE WESTERN * [°]	p 191
XVI - PROTÉINE NEF RECOMBINANTE	p 191
XVII - DÉTECTION DE LA PRÉSENCE D'ADN PROVIRAL DE VIH-1 [°]	p 192

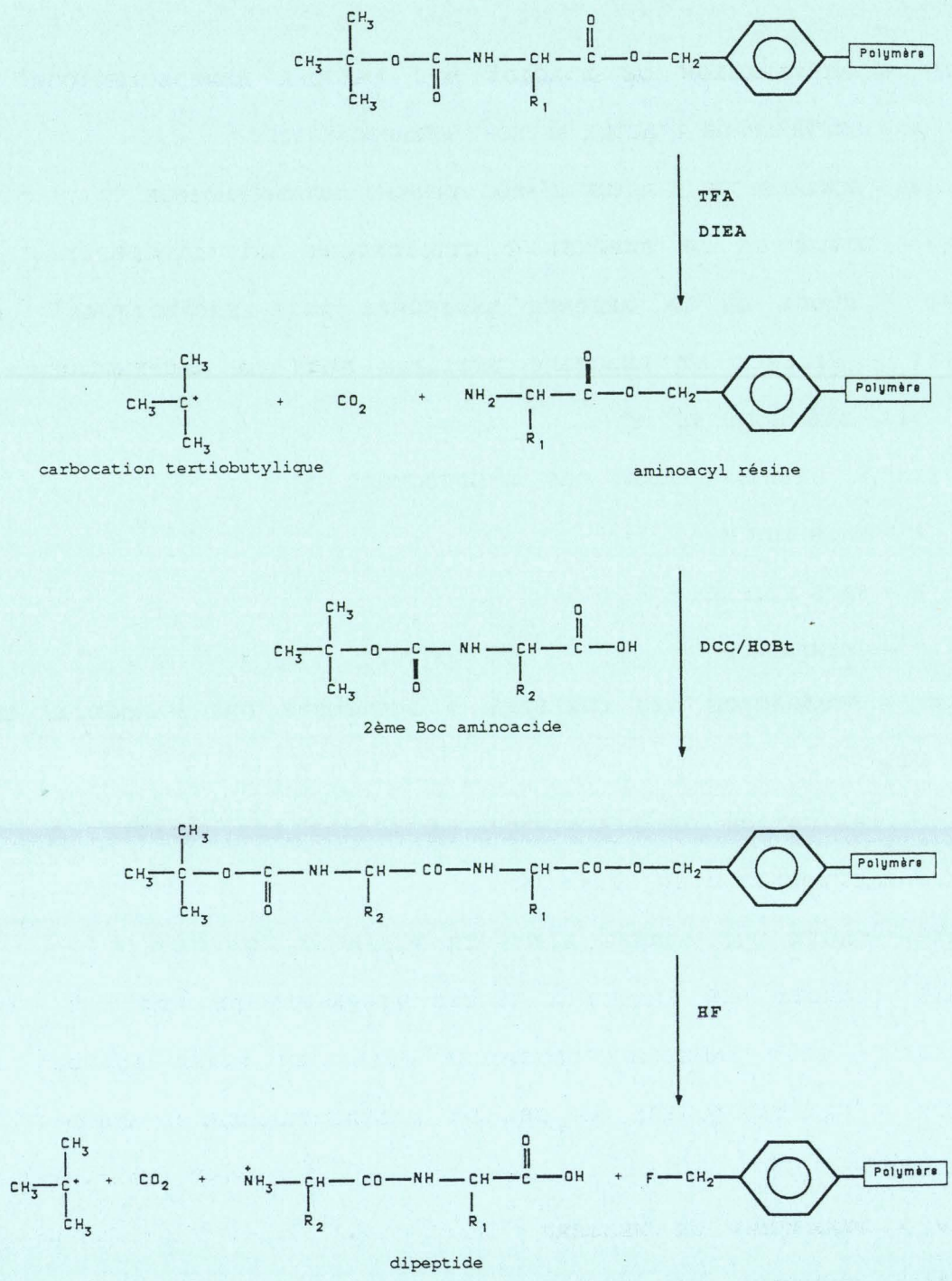


Figure 53 : Synthèse peptidique en phase solide.

* MANIPULATIONS PERSONNELLES

° MANIPULATIONS EFFECTUEES EN COLLABORATION AVEC L'EQUIPE DU
PROFESSEUR A. CAPRON A L'INSTITUT PASTEUR DE LILLE

+ MANIPULATIONS EFFECTUEES EN COLLABORATION AVEC L'EQUIPE DU
PROFESSEUR J.P. LEVY A L'HOPITAL COCHIN DE PARIS

I - SYNTHESE PEPTIDIQUE*

A - PRINCIPE

Nous avons synthétisé les différents peptides utilisés, en phase solide, selon la méthode développée par MERRIFIELD R.B. (MERRIFIELD R.B., 1963.).

Le principe de la synthèse en phase solide est le suivant (Figure 53) : l'acide aminé C-terminal, dont la fonction amine α est bloquée par un groupement protecteur (qui déterminera la chimie développée), est fixé par sa fonction carboxylique α sur un support solide. Après déprotection de la fonction α -aminée, le couplage du second acide aminé, lui-même protégé sur sa fonction amine α , est réalisé en présence d'un réactif de couplage. Entre chaque étape, les réactifs en excès et les produits secondaires de réaction sont éliminés par simples lavages et filtration sur verre fritté. La synthèse se fait donc de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. En fin de synthèse, le peptide est clivé de son support et déprotégé au niveau de son amine N-terminale et de ses chaînes latérales par action du fluorure d'hydrogène anhydre.

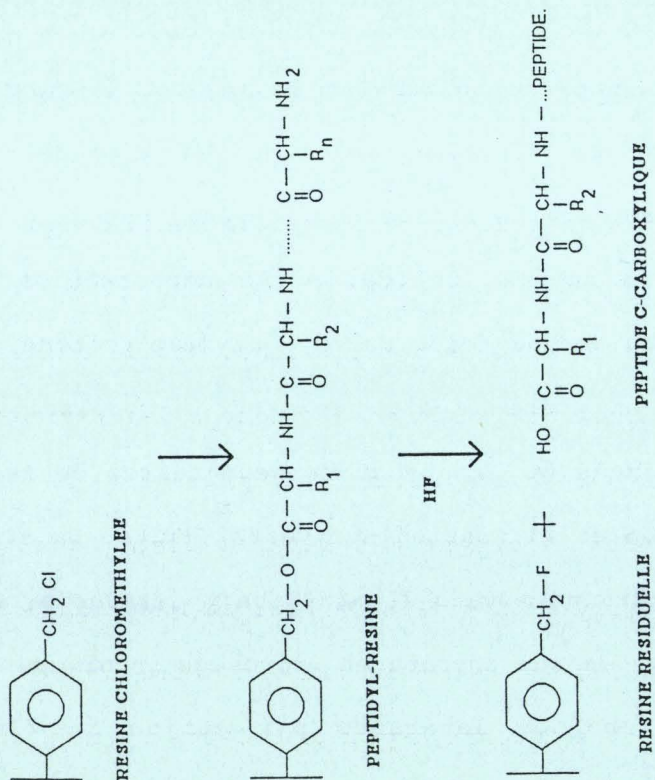
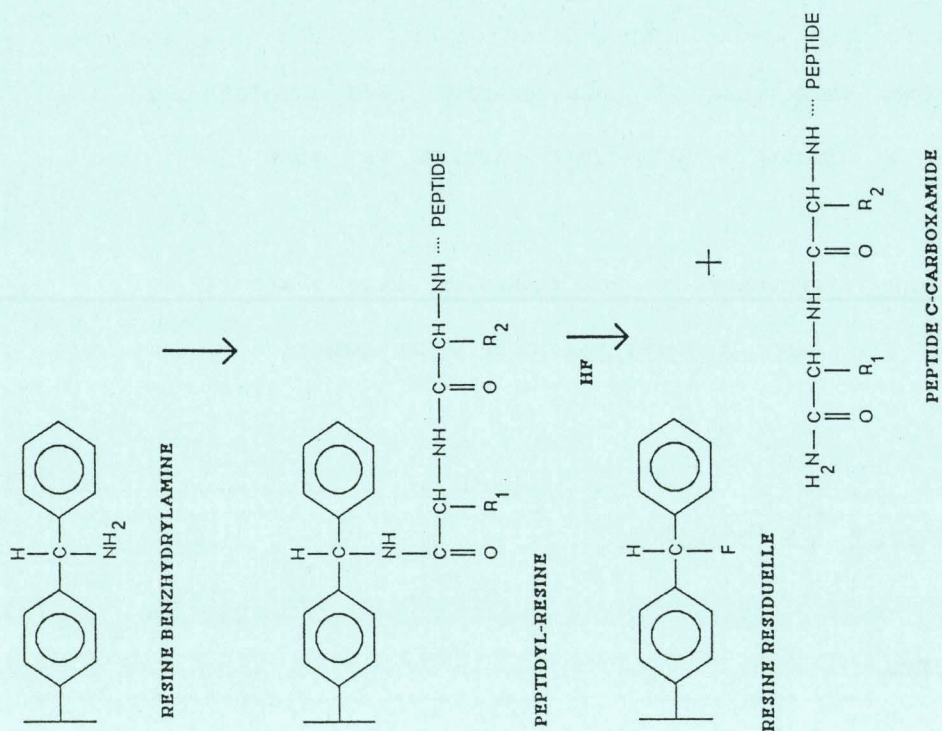
A**B**

Figure 54 : Résines fonctionnalisées (Supports de synthèse en phase solide)

- (A) Résine chlorométhylée.
- (B) Résine benzhydrylamine.

La synthèse se déroulant dans un seul réacteur, selon une chimie donnée et un protocole cyclique, nous avons donc réalisé la majorité des peptides sur un appareil semi-automatique conçu au laboratoire ou sur un appareil automatique (synthétiseur Applied Biosystems 430 A reprogrammé au laboratoire).

B - CHOIX DES RESINES SUPPORT

Les supports solides de synthèse peptidique sont des microbilles (20 à 70 micromètres de diamètre) d'une résine résultant de la copolymérisation de styrène et de 1% de divinylbenzène pour assurer la réticulation. Les résines fonctionnalisées ont une charge d'environ 0,5 millimole de groupement réactif (pouvant être le premier acide aminé) par gramme.

La fonctionnalisation des résines utilisées dépend de la nature de la fonction C-terminale désirée :

- **fonction carboxylique** : nous utilisons des résines fonctionnalisées par des groupements chlorométhylés (GISIN R.B., 1972.) pour la réalisation de peptides de moins de 20 résidus (Figure 54 A) ou phénylacétamidométhyle (PAM) pour les longues synthèses. Nous ne greffons pas le premier acide aminé sur ces résines (acide aminé C-terminal du peptide à synthétiser) mais nous achetons les résines sur lesquelles sont greffés les 20 acides aminés naturels.
- **fonction carboxamide** : nous utilisons des résines fonctionnalisées par des groupements benzhydrylamines (PIETTA P.G. et MARSHALL G.R., 1970.) (Figure 54 B). L'acide aminé C-terminal est ancré extemporanément par une liaison benzhydrylamide. Cette liaison est assurée selon le protocole classique de formation des liaisons amides utilisé pour le reste de la synthèse.

C - GROUPEMENTS PROTECTEURS UTILISES

Nous utilisons le groupe **tertiobutyloxycarbonyle (BOC)** (MAC KAY F.C. et FALBERTSON N., 1957.) pour protéger temporairement la fonction amine destinée à être utilisée ultérieurement pour la prolongation de la chaîne : fonction amine α (Figure 53). Cette protection est labile en milieu acide, et nous utilisons l'acide trifluoroacétique (TFA) à 50% dans le chlorure de méthylène pour la cliver. Après déprotection, la fonction α -aminée est neutralisée à l'aide d'une amine tertiaire, la diisopropyléthylèneamine (DIEA) afin d'obtenir une fonction N-terminale NH_2 réactive (et non plus NH_3^+).

Certaines chaînes latérales, potentiellement réactives dans les conditions de synthèse, sont protégées de façon semi-permanente pendant toute la synthèse, de manière à résister aux conditions acidolytiques de clivage du groupement BOC et à ne pas réagir pendant les étapes de couplage :

- alanine : non protégée
- cystéine : para-méthylbenzyle (4-MeBzl) ou acétamidométhyle (Acm)
- acide aspartique : ester benzylique (OBzl) ou ester de cyclohexyle (OcHex)
- acide glutamique : ester benzylique (OBzl) ou ester de cyclohexyle (OcHex)
- phénylalanine : non protégée
- glycine : non protégée
- histidine : 2,4-dinitrophényle (DNP) ou para-toluènesulfonyle (Tos)
- isoleucine : non protégée
- lysine : N^ϵ -2-chlorobenzoyloxycarbonyle (ClZ)
- leucine : non protégée

- méthionine : sulfoxyde (O) ou non protégée mais il est alors nécessaire d'utiliser un piège à carbocations (éthane dithiol 2%) lors des étapes de déprotection du BOC
- asparagine : non protégée
- proline : non protégée
- glutamine : non protégée
- arginine : N^ω-paratoluènesulfonyl (Tos)
- serine : éther benzylique (Bzl)
- thréonine : éther benzylique (Bzl)
- valine : non protégée
- tryptophane : formyle (For) ou non protégé mais il nécessite alors l'utilisation d'un piège à carbocations (éthane dithiol à 2%) lors des étapes de déprotection du BOC
- tyrosine : 2,6-dichlorobenzyle (2,6-ClBzl) ou 2-bromo benzyloxycarbonyl (2BrZ)

D - ACTIVATION ET COUPLAGE

A température ambiante, la réaction entre une amine aliphatique et un acide carboxylique aboutit à la formation d'un sel. Pour former une liaison amide (liaison peptidique), il serait nécessaire de faire réagir les deux partenaires à haute température, ce qui est incompatible avec la stabilité du peptide.

La liaison peptidique est donc établie en transformant le partenaire carboxylique en un dérivé plus actif (l'activation de l'amine n'est pratiquement jamais effectuée) en augmentant son électrophilie grâce à un groupe électroattracteur, afin de faciliter l'attaque par le doublet électronique de l'azote. L'espèce activée peut être formée "in situ" ou à

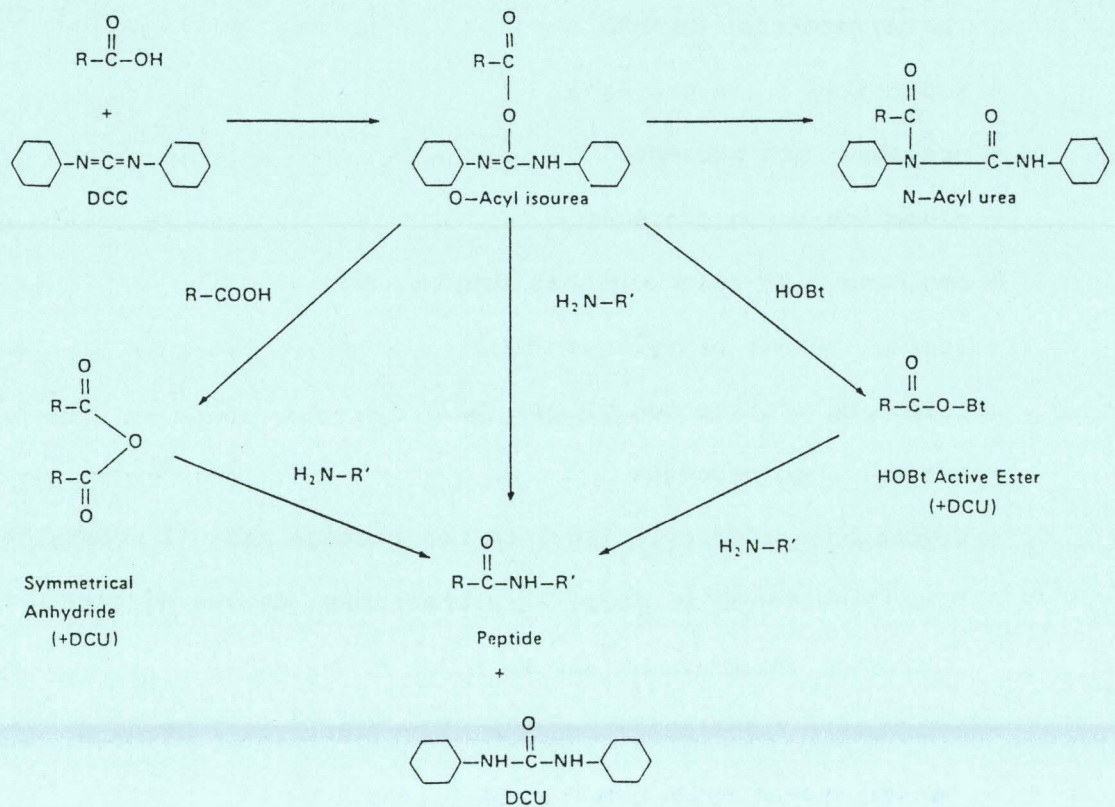


Figure 55 : Utilisation d'une carbodiimide (DCC = dicyclohexylcarbodiimide) lors du couplage des acides aminés, en tant qu'agent activateur de la fonction carboxylique en synthèse peptidique.

part. Pour cela, nous utilisons la dicyclohexylcarbodiimide (DCC), éventuellement en présence d'hydroxy-1 benzotriazole (HOBT) (KONIG W. et GEIGER R., 1970.).

L'activation résulte de l'addition du carboxyle sur la double liaison de la DCC pour former une O-acylisourée (Figure 55). Ensuite, on peut rencontrer différents cas de figure :

- une réaction "cul de sac" (réaction parasite) où on observe une attaque intramoléculaire du doublet de la fonction imide et donc la formation d'une N-acylurée non réactive (ARENDE A. et KOLODZIEJCZYK A.M., 1978.);
- l'attaque nucléophile directe par le doublet de l'amine sur l'O-acylisourée entre en compétition avec cette réaction parasite et conduit à la formation de la liaison peptidique désirée et de dicyclohexylurée (DCU) non réactive;
- en présence D'HOBT, on minimise la formation de N-acylurée en formant un ester activé d'HOBT, très réactif avec la fonction amine sur laquelle l'acide aminé activé doit être greffé, et de la DCU non réactive;
- en présence de 2 excès d'acide aminé par rapport à la DCC, il y a formation d'un anhydride symétrique de l'acide aminé à greffer et de DCU non réactive. L'anhydride symétrique est très réactif avec la fonction amine sur laquelle l'acide aminé doit être greffé. La formation de l'anhydride symétrique s'effectue en dehors du réacteur. C'est cette méthode très efficace que nous avons généralement utilisée pour fabriquer nos peptides sauf pour coupler l'asparagine, la glutamine, l'arginine et l'histidine(DNP) qui sont sujettes à des réactions secondaires dans ces conditions. Dans ce cas, nous avons effectué des couplages en DCC et HOBT.

E - DEPROTECTION DE L'HISTIDINE (DNP)

Le 2,4-dinitrophényle (DNP) est un groupe protecteur semi-permanent de l'histidine qui résiste à l'action des acides forts et, notamment, aux conditions de clivage acide que nous allons décrire par la suite. Nous le clivons alors que le peptide est encore ancré sur son support. Pour cela, nous opérons à l'aide de 15% de mercaptoéthanol et 2% de DIEA dans la diméthylformamide (DMF) pendant 2 fois 2 heures et 1 fois 12 heures.

F - CLIVAGE DU PEPTIDE ET DES GROUPES PROTECTEURS SEMI-PERMANENTS

En fin de synthèse, le peptide doit être simultanément libéré de son support et de ses groupements protecteurs semi-permanents. Cette étape s'effectue par action, pendant 1 heure à 0°C sous agitation, de l'acide fluorhydrique (HF) anhydre en présence de para-crésol, de para-thiocrésol (s'il y a une cystéine dans le peptide) et de diméthylsulfure (s'il y a une histidine, une méthionine, une tyrosine ou un tryptophane) (80:7,5:2,5:10), ces derniers servant de piège à carbocations ("scavengers"). Cette réaction est appelée "High HF". Après ce traitement, le peptide est précipité et lavé dans l'éther diéthylique froid, puis il est extrait dans une solution aqueuse, avant d'être lyophilisé.

Dans le cas des peptides contenant une méthionine-sulfoxyde ou un formyl-tryptophane, la réaction que nous venons de décrire ne permet pas le clivage de ces 2 protections. Il faut donc la précéder d'une réaction de clivage partiel permettant la déprotection de ces 2 acides aminés. Celle-ci s'effectue avec l'HF faiblement concentré dans le diméthylsulfure en présence de para-

crésol et de para-thiocrésol (25:65:7,5:2,5) pendant 2 heures à 0°C. Cette réaction est aussi appelée "Low HF" (TAM J.P. et col., 1983.).

L'acétamidométhyle, quand il est utilisé pour protéger la cystéine, n'est clivé par aucune des 2 réactions que nous venons d'envisager. Aussi, le peptide le contenant nécessitera un traitement, au moyen d'acétate mercurique, postérieur au clivage du peptide.

G - LAVAGE DU PEPTIDE SELON LA TECHNIQUE "TFA-ETHER"

Afin d'éliminer le plus gros des traces de pièges à carbocations (para-crésol, para-thiocrésol et diméthylsulfure) en contact avec le peptide, l'ensemble est dissout dans le TFA pur (10 à 20 ml pour 200 mg de poudre), puis le peptide est précipité de façon ménagée dans un grand volume d'éther diéthylique (500 ml pour 200 mg de poudre). Les pièges à carbocations sont solubles dans le TFA et dans dans l'éther. Après centrifugation, le culot est séché avant d'être repris une nouvelle fois dans le TFA pour que le peptide subisse une nouvelle précipitation. Après centrifugation, le culot est alors repris dans l'acide acétique pur et lyophilisé.

H - CONTROLES

1 - Contrôles d'homogénéité

Nous effectuons systématiquement des contrôles de pureté du produit synthétisé qui vont nous aider à mettre en place, par la suite, une stratégie de purification adéquate. Les contrôles d'identité ultérieurs ne peuvent être effectués que sur des produits homogènes.

a - Chromatographie sur couche mince de silice

Cette technique permet de caractériser et de contrôler les peptides synthétisés. Un peptide très hydrophile aura tendance à interagir fortement avec la silice (phase stationnaire : silice sur plaque d'aluminium MERCK Art 5553) et il faudra donc choisir un système de solvant (phase mobile) polaire pour qu'il migre. Il en va inversement pour un peptide très hydrophobe.

Après migration et séchage de la plaque, les fonctions amines libres du peptide sont visualisées en vaporisant une solution de ninhydrine (1 gramme de ninhydrine dans le mélange éthanol, acide acétique et collidine (25:5:1) et en chauffant 1 minute à 100°C). Ensuite après décoloration de la plaque par vaporisation d'hypochlorite de sodium à 8% dans l'eau, il est possible de visualiser les liaisons peptidiques en vaporisant de l'acide acétique à 20% dans l'eau, puis en séchant la plaque 1 minute à 100°C avant de vaporiser le réactif de REINDEL et HOPPE obtenu en mélangeant à volume égal les 2 solutions suivantes :

- 25 grammes de tétraméthyl-diaminodiphénylméthane dans 500 ml d'acide acétique à 20% dans l'eau;
- 5 grammes d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau.

Il est ainsi possible de visualiser les impuretés et de caractériser le peptide synthétisé. Le Rf (distance parcourue par le peptide / distance parcourue par le solvant) dans un système de solvant donné est caractéristique du peptide.

b - Chromatographie liquide haute pression (CLHP) en phase inverse analytique

Le peptide est injecté (5 microgrammes/5 microlitres de tampon A) sur une colonne Vydac C4 (ou μ Bondapack C18), 5 micromètres, 100 à 300 Angströms (7,5 x 100 mm) dans un système CLHP SHIMADZU. On applique alors un gradient croissant d'acétonitrile (tampon B), le tampon A étant composé de TFA 0,05% dans l'eau et le tampon B de TFA 0,042% et d'acétonitrile 75% dans l'eau. Le débit est de 0,2 ml/minute et le peptide est détecté à 215 nm. La pente du gradient doit être assez douce afin d'évaluer correctement l'état de pureté du peptide synthétisé.

2 - Contrôles d'identité

Après purification, nous effectuons des contrôles d'identité du peptide synthétisé homogène.

a - Analyse d'acides aminés

Grâce à cette technique, il est possible de connaître la composition en acides aminés du peptide synthétisé et de la comparer à la composition théorique.

Il est possible d'effectuer une hydrolyse acide du peptide encore fixé sur son support. Ceci constitue une méthode de contrôle très précieuse dans le cas des longues synthèses ou, dans celui des petites synthèses, si on a rencontré un problème, pour connaître la composition du peptide avant d'envisager son clivage. Le peptide sur résine est alors hydrolysé par le

mélange HCl 12N, acide propionique et phénol (5:5:1), sous vide, à 140°C pendant 2 heures dans un tube scellé prévu à cet effet.

Plus couramment, après hydrolyse acide totale du peptide par le mélange HCl 5,6N et phénol (10:1), sous vide, à 110°C pendant 24 heures (et 48 et 72 heures, si des enchaînements hydrophobes, difficiles à couper, sont présents dans la structure) et dans un tube scellé, les acides aminés libérés sont séparés et analysés, après coloration à la ninhydrine, sur un appareil BECKMAN system 7300.

Lors de l'interprétation de l'analyse, il convient de tenir compte des points suivants :

- la tyrosine subit une substitution par le chlore (Cl₂), et il est nécessaire de rajouter un peu de phénol afin d'éviter cette réaction en piégeant le chlore présent;
- la sérine et la thréonine subissent une élimination partielle, et on ne retrouve pas toute la fraction molaire à l'analyse;
- la cystéine ne peut être dosée telle quelle, mais après oxydation en cystine;
- le tryptophane est totalement détruit en milieu acide aqueux, et si on veut le quantifier, il faut effectuer une hydrolyse alcaline (mais alors les autres acides aminés ne sont plus analysables);
- l'asparagine est transformée en acide aspartique et la glutamine en acide glutamique lors de l'hydrolyse, leur distinction n'est donc pas possible.

b - Spectrométrie de masse PDMS ("Plasma desorption mass spectrometry")

Les masses moléculaires ont été déterminées à l'aide d'un spectromètre de masse PDMS BIO-ION 20. En moins de 15 minutes et avec moins de 10 microgrammes de peptide, il est possible de connaître la masse moléculaire du peptide synthétisé avec une précision de l'ordre de 0,01%. La masse mesurée est alors comparée à la masse théorique attendue. Cet appareil est parfaitement adapté à l'étude des peptides et des petites protéines puisqu'il permet de mesurer des masses moléculaires comprises entre 500 et 25000.

Un logiciel nommé DMPC ("Data Manager for Peptide Chemists"), conçu au laboratoire par GESQUIERE J.C., nous assiste dans ces contrôles. En fournissant la séquence du peptide à l'ordinateur, il est possible en quelques minutes de connaître la masse théorique du peptide et d'envisager des réactions secondaires, à partir des différences entre masse mesurée et masse théorique. Ce logiciel nous permet également, après avoir entré la composition en acide aminé mesurée, de savoir si un résidu n'est présent que partiellement et à quelle étape de la synthèse des difficultés ont pu se présenter.

c - Microséquence peptidique

Cette technique permet de connaître la séquence des acides aminés du peptide synthétisé, par dégradation récurrente d'EDMAN : le résidu N-terminal est couplé à un réactif spécifique puis clivé de la chaîne et analysé par CLHP, chaque résidu d'acide aminé transformé ayant un temps de rétention différent. Assez coûteuse, elle n'est réalisée que dans des cas bien spécifiques et elle constitue une des meilleures méthodes de contrôle. Nous avons utilisé un appareil fonctionnant en phase gazeuse : séquenceur de

protéine APPLIED BIOSYSTEMS couplé à un analyseur de PTH-acides aminés APPLIED BIOSYSTEMS 120 A.

I - PURIFICATION

La technique de synthèse en phase solide interdit toute purification en cours de synthèse et, malgré toutes les précautions prises pendant celle-ci, on ne peut éviter certaines réactions secondaires, ni des interruptions de chaînes. Les sous-produits éventuellement formés sont :

- des produits tronqués, issus d'un défaut d'élongation au niveau de la partie N-terminale. Ils sont essentiellement le fruit du "capping" systématique lorsque celui-ci est effectué (il s'agit de l'acétylation, après couplage, des fonctions amines qui n'ont pas réagi, pour éviter la création de produits délétés difficiles à purifier);
- des peptides délétés d'un ou plusieurs acides aminés à l'intérieur de la chaîne, issus de déprotections ou de couplages incomplets;
- des peptides branchés au niveau des fonctions latérales insuffisamment protégées;
- des peptides issus de réactions secondaires pouvant avoir lieu lors des déprotections ou du clivage HF;
- des peptides mal déprotégés.

En fonction de la nature du peptide synthétisé, des sous-produits envisagés et des résultats analytiques, différentes méthodes de purification pourront être utilisées. Les produits purifiés sont contrôlés selon les techniques que nous avons décrites plus haut. Quand il n'y a ni phénylalanine (absorbant à 254 nm) ni tryptophane (absorbant à 280 nm) dans le peptide à purifier, la détection des éluats de purification est effectuée à 235 nm, l'absorption à 215 nm étant trop forte (supérieure à 2 unités de densité

optique) à cause de la quantité de matériel ou de l'absorption des solvants utilisés.

1 - Filtration sur gel (tamisage moléculaire)

C'est une technique de séparation des molécules en fonction de leur masse moléculaire. Elle convient très bien pour séparer le peptide des pièges à carbocations ("scavengers") utilisés lors du clivage HF, ou des peptides tronqués ou délétés qui ont tous la caractéristique d'être plus petits que le peptide attendu. La séparation se faisant dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes, le peptide attendu sortira généralement le premier.

Le choix du gel est réalisé en fonction de la taille du peptide à purifier et de sa résistance au solvant qui sert à dissoudre le peptide (les peptides ne sont pas toujours solubles dans l'eau). Nous utilisons des gels de dextran Sephadex G (G10, G15, G25) (PHARMACIA) ou de polyacrylamide Biogel P (P2, P4, P6) (BIORAD) dont la porosité autorise la purification de molécules de masse moléculaire comprises entre 500 et 5000. Nous utilisons maintenant plus couramment le gel TSK HW 40S (MERCK) qui possède un domaine de fractionnement très large et permet de séparer des molécules dont la masse moléculaire est comprise entre 100 et 10000. Ce gel nous permet de travailler en acide acétique à 5% ou 50% dans l'eau et, plus rarement, en acide formique à 50% dans l'eau.

Si on utilise des gels très fins (moins de 400 mesh), une colonne assez longue et un débit adéquat, il est possible d'obtenir des produits dont la pureté est suffisante pour immuniser des animaux ou évaluer une réponse anticorps dans un test de type ELISA.

Toutefois, la filtration sur gel est souvent complétée par d'autres techniques plus résolutive que nous allons maintenant décrire.

2 - Chromatographie liquide haute pression (CLHP) en phase inverse préparative

Le principe est identique à celui de la CLHP en phase inverse analytique. Les colonnes sont toutefois de plus grande taille, le débit est plus important (2 ml/minute) et la pente du gradient d'acétonitrile est généralement plus faible. Le choix de la phase stationnaire est fonction de la polarité du peptide, évaluée en chromatographie couche mince ou en CLHP analytique : supports C18 pour des peptides très polaires et C8 ou C4 pour les moins polaires.

Cette technique est particulièrement performante pour séparer le peptide attendu de peptides mal déprotégés au niveau de leurs chaînes latérales, les groupements protecteurs étant très apolaires.

3 - Chromatographie d'échange ionique

Moins souvent utilisée, elle peut s'avérer très performante quand les 2 autres techniques de purification se sont révélées peu efficaces.

II - COUPLAGE D'UN PEPTIDE SYNTHETIQUE SUR UNE PROTEINE PORTEUSE*

Les peptides synthétiques sont couplés à l'albumine sérique bovine (ASB) soit par un agent homobifonctionnel, le glutaraldéhyde (MERCK) (si les peptides présentent des résidus de lysines ou leur extrémité N-terminale

libre), soit par un agent hétérobifonctionnel, la 6-maléimidocaproïque-N-hydroxysuccinimide (MCS) (FLUKA BIOKEMICA, BUCHS, SUISSE) (si les peptides présentent au moins un résidu de cystéine).

A - COUPLAGE HOMOBIFONCTIONNEL

Pour les couplages utilisant le glutaraldéhyde, l'ASB est dissoute (3 mg/ml) dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,2. 3 équivalents de peptide, par rapport à l'estimation des groupements NH₂ accessibles de la protéine (250 nanomoles par gramme), sont alors ajoutés au milieu et le pH est ajusté à 8 avec du carbonate de sodium. 9 équivalents (par rapport aux groupements NH₂ libres) de glutaraldéhyde à 2,5% dans l'eau sont alors ajoutés en 5 fois sur une période de 3 jours, sous agitation, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 1 jour d'agitation supplémentaire, le mélange est dialysé contre du tampon phosphate salin (PBS). La proportion peptide / protéine et la concentration protéique du milieu sont déterminées en comparant les analyses d'acides aminés après hydrolyse acide totale de l'échantillon et de la protéine porteuse prise isolément.

B - COUPLAGE HETEROBIFONCTIONNEL

Pour les couplages utilisant le MCS, l'ASB est dissoute (3 mg/ml) dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,2 contenant du DMF 25%. Séparément, 3 équivalents de MCS, par rapport à l'estimation des groupements NH₂ accessibles de la protéine (250 nanomoles par gramme), sont mélangés avec 9 équivalents de BOP (RICHELIEU BIOTECHNOLOGIES, St HYACINTHE, CQ CANADA) et 27 équivalents de DIEA (ALDRICH CHEMIE, STEINHEIM, ALLEMAGNE FEDERALE) dans 300 microlitres de DMF pendant 10 minutes à 0°C, sous agitation. Ensuite, ce mélange est ajouté à la solution d'ASB. Après 24 heures de réaction, à température ambiante, sous

agitation, le mélange réactionnel est dialysé contre du PBS. Le taux de groupements maléimido couplés par mg d'ASB est déterminé à l'aide de l'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB) (SEDLAK J. et LINDSAY R., 1968.). 3 équivalents de peptide réduit (30 minutes par 1,5 équivalents de tributyl phosphine), par rapport aux groupements maléimido mesurés, sont alors ajoutés à l'ASB activée. Le mélange réactionnel est agité 24 heures, à température ambiante, avant d'être dialysé contre du PBS. La proportion peptide / protéine et la concentration protéique du milieu sont déterminées en comparant les analyses d'acides aminés après hydrolyse acide totale de l'échantillon et de la protéine porteuse activée prise isolément.

III - DICHROISME CIRCULAIRE

Cette technique permet de mettre en évidence la présence d'une structure secondaire au sein d'un polymère en solution (peptide ou protéine).

Lorsqu'une onde électromagnétique linéairement polarisée traverse un milieu dans lequel se trouvent des groupements optiquement actifs, ses composantes circulairement polarisées gauche et droite ne sont pas absorbées de la même manière et il y a apparition d'un dichroïsme circulaire.

Les spectres de dichroïsme circulaire sont effectués à l'aide d'un appareil ROUSSEL JOUAN modèle II, à température ambiante. Les peptides analysés sont tous sous forme de contre-ion chlorhydrate (après purification), dissouts dans une solution de NaCl 200 mM dans une cellule de 0,01 cm de long. La concentration peptidique est déterminée par analyse d'acides aminés quantitative après hydrolyse acide totale et ajustée à 10^{-2} M pour l'analyse spectrométrique.

Les résultats de dichroïsme circulaire sont exprimés sous forme de courbes $(\theta) = f(\lambda)$, où (θ) correspond à l'ellipticité molaire moyenne du polymère étudié, exprimée en $\text{deg.décimole}^{-1}.\text{cm}^2$. Le taux d'hélicité est calculé à partir des données du spectre de dichroïsme circulaire en prenant $[\theta]_{222 \text{ nm}} = -35,700 \text{ deg.décimole}^{-1}.\text{cm}^2$ pour 100% d'hélicité.

IV - PREPARATION DE L'ACIDE BOC AMINO-2 HEXADÉCANOÏQUE*

A - SYNTHÈSE DE L'ACIDE AMINO-2 HEXADÉCANOÏQUE

L'acide amino-2 hexadécanoïque est obtenu par réaction de 10 grammes d'acide bromo-2 hexadécanoïque avec 100 ml d'ammoniaque à 28% dans l'eau (57 équivalents d'ammoniaque par rapport au dérivé bromé), sous pression dans un autoclave à 60°C. Après 15 heures, l'autoclave est vidé puis lavé à l'eau déminéralisée et à l'éthanol et le mélange réactionnel est filtré sur verre fritté. La différence de solubilité des produits dans l'éthanol a permis d'éliminer l'acide bromo-2 hexadécanoïque.

Après sa synthèse, l'acide amino-2 hexadécanoïque a été purifié par recristallisations successives dans l'acide acétique bouillant. Les cristaux blancs obtenus ont été lavés à l'acide acétique froid avant d'être séchés. Le produit cristallisé est l'acétate (au niveau de la fonction amine de l'acide aminé).

Le produit obtenu est caractérisé par son point de fusion (144°C, contre 56°C pour l'acide bromo-2 hexadécanoïque), par son comportement en chromatographie sur couche mince de silice ($R_f = 0,82$ dans le système de solvant A, contre 0,5 pour l'acide bromo-2 hexadécanoïque et $R_f = 0$ dans le système de solvant B contre 1 pour l'acide bromo-2 hexadécanoïque) et en

spectrométrie de masse PDMS (MM = 270 correspondant à la masse attendue). La chromatographie sur couche mince de silice est réalisée à l'aide de 2 systèmes de solvants : A) butanol, acétate d'éthyle, acide acétique et eau (1:1:1:1); B) chloroforme, méthanol, acide acétique (10:1:0,1); et révélée par vaporisation d'un système de révélation (20 grammes de sulfate d'ammonium, 3 ml d'acide sulfurique, QSP 100 ml d'eau déminéralisée) suivie du chauffage de la plaque à l'aide d'un épiradiateur.

B - SYNTHÈSE DE L'ACIDE N^α-BOC AMINO-2 HEXADÉCANOÏQUE

L'acide amino-2 hexadécanoïque est mis en solution en présence d'un détergent, l'hydroxyde de benzyltriméthylammonium (1,1 équivalents par rapport à l'acide aminé) (1,7 grammes) dans le méthanol (3 ml) puis le DMF (100 ml) sous agitation à température ambiante.

Après évaporation du DMF, l'acide amino-2 hexadécanoïque séché est remis en solution dans le mélange tertiobutanol, eau et bicarbonate de potassium 1N (4:4:1), puis en contact avec le pyrocarbonate de tertiobutyle (2,5 équivalent par rapport à l'acide aminé) pendant 12 heures à température ambiante. Pendant les premières heures de la réaction, le pH est maintenu constant entre 8 et 9 à l'aide de carbonate de sodium et son évolution est contrôlée par chromatographie sur couche mince de silice. La fonction amine est donc protégée par formation d'une liaison uréthane, et l'acide N^α-BOC amino-2 hexadécanoïque est ainsi obtenu. Ensuite, l'alcool est évaporé, le produit est repris dans 100 ml d'eau et le pH amené à 3 par adjonction d'HCl 1N. L'acide N^α-BOC amino-2 hexadécanoïque est extrait sélectivement dans l'acétate d'éthyle (2 fois 100 ml), solvant organique solubilisant parfaitement l'acide N^α-BOC aminé non ionisé (pH 3). Plusieurs lavages sont effectués à l'aide

d'eau déminéralisée afin d'éliminer les impuretés. La phase organique est alors séchée et évaporée.

Le produit obtenu est purifié par cristallisation à froid après solubilisation dans l'heptane à température ambiante. Les cristaux blancs récupérés sont lavés à l'hexane puis séchés.

Le produit est caractérisé par son point de fusion (85°C), par son comportement en chromatographie sur couche mince de silice ($R_f = 1$ dans le système de solvant A et 0 dans le système de solvant B) et en spectrométrie de masse PDMS (MM = 370,8 correspondant à la masse attendue, et MM = 270 correspondant à l'ion moléculaire fragmenté par clivage du groupement BOC).

V - ETUDE DE LA REPONSE T CYTOTOXIQUE ANTI-LIPOPEPTIDE⁺

Des souris Balb/c sont immunisées 2 fois à 3 semaines d'intervalle, par voie intrapéritonéale sans adjuvant, avec 5×10^{-8} mole de chacun des lipopetides dérivés des séquences 312-327 et 302-335 de gp120 HIV-1 LAV_{bru}. Des souris témoins reçoivent les peptides 312-327 et 302-336 seuls de gp120, ou une dose infectante de virus de la vaccine exprimant le gène env de VIH-1, ou alors ne sont pas immunisées.

2 semaines après la seconde injection, les rates des souris sont prélevées et les cellules spléniques spécifiques sont stimulées pendant plusieurs jours, *in vitro*, par des cellules syngéniques irradiées incubées avec le peptide 312-327 ou le peptide 302-336 de gp120. Les lymphocytes T cytotoxiques fonctionnels sont ensuite cocultivés pendant 4 heures avec des cellules syngéniques préalablement incubées avec du ⁵¹Cr (marqueur des protéines), lavées et sensibilisées, soit avec le peptide 312-327 de gp120 (3

micromoles par litre), soit par infection avec le virus de la vaccine exprimant le gène *env* de VIH-1. L'activité cytotoxique est évaluée en mesurant, après centrifugation, la quantité spécifique de ^{51}Cr relargué dans le milieu de culture exprimée en % : $100 \times (\text{relargage expérimental} - \text{relargage spontané}) / (\text{quantité totale de } ^{51}\text{Cr incorporé} - \text{relargage expérimental})$.

VI - ETUDE DE LA REPOSE ANTICORPS ANTI-LIPOPEPTIDE*

Des souris Balb/c (5 souris par condition) sont immunisées par 3×10^{-8} mole de chacun des 3 lipopeptides dérivés de la séquence 302-335 de *gp120* HIV-1 LAV_{bru}. Des souris témoins sont immunisées avec le peptide 302-336 de *gp120* ou ne sont pas immunisées. 4 conditions adjuvantes sont testées : adjuvant complet de Freund (incomplet pour les rappels), billes de silice gréffées en C18, squalène ou pas d'adjuvant. 2 voies d'injection ont été utilisées : sous-cutanée ou intrapéritonéale (sans adjuvant). Les souris sont immunisées à J₀ et rappelées (par $1,5 \times 10^{-8}$ mole de chaque lipopeptide) à J₁₃, J₂₃ et J₃₅. Elles sont saignées à J₀, J₁₃ et J₄₇.

Nous mesurons les réponses IgM et IgG selon une technique immunoenzymatique ELISA. Pour cela le peptide 302-336 de *gp120* HIV-1 LAV_{bru} est adsorbé dans les puits d'une plaque de microtitration (NUNC, Danemark), une nuit, à température ambiante dans un tampon carbonate (0,015M)-bicarbonate de sodium (0,035M) à pH 9,6. Les puits sont ensuite saturés à l'albumine sérique bovine (ASB) à 2% dans un tampon phosphate salin (PBS), 1 heure à température ambiante, puis, après 3 lavages en PBS additionné de Tween 20 à 0,1%, ils sont mis en contact, 2 heures à 37°C, avec les sérums de souris à tester dilués au centième. Après 3 lavages en PBS-Tween, 2 conjugués, anti-IgM et anti-IgG de souris marqués à la peroxydase (DIAGNOSTICS PASTEUR, MARNES-LA-COQUETTE, France), sont mis en contact, 2 heures à 37°C, avec les anticorps de

souris spécifiques du peptide adsorbé. La révélation est effectuée au moyen d'ortho-phénylène-diamine en présence de peroxyde d'hydrogène, après 3 lavages en PBS-Tween. La densité optique (DO) est ensuite mesurée à 496 nm au spectrophotomètre (DYNATECH).

Nous évaluons arbitrairement la réponse de la façon suivante : - = négatif (inférieur à 0,3 de DO), + = DO comprise entre 0,3 et 1, ++ = DO comprise entre 1 et 1,5, +++ = DO supérieure à 1,5.

VII - MILIEUX ET REACTIFS UTILISES POUR LA RESTIMULATION DES LYMPHOCYTES T^o

Pour toutes les cultures, du RPMI 1640 (GIBCO, COURBEVOIE, FRANCE) contenant de l'HEPES 20 mM (acide N-2 hydroxyéthylpipérazine-N-2 éthane sulfonique) (SIGMA, St LOUIS, MO), 100 U de pénicilline par ml et 100 microgrammes de streptomycine par ml (SPECIA, PARIS, FRANCE) est généralement additionné par de la L-glutamine 2 mM, du β -mercaptoéthanol 5×10^{-5} M (MERK, DARMSTADT, ALLEMAGNE FEDERALE), du pyruvate de sodium 1 mM (GIBCO) et du sérum de veau foetal inactivé 10% (GIBCO).

VIII - RESTIMULATION DES LYMPHOCYTES T^o

A - RATS LOU M

Les rats LOU M (exprimant l'haplotype RT-1^u) sont immunisés à la base de la queue avec une protéine recombinante (40 microgrammes) ou un peptide synthétique (100 microgrammes) émulsionné dans l'adjuvant complet de FREUND. 15 jours plus tard, les rats sont rappelés selon le même protocole mais l'immunogène étant cette fois émulsionné dans l'adjuvant incomplet de FREUND.

5 jours après la seconde injection, les ganglions lymphocytaires sont prélevés, et les cellules T purifiées par passage au travers d'une colonne de nylon. Un total de 5×10^5 cellules par puits est cultivé avec 10^6 CPA syngéniques irradiées de rate, en atmosphère de CO_2 à 37°C . 5 jours plus tard, pour mesurer la prolifération cellulaire T, 18,5 kiloBéquerels de désoxythymidine tritiée ($[^3\text{H}]\text{-dT}$) sont ajoutés dans chaque puits. 12 à 16 heures plus tard, le contenu de chaque puits est filtré sur filtre en fibre de verre et la radioactivité incorporée dans l'ADN des cellules T ayant proliféré est mesurée par comptage dans un liquide de scintillation.

B - RATS FISCHER

Des rats FISCHER sont infectés par voie intrapéritonéale à l'aide de 10^6 parasites (*Toxoplasma gondii*) provenant de cultures cellulaires et les ganglions inguinaux et mésentériques sont prélevés stérilement la semaine suivante puis à intervalles d'une semaine.

Des rats FISCHER sont également immunisés à la base de la queue avec une quantité d'antigènes excrétés et sécrétés (AES) équivalente à l'excrétion de 10^8 tachyzoïtes, émulsionnés avec de l'adjuvant complet de FREUND. Une seconde injection, sans adjuvant, est réalisée 2 semaines plus tard. Les cellules T sont prélevées 5 jours après la seconde injection.

Pour la préparation de cellules T spécifiques du peptide 170-193, des rats FISCHER sont immunisés à la base de la queue avec ce peptide (50 microgramme) couplé sur ASB, émulsionné dans l'adjuvant complet de FREUND lors de la première injection et dans l'adjuvant incomplet de FREUND lors de la seconde et de la troisième injection, à 1 semaine d'intervalle.

La préparation des lymphocytes T spécifiques de la protéine P24 recombinante est réalisée en injectant une construction du virus de la vaccine recombiné par la P24, selon 2 protocoles : 1) injection de 2 doses de 10^8 virus à la base de la queue; selon cette procédure, seuls les ganglions inguinaux et périaortiques ont été prélevés 2) injection de la même dose par voie intradermique; les ganglions inguinaux, périaortiques et la rate sont ensuite prélevés.

Les cellules T purifiées sont testées vis-à-vis de chaque peptide de la P24 selon le protocole que nous avons décrit.

C - CHIMPANZES

Les chimpanzés utilisés dans cette étude étaient des animaux sains : 2 femelles, CHEETAH (C) et JULIE (J), qui toutes 2 étaient âgées de 9 ans, et 2 mâles, MGBADOLITE (M) et BAKOUMBA (B), âgés respectivement de 6 et 8 ans. Ces animaux ont été élevés et immunisés au Centre International de Recherches Médicales de FRANCEVILLE au GABON.

C et M ont reçu la protéine nef recombinante en hydroxyde d'aluminium alors que J et B ont reçu un placebo composé d'adjuvant seul (hydroxyde d'aluminium). Les 4 chimpanzés ont reçu un total de 5 injections sur une période de 4 mois. Chaque immunisation de nef (100 microgrammes par ml) ou de placebo a été réalisée de façon intramusculaire (0,5 ml) dans la cuisse et de façon sous-cutanée (0,5 ml) dans le bras.

Les cellules T périphériques sont isolées par centrifugation en gradient de Ficoll-Hypaque. Un total de 10^5 cellules est cultivé comme les cellules de

rat. La mesure de la prolifération cellulaire T est effectuée de la même façon que la mesure opérée sur les cellules de rat.

IX - SEPARATION DES CELLULES T PORTEUSES DES MARQUEURS CD4 OU CD8°

Les cellules T purifiées sont traitées avec un anticorps de souris anti-W3/25 ou anti-OX8, à 4°C pendant 45 minutes. Pour cela, une solution d'anticorps de chèvre anti-souris en PBS est adsorbée au fond d'une boîte de pétri, pendant une nuit à 4°C. Les boîtes ainsi traitées sont alors lavées 3 fois en PBS puis incubées avec les anticorps de souris dans du RPMI 1640 contenant 5% de sérum de veau foetal, pendant 15 minutes à 25°C. Les cellules T (10^6 cellules par ml) en RPMI 1640 et sérum de veau foetal à 5% sont transférées dans les boîtes de pétri traitées et incubées 90 minutes à 4°C. Après cette incubation, les cellules T n'ayant pas adhéré sont éliminées délicatement et 2 lavages sont effectués.

X - EVALUATION DE L'ACTIVITE AUXILIAIRE DES CELLULES T SPECIFIQUES D'UN PEPTIDE°

L'activité auxiliaire des cellules T est déterminée par transfert de cellules T spécifiques du peptide 45-69 maintenues en culture *in vivo* à des rats, ou par immunisation de rats avec le même peptide, en vue d'évaluer leur pouvoir dans la production d'anticorps *in vivo*, après injection de 10 microgrammes de protéine *nef* recombinante.

1 jour avant l'injection de la protéine, 15×10^6 lymphocytes T spécifiques sont injectés par voie intra-veineuse dans chaque rat. Des rats

témoins subissent une injection de 15×10^6 lymphocytes T spécifiques du cytochrome C.

Les rats immunisés avec le peptide (100 microgrammes) en adjuvant complet de FREUND et rappelés avec la même quantité de peptide en adjuvant incomplet de FREUND, 2 semaines plus tard, subissent une injection avec la protéine, 10 jours après la seconde injection. Les sérums sont ensuite collectés afin d'analyser la réponse anticorps anti-nef.

Pour déterminer le rôle protecteur des lymphocytes T spécifiques du peptide 170-193 de la p24, 1 jour avant infection intrapéritonéale de 10^3 tachyzoïtes (de *Toxoplasma gondii*), 10^4 lymphocytes T spécifiques sont injectés par voie intra-veineuse dans chaque rat athymique. Des rats témoins subissent une injection de 10^4 lymphocytes spécifiques de l'ASB et d'autres sont simplement infectés par voie intrapéritonéale.

Pour déterminer le rôle auxiliaire de ces cellules, le même protocole est suivi, excepté que 10^6 lymphocytes spécifiques du peptide 170-193 (maintenus en culture pendant 4 semaines) sont injectés avant l'infection, et qu'ensuite les rats sont saignés toutes les semaines.

XI - CHOIX DES SERUMS A TESTER VIS-A-VIS DE NEF °

Les sujets du groupe A (n = 17) étaient des sujets séronégatifs à risque pour l'infection par VIH. Parmi eux on pouvait trouver des femmes homosexuelles (n = 7), des hommes hétérosexuels (n = 3) et des hommes homosexuels (n = 5) qui tous avaient en commun le fait d'avoir des contacts sexuels réguliers sans protection avec un partenaire séropositif vis-à-vis de VIH-1; une infirmière (n = 1) qui s'était piquée 3 mois auparavant avec une

aiguille ayant servi à prélever le sang d'un sujet séropositif vis-à-vis de VIH; et un enfant (n = 1) de 3 ans de parents séropositifs. Tous les sujets du groupe A étaient asymptomatiques, exceptée une femme qui avait un passé d'herpès buccal et génital et qui présentait des infections respiratoires et génitales répétées. Ces sujets étaient donc séronégatifs vis-à-vis des protéines structurales de VIH-1 dans 2 tests ELISA commerciaux (ELAVIA Ac-Ab-Ak DIAGNOSTICS PASTEUR et HIV-1 EIA RECOMBINANT ABBOTT), en transfert de Western (DU PONT DE NEMOURS et LAV-BLOT₁ DIAGNOSTICS PASTEUR), négatifs vis-à-vis de l'antigène viral p24/25 (gag) de VIH-1 (HIV ANTIGEN EIA, ABBOTT) et aussi séronégatifs vis-à-vis de VIH-2 (LAV-BLOT₂ DIAGNOSTICS PASTEUR).

Le groupe B était composé de 54 sujets servant de contrôle : donneurs de sang séronégatifs vis-à-vis de VIH-1 (ELISA et transfert de Western), sans risque connu d'être infectés PAR VIH.

Un sujet particulièrement intéressant, qui est passé de l'état séropositif vis-à-vis de VIH à un état séronégatif, a également été étudié. La séropositivité à VIH-1 avait d'abord été déterminée chez cette femme asymptomatique en juin 1987, et elle a persisté (anticorps anti-protéines structurales de VIH-1 dans 4 prélèvements successifs analysés en ELISA, transfert de Western et radioimmunoprécipitation) avant de se transformer en séronégativité complète en janvier 1988 jusqu'en avril 1988.

Finallement, une étude rétrospective a été effectuée sur les sérums d'hommes homosexuels (n = 12).

XII - CHOIX DES SERUMS A TESTER VIS-A-VIS DE VPR °

23 sujets infectés par VIH-1 et 40 sujets sains ont été retenus pour l'étude sérologique vis-à-vis de la protéine synthétique vpr. Les sujets séropositifs (présentant des anticorps contre les protéines structurales de VIH-1, *gag*, *pol* et *env*) ont été dépistés en ELISA (ELAVIA DIAGNOSTICS PASTEUR) et en transfert de Western (DU PONT DE NEMOURS). Ces sujets ont été rangés selon la classification du CDC (Center for Disease Control, Atlanta) : stade II (asymptomatiques) et stade IV (présentant un SIDA).

XIII - TEST RADIOIMMUNOLOGIQUE (RIA) EN PHASE SOLIDE °

Le peptide (2 microgrammes) ou la protéine (5 microgrammes) sont adsorbés au fond de tubes à ailettes (NUNC, DANEMARK), une nuit, à température ambiante dans un tampon carbonate (0,015M)-bicarbonate de sodium (0,035M) à pH 9,6. Les protéines utilisées sont : vpr synthétique et nef recombinante et p24 (HIV) recombinante purifiées à plus de 97%, correspondant aux séquences de l'isolat HIV-1 LAV_{bru} (TRANSGENE SA, STRASBOURG, FRANCE). Les tubes sont ensuite saturés avec de l'albumine sérique bovine (ASB) à 3% dans un tampon phosphate salin (PBS), 2 heures à température ambiante, puis, après 2 lavages en PBS, incubés une nuit avec des sérums humains dilués au cinquantième dans un mélange PBS-ASB 0,3%. Après 3 lavages en PBS, les anticorps humains liés sont détectés par incubation 1 nuit à température ambiante avec un anticorps polyclonal de lapin anti-Ig humaines spécifique d'1 isotype (IgM, IgA et IgE) (MIAB, SUEDE) ou un anticorps monoclonal de souris anti-Ig humaines spécifique d'1 isotype (IgG1 et IgG4) (SEWARD, ROYAUME UNI), marqués à ^{125}I (HUNTER W.M. et GREENWOOD F.C., 1962.) dans un mélange PBS-ASB 0,3%. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (LKB, Suède) à la suite de 3 lavages en PBS contenant du Tween 20 à 0,01%.

Au cours de chaque essai, différents sérums de sujets sains sont utilisés comme contrôles. Tous les sérums sont testés en double au cours de 2 essais différents au moins.

Après soustraction du bruit de fond (radioactivité sans sérums), un sérum est déterminé positif si le signal correspondant est supérieur à une limite définie par la moyenne de la radioactivité des contrôles négatifs, après soustraction du bruit de fond, plus 5 fois la déviation standard à cette moyenne (si plus de 30 sérums témoins négatifs sont utilisés comme contrôle) ou plus 5 fois l'écart type à cette moyenne (si moins de 30 sérums témoins négatifs sont utilisés comme contrôle).

XIV - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE / UREE- SDS*

La caractérisation électrophorétique de la protéine synthétique vpr est réalisée selon la technique de SWANK R.T. et MUNKRESS K.D. (SWANK R.T. et MUNKRESS K.D., 1971.) dans un gel de polyacrylamide à 12,5% préparé avec de l'acrylamide et du bis-acrylamide (10:1), de l'urée 8M et du SDS dans le tampon d'électrophorèse. La migration est effectuée à 130V pendant 10 heures.

Des témoins de masse moléculaire sont intégrés dans l'un des couloirs de migration : 17200, 14600, 8240, 6380, 2560 (PHARMACIA).

XV - TRANSFERT DE WESTERN* °

Après migration électrophorétique en gel urée-SDS, la protéine synthétique *vpr*, la protéine recombinante *nef* ou les antigènes totaux de *Toxoplasma gondii* sont électrotransférés sur une feuille de nitrocellulose.

Les bandelettes, obtenues après découpage de la nitrocellulose, sont saturées à l'aide de lait écrémé en poudre à 5% dans un tampon phosphate salin (PBS), pendant 1 heure à température ambiante. Les bandelettes sont ensuite incubées avec des sérums humains dilués au centième (pour étudier la réponse à *vpr* ou à *nef*) et des sérums de rats athymiques transférés (pour étudier la réponse à *Toxoplasma gondii*) dans le mélange PBS-lait 0,5%, 1 nuit à 4°C (les sérums humains testés vis-à-vis de la protéine *nef* recombinante ont été préalablement adsorbés sur un lysat d'*Escherichia coli*). Après 5 lavages à l'aide du mélange PBS-Tween 20 0,3%, un anticorps polyclonal anti-Ig humaines biotinylé (DU PONT) (ou un anticorps polyclonal anti-IgG de rat marqué directement à la peroxydase) est incubé dans le mélange PBS-lait 0,5%, 2 heures à 4°C. Après 5 lavages à l'aide du mélange PBS-Tween 20 0,3% les bandelettes sont mises en contact avec de l'avidine marquée à la peroxydase (DU PONT) dans le mélange PBS-lait 0,5% et révélées à l'aide du substrat enzymatique, 4-chloro-naphtol (KIRKEGAARD et PENNY LAB, INC.).

XVI - PROTEINE NEF RECOMBINANTE

La séquence codante complète de la protéine *nef* de l'isolat VIH-1 LAV_{bru} est exprimée dans *Escherichia coli* à l'aide d'un vecteur plasmidique (GUY B. et col., 1987.). La protéine *nef* recombinante est ensuite purifiée à plus de 97% (contôle CLHP) (TRANSGENE SA, STRASBOURG, FRANCE).

XVII - DETECTION DE LA PRESENCE D'ADN PROVIRAL DE VIH-

1°

L'amplification enzymatique de l'ADN de VIH (MULLIS K.B. et FALOONA F.A., 1987 et OU C.Y. et col., 1988.) est réalisée à l'aide d'amorces oligonucléotidiques correspondant à la partie 5' d'une région hautement conservée du gène gag de VIH-1. L'ADN de VIH-1 amplifié est détecté directement par hybridation de sondes oligonucléotidiques spécifiques.

L'ADN est préparé à partir de cellules mononucléaires isolées de 3 ml de sang dans un gradient de Ficoll. L'ADN (1 microgramme) est ensuite incubé avec les 2 amorces oligonucléotidiques et la polymérase Taq (NEW ENGLAND BIOLABS), et 25 cycles de polymérisation et dénaturation sont effectués comme cela a été décrit précédemment (LOCHE M. et MACH B., 1988.).

Les amorces oligonucléotidiques utilisées sont :

- amorce I, (5') GAAGGAGAGAGATGGGTGCG (position 325-344);
- amorce II, (3') GGGATGGTTGTAGCTGTCCC (position 518-537).

L'ADN amplifié est révélé par hybridation avec une sonde oligonucléotidique spécifique de la région amplifiée de gag :

- GGGAGCTAGAACGATTCGC (position 451-469).

FICHES ANALYTIQUES DES PEPTIDES

SYNTHETISES

FICHES ANALYTIQUES DES PEPTIDES SYNTHETISES

	p 193
<i>nef</i> (2-23)	p 194
<i>nef</i> (Nac 45-69 CONH ₂)	p 194
<i>nef</i> (45-59 CONH ₂)	p 195
<i>nef</i> (Nac 45-59 CONH ₂)	p 195
<i>nef</i> (50-64 CONH ₂)	p 196
<i>nef</i> (Nac 50-64 CONH ₂)	p 196
<i>nef</i> (55-69 CONH ₂)	p 197
<i>nef</i> (Nac 55-69 CONH ₂)	p 197
<i>nef</i> (50-59 CONH ₂)	p 198
<i>nef</i> (Nac 50-59 CONH ₂)	p 198
<i>nef</i> (79-94)	p 199
<i>nef</i> (98-112)	p 199
<i>nef</i> (148-161)	p 200
<i>nef</i> (176-206)	p 200
LSA (13-29)	p 201
LSA (Nac 13-29 CONH ₂)	p 201
LSA (Nac Aib-Ala-Aib 13-29 Aib-Aib CONH ₂)	p 202
P24 (64-79)	p 202
P24 (88-109)	p 203
P24 (170-193)	p 203
P24 (194-208)	p 204
P24 (231-250)	p 204
<i>gp120</i> (312-327) Préparation 1	p 205
<i>gp120</i> (312-327) Préparation 2	p 205
<i>gp120</i> (312-327) Préparation 3	p 206
<i>gp120</i> (302-335) Préparation 1'	p 206
<i>gp120</i> (302-335) Préparation 2'	p 207
<i>gp120</i> (302-335) Préparation 3'	p 207

Contrôle d'identité par analyse d'acides aminés :

Théor. = valeur théorique.

Calc. = valeur calculée.

MM = masse moléculaire

Théor. : valeur de la masse moléculaire théorique.

AcOH : valeur de la masse moléculaire sous forme de sel après purification dans un tampon contenant de l'acide acétique.

TFA : valeur de la masse moléculaire sous forme de sel après purification dans un tampon contenant de l'acide trifluoroacétique.

HCl : valeur de la masse moléculaire sous forme de sel après purification dans un tampon contenant de l'acide chlorhydrique.

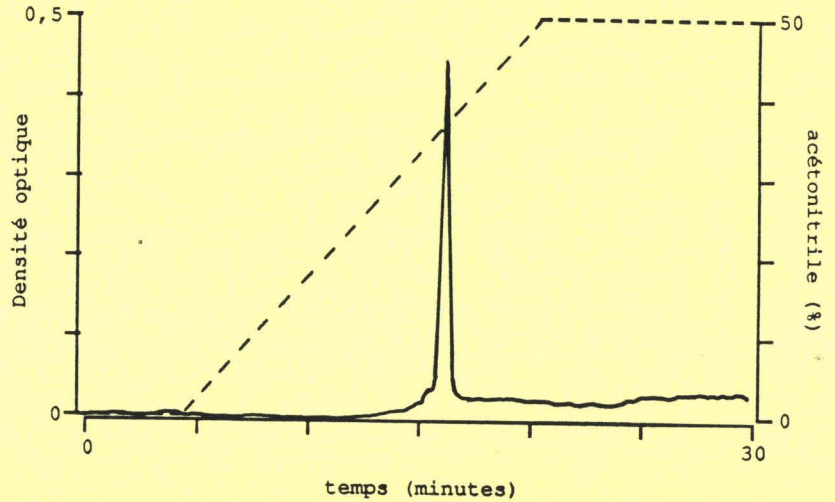
NH₃ : valeur de la masse moléculaire sous forme de sel après purification dans un tampon contenant de l'ammoniaque.

Le contrôle d'homogénéité des constructions peptidiques synthétisées a été réalisé en CLHP sur une colonne de type Nucléosil C₁₈, sauf pour les Préparations des peptides *gp120* 312-327 et 302-335 dont les contrôles d'homogénéité ont été réalisés sur une colonne de type Nucléosil C₄. L'élution a été effectuée par un gradient d'acétonitrile dans l'eau, indiqué en pointillés. Les deux solvants étaient acidifiés par 0,05 % de TFA.

nef (2-23)

Séquence : GGKWSKSSVV GWPTVRERMR RA

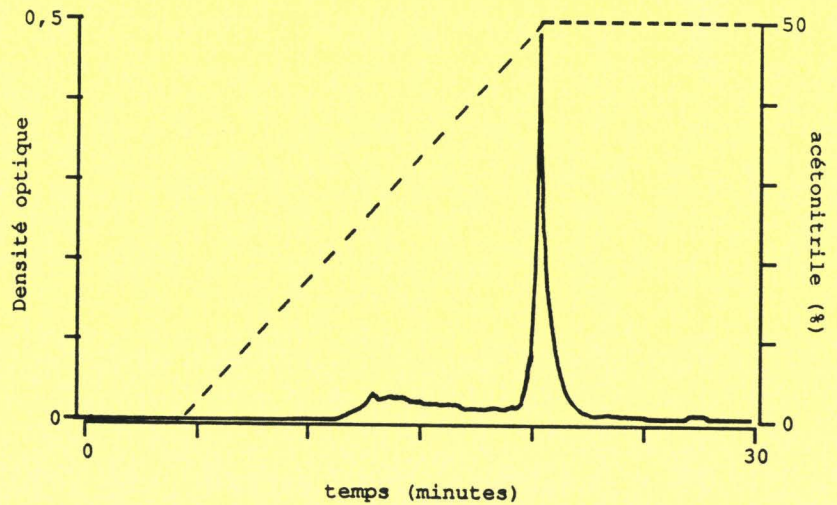
	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	0	0	MM (Théor.) 2586
Thr	1	0,90	MM (AcOH) 2951
Ser	3	2,75	
Glu	1	1,03	
Pro	1	1,20	
Gly	3	3,05	
Ala	1	0,96	
Cys	0	0	
Val	3	2,92	
Met	1	0,85	
Trp	2	ND	
Ile	0	0	
Leu	0	0	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	2	2,15	
Arg	4	3,83	



nef (NAc 45-69 CONH₂)

Séquence : SSNTAATNAA CAWLEAQEEE EVGFP

	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	2	1,97	MM (Théor.) 2665
Thr	2	1,83	MM (HCl) 2266
Ser	2	1,50	
Glu	6	5,89	
Pro	1	1,10	
Gly	1	1,04	
Ala	6	5,85	
Cys	1	ND	
Val	1	1,00	
Met	0	0	
Trp	1	ND	
Ile	0	0	
Leu	1	0,97	
Tyr	0	0	
Phe	1	0,99	
His	0	0	
Lys	0	0	
Arg	0	0	



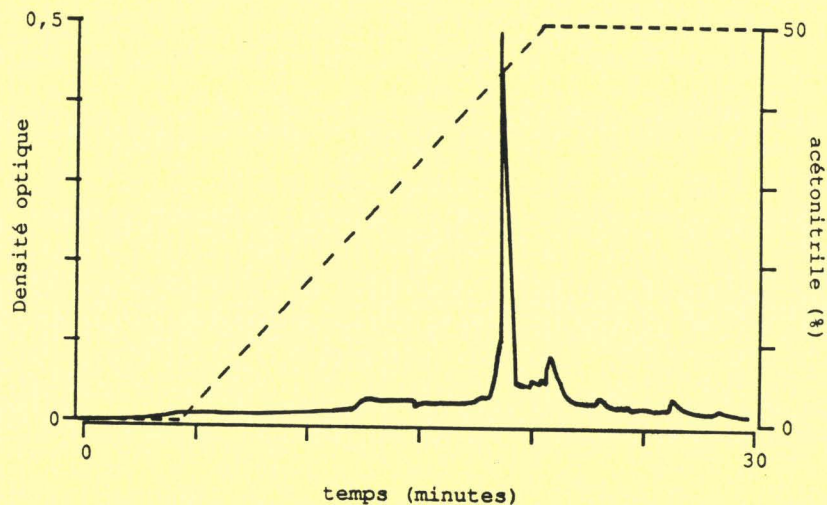
nef (45-59 CONH₂)

Séquence : SSNTAATNAA CAWLE

	Théor.	Calc.
Asp	2	2,04
Thr	2	1,91
Ser	2	1,77
Glu	1	1,09
Pro	0	0
Gly	0	0
Ala	5	4,81
Cys	1	ND
Val	0	0
Met	0	0
Trp	1	ND
Ile	0	0
Leu	1	1,06
Tyr	0	0
Phe	0	0
His	0	0
Lys	0	0
Arg	0	0

MM (Théor.) 1508

MM (AcOH) 1569



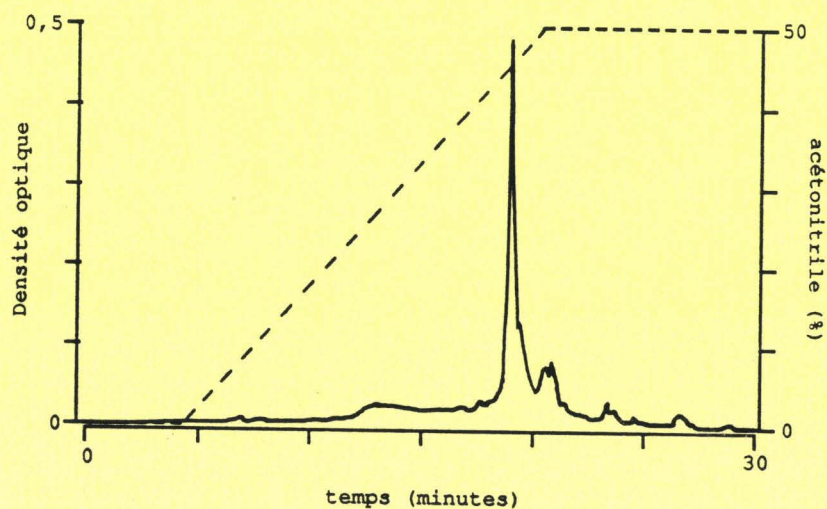
nef (Nac 45-59 CONH₂)

Séquence : SSNTAATNAA CAWLE

	Théor.	Calc.
Asp	2	1,96
Thr	2	1,99
Ser	2	1,79
Glu	1	1,05
Pro	0	0
Gly	0	0
Ala	5	5,02
Cys	1	ND
Val	0	0
Met	0	0
Trp	1	ND
Ile	0	0
Leu	1	0,97
Tyr	0	0
Phe	0	0
His	0	0
Lys	0	0
Arg	0	0

MM (Théor.) 1551

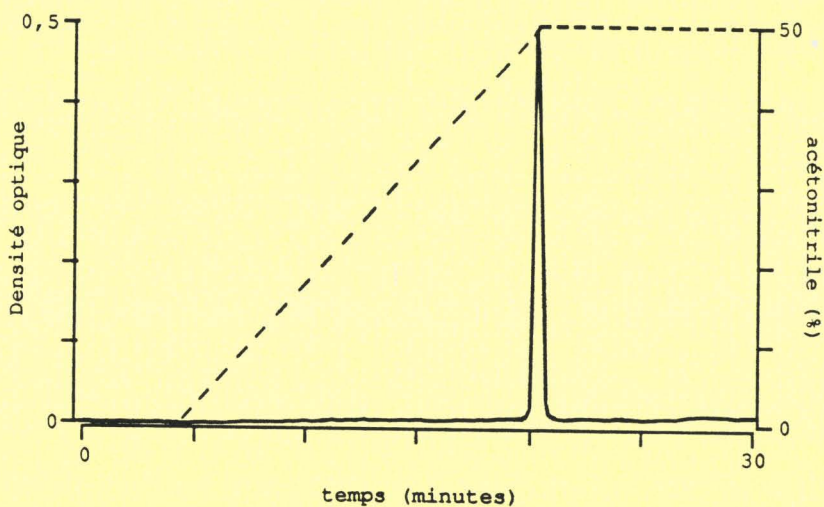
MM (AcOH) 1551



nef (50-64 CONH₂)

Séquence : ATNAACAWLE AQEEE

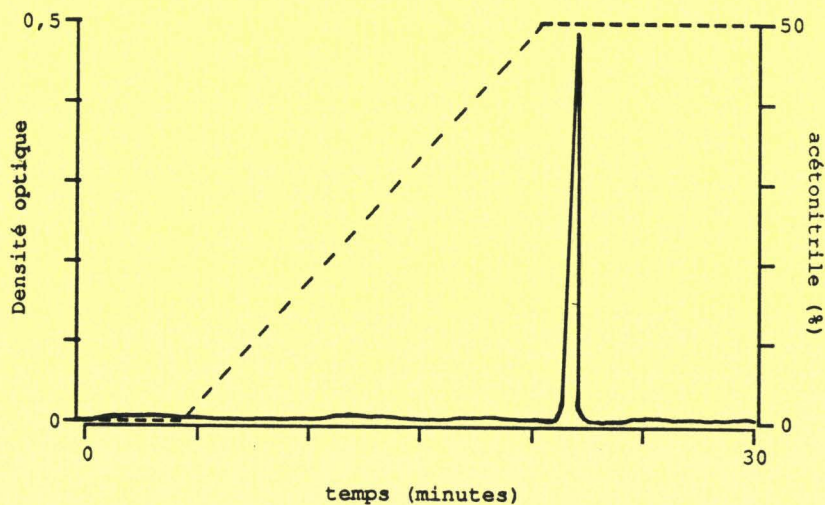
	Théor.	Calc.	MM (Théor.) 1634
Asp	1	0,99	MM (TFA) 1749
Thr	1	1,15	
Ser	0	0	
Glu	5	5,06	
Pro	0	0	
Gly	0	0	
Ala	5	5,12	
Cys	1	ND	
Val	0	0	
Met	0	0	
Trp	1	ND	
Ile	0	0	
Leu	1	0,84	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	0	0	
Arg	0	0	



nef (NAc 50-64 CONH₂)

Séquence : ATNAACAWLE AQEEE

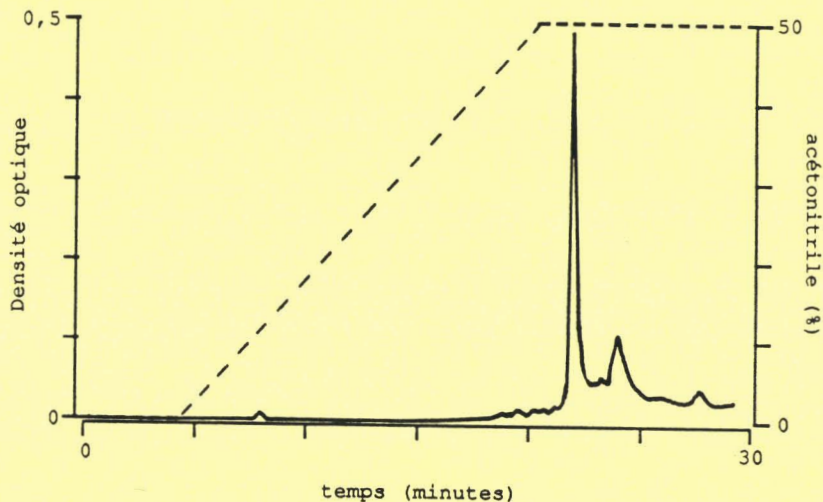
	Théor.	Calc.	MM (Théor.) 1676
Asp	1	0,95	MM (TFA) 1676
Thr	1	1,00	
Ser	0	0	
Glu	5	5,11	
Pro	0	0	
Gly	0	0	
Ala	5	5,09	
Cys	1	ND	
Val	0	0	
Met	0	0	
Trp	1	ND	
Ile	0	0	
Leu	1	0,86	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	0	0	
Arg	0	0	



nef (55-69 CONH₂)

Séquence : CAWLEAQEEE EVGFP

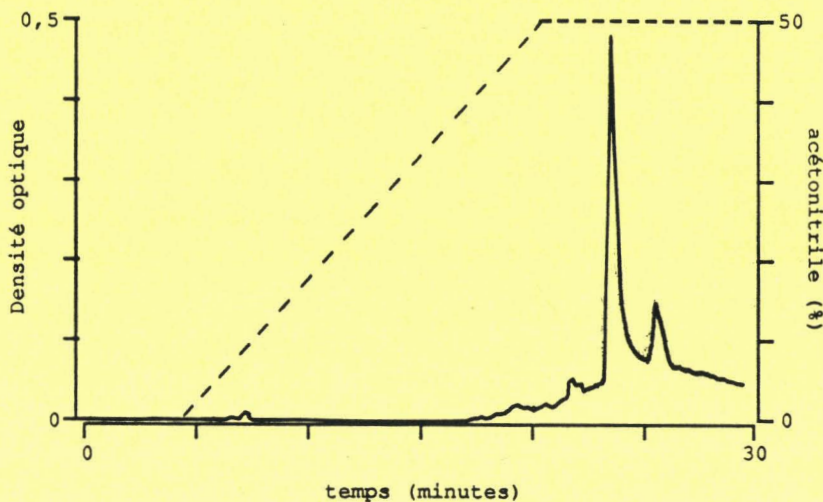
	Théor.	Calc.	MM (Théor.) 1735
Asp	0	0	MM (NH ₃) 1821
Thr	0	0	
Ser	0	0	
Glu	6	6,00	
Pro	1	1,20	
Gly	1	1,20	
Ala	2	2,10	
Cys	1	ND	
Val	1	0,99	
Met	0	0	
Trp	1	ND	
Ile	0	0	
Leu	1	0,94	
Tyr	0	0	
Phe	1	1,03	
His	0	0	
Lys	0	0	
Arg	0	0	



nef (NAc 55-69 CONH₂)

Séquence : CAWLEAQEEE EVGFP

	Théor.	Calc.	MM (Théor.) 1777
Asp	0	0	MM (NH ₃) 1863
Thr	0	0	
Ser	0	0	
Glu	6	5,64	
Pro	1	1,09	
Gly	1	1,01	
Ala	2	2,01	
Cys	1	ND	
Val	1	0,88	
Met	0	0	
Trp	1	ND	
Ile	0	0	
Leu	1	0,86	
Tyr	0	0	
Phe	1	1,20	
His	0	0	
Lys	0	0	
Arg	0	0	



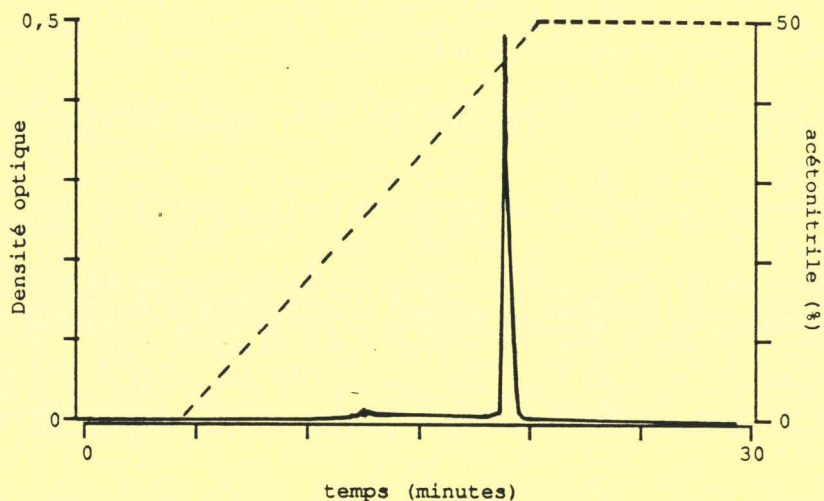
nef (50-59 CONH₂)

Séquence : ATNAACAWLE

	Théor.	Calc.
Asp	1	1,11
Thr	1	0,86
Ser	0	0
Glu	1	1,00
Pro	0	0
Gly	0	0
Ala	4	3,90
Cys	1	ND
Val	0	0
Met	0	0
Trp	1	ND
Ile	0	0
Leu	1	0,99
Tyr	0	0
Phe	0	0
His	0	0
Lys	0	0
Arg	0	0

MM (Théor.) 1047

MM (TFA) 1162



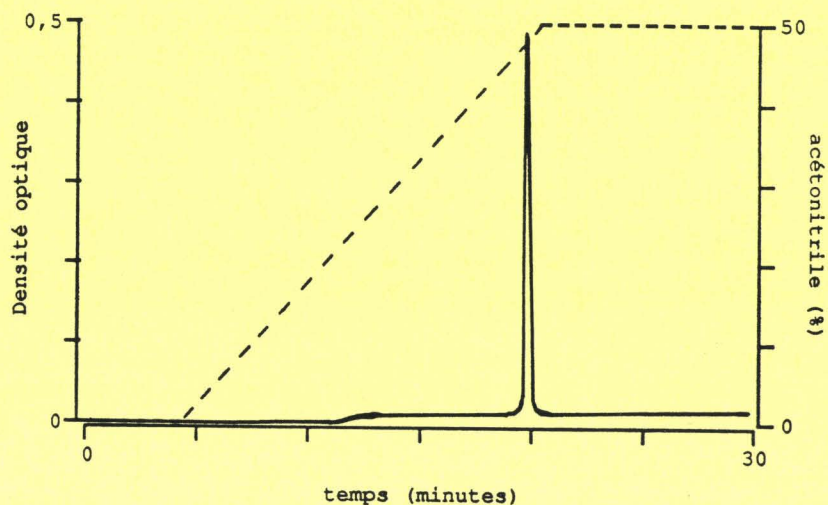
nef (NAc 50-59 CONH₂)

Séquence : ATNAACAWLE

	Théor.	Calc.
Asp	1	0,98
Thr	1	0,88
Ser	0	0
Glu	1	1,06
Pro	0	0
Gly	0	0
Ala	4	3,93
Cys	1	ND
Val	0	0
Met	0	0
Trp	1	ND
Ile	0	0
Leu	1	1,04
Tyr	0	0
Phe	0	0
His	0	0
Lys	0	0
Arg	0	0

MM (Théor.) 1089

MM (TFA) 1090

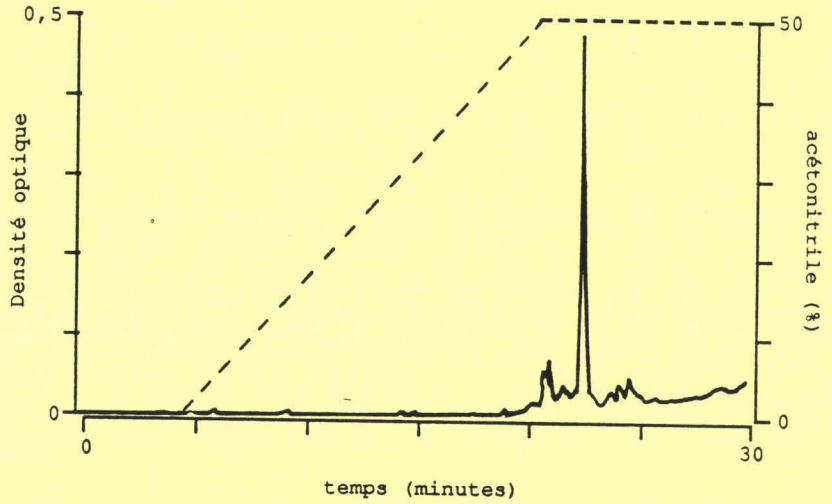




nef (79-94)

Séquence : CTYKAAVDLS HFLKEK

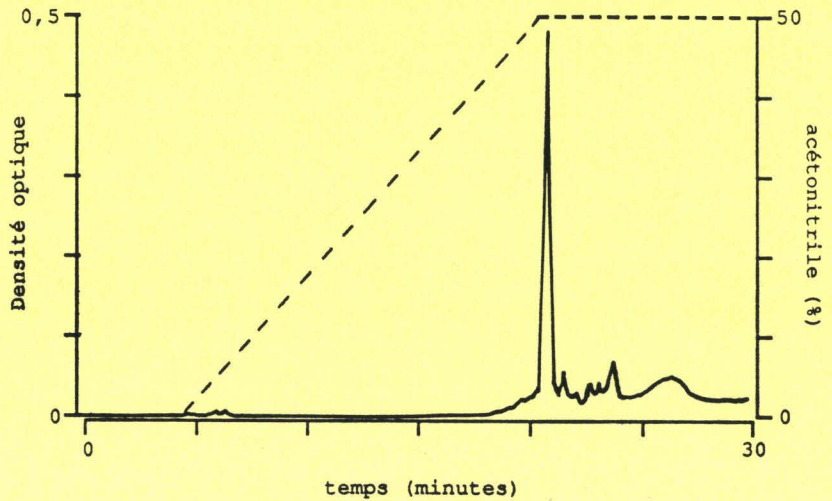
	Théor.	Calc.	MM (Théor.) 1852
Asp	1	0,99	MM (AcOH) 2153
Thr	1	0,95	
Ser	1	0,90	
Glu	1	1,13	
Pro	0	0	
Gly	0	0	
Ala	2	2,18	
Cys	1	ND	
Val	1	0,98	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	0	0	
Leu	2	2,01	
Tyr	1	0,83	
Phe	1	0,89	
His	1	0,96	
Lys	3	2,88	
Arg	0	0	



nef (98-112)

Séquence : EGLIHSQRRQ DILDL

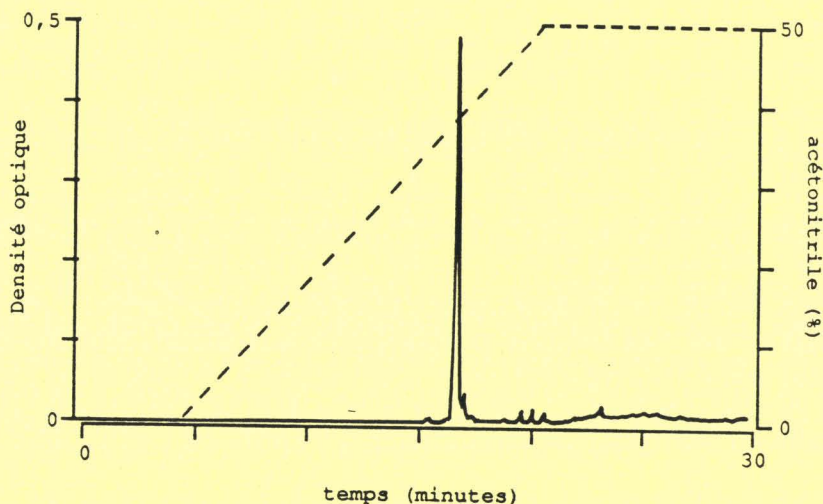
	Théor.	Calc.	MM (Théor.) 1792
Asp	2	2,30	MM (AcOH) 2033
Thr	0	0	
Ser	1	1,02	
Glu	3	3,15	
Pro	0	0	
Gly	1	1,15	
Ala	0	0	
Cys	0	ND	
Val	0	0	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	2	1,83	
Leu	3	2,96	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	1	0,83	
Lys	0	0	
Arg	2	1,93	



nef (148-161)

Séquence : VEPDKVEEAN KGEN

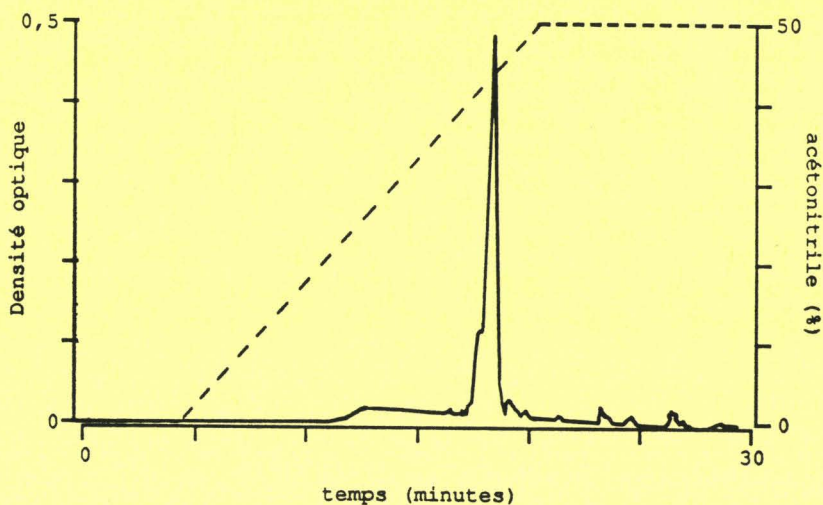
	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	MM (Théor.) 1557
Asp	3	3,00	MM (AcOH) 1738
Thr	0	0	
Ser	0	0	
Glu	4	4,04	
Pro	1	1,32	
Gly	1	1,06	
Ala	1	1,05	
Cys	0	ND	
Val	2	1,79	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	0	0	
Leu	0	0	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	2	1,85	
Arg	0	0	



nef (176-206)

Séquence : PEREVLEWRF DSRLAFHHVA RELHPEYFKN C

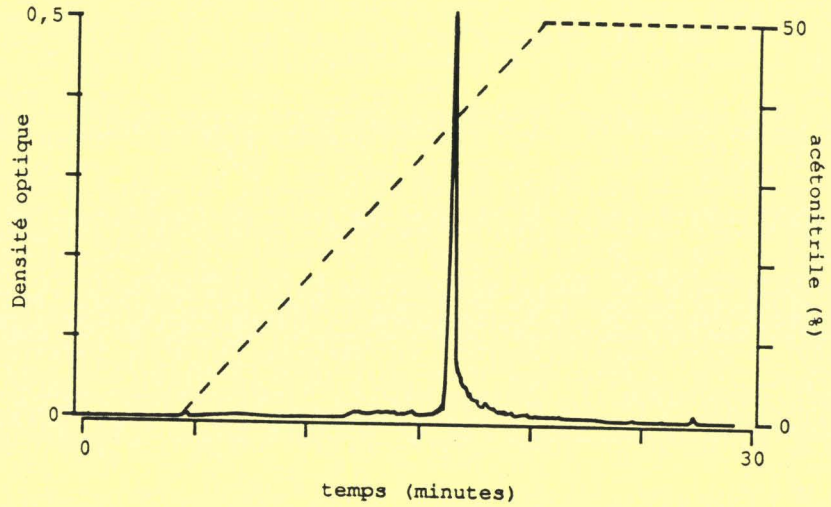
	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	MM (Théor.) 3910
Asp	2	2,34	MM (TFA) 4938
Thr	0	0	
Ser	1	0,69	
Glu	5	5,31	
Pro	2	2,22	
Gly	0	0	
Ala	2	2,25	
Cys	1	ND	
Val	2	1,82	
Met	0	0	
Trp	1	ND	
Ile	0	0	
Leu	3	2,69	
Tyr	1	1,25	
Phe	3	2,73	
His	3	2,86	
Lys	1	0,74	
Arg	4	3,74	



LSA (13-29)

Séquence : KEKLQEQQSD LEQERLA

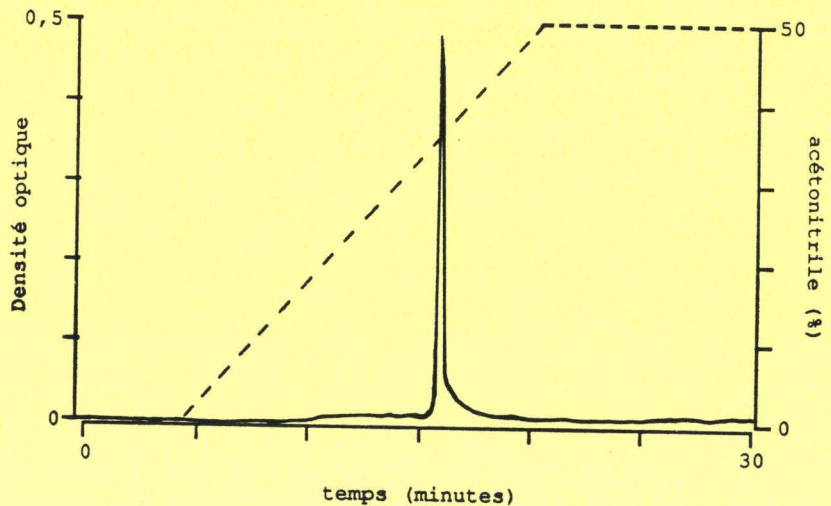
	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	1	0,99	MM (Théor.) 2071
Thr	0	0	MM (TFA) 2528
Ser	1	0,67	
Glu	8	8,16	
Pro	0	0	
Gly	0	0	
Ala	1	0,96	
Cys	0	ND	
Val	0	0	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	0	0	
Leu	3	2,99	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	2	1,95	
Arg	1	0,94	



LSA (NAc 13-29 CONH₂)

Séquence : KEKLQEQQSD LEQERLA

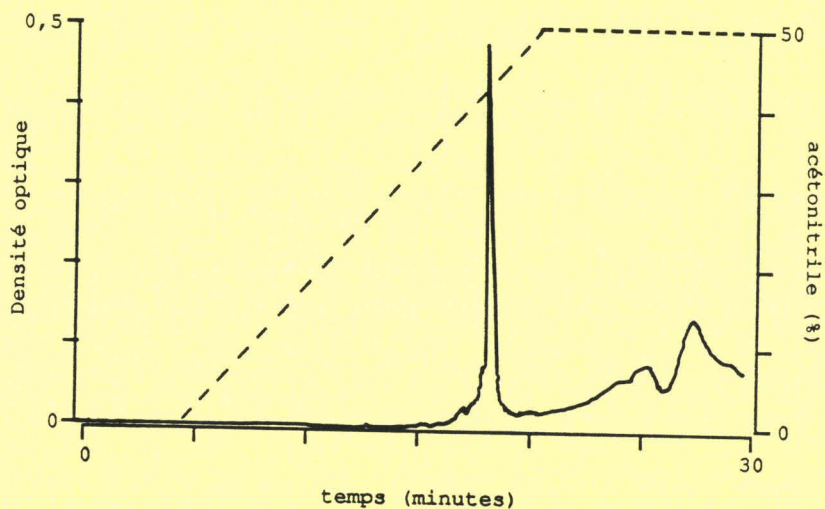
	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	1	0,96	MM (Théor.) 2112
Thr	0	0	MM (TFA) 2455
Ser	1	0,70	
Glu	8	8,05	
Pro	0	0	
Gly	0	0	
Ala	1	0,90	
Cys	0	ND	
Val	0	0	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	0	0	
Leu	3	2,85	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	2	2,06	
Arg	1	0,95	



LSA (Nac Aib-Ala-Aib 13-29 Aib-Aib CONH₂)

Séquence : (Aib)A(Aib)KEKLQEQ QSDLEQERLA (Aib)(Aib)

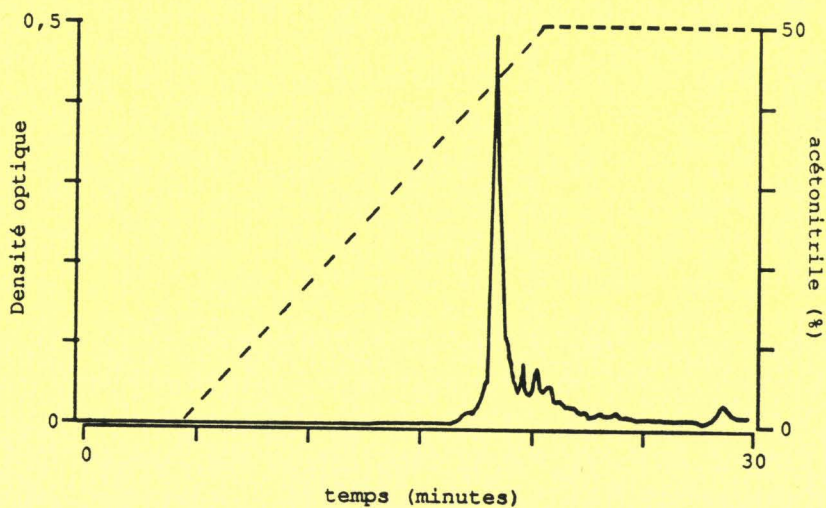
	Théor.	Calc.	MM (Théor.) 2483
Asp	1	1,04	MM (HCl) 2578
Thr	0	0	MM (Mesurée) 2483
Ser	1	0,72	
Glu	8	8,16	
Pro	0	0	
Gly	0	0	
Ala	2	1,90	
Cys	0	ND	
Val	0	0	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	0	0	
Leu	3	2,94	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	2	2,01	
Arg	1	0,95	



P24 (64-79)

Séquence : CSLKKSSKMV RVSAIV

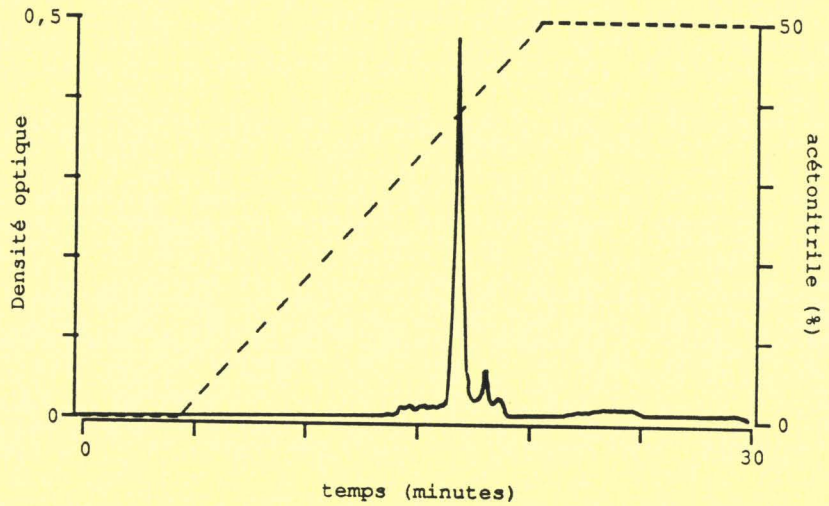
	Théor.	Calc.	MM (Théor.) 1735
Asp	0	0	MM (TFA) 2306
Thr	0	0	
Ser	4	3,42	
Glu	0	0	
Pro	0	0	
Gly	0	0	
Ala	1	1,08	
Cys	1	ND	
Val	3	3,02	
Met	1	0,99	
Trp	0	ND	
Ile	1	0,92	
Leu	1	0,80	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	3	3,12	
Arg	1	1,05	



P24 (88-109)

Séquence : CLSAGAYAAE GGDNQSSAVS DR

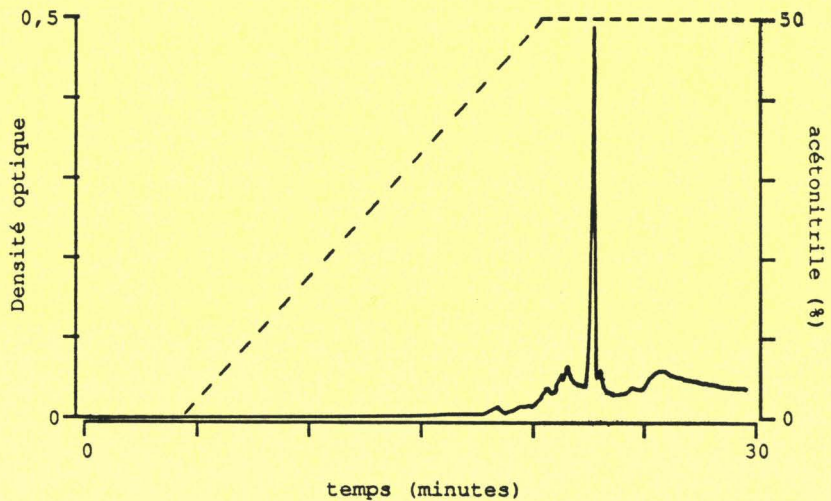
	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	3	3,08	MM (Théor.) 2128
Thr	0	0	MM (AcOH) 2249
Ser	4	3,50	
Glu	2	2,07	
Pro	0	0	
Gly	3	2,91	
Ala	5	4,86	
Cys	1	ND	
Val	1	1,17	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	0	0	
Leu	1	0,93	
Tyr	1	0,96	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	0	0	
Arg	1	1,19	



P24 (170-193)

Séquence : VEEVIDTMKS MQRDEDIFLR ALNK

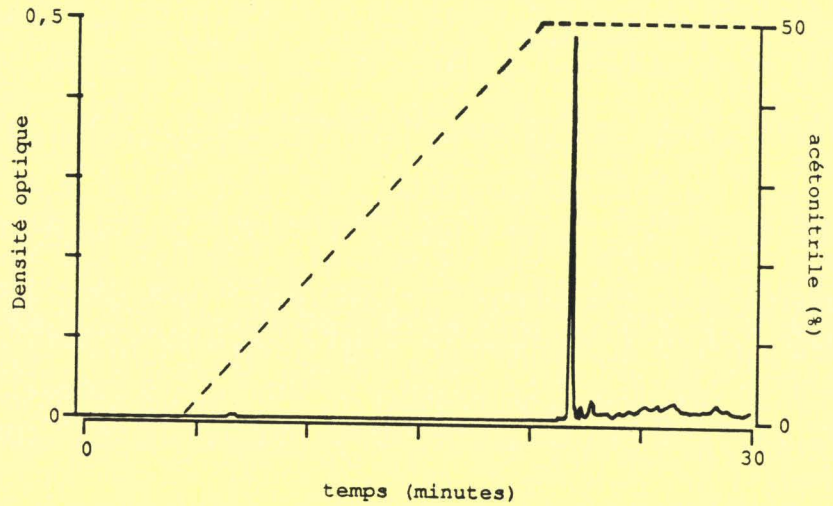
	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	4	4,11	MM (Théor.) 2879
Thr	1	0,87	MM (TFA) 3451
Ser	1	0,72	
Glu	4	4,00	
Pro	0	0	
Gly	0	0	
Ala	1	1,08	
Cys	0	ND	
Val	2	1,70	
Met	2	1,91	
Trp	0	ND	
Ile	2	1,80	
Leu	2	2,17	
Tyr	0	0	
Phe	1	1,05	
His	0	0	
Lys	2	2,01	
Arg	2	2,07	



P24 (194-208)

Séquence : GETVEEAIED VAQAE

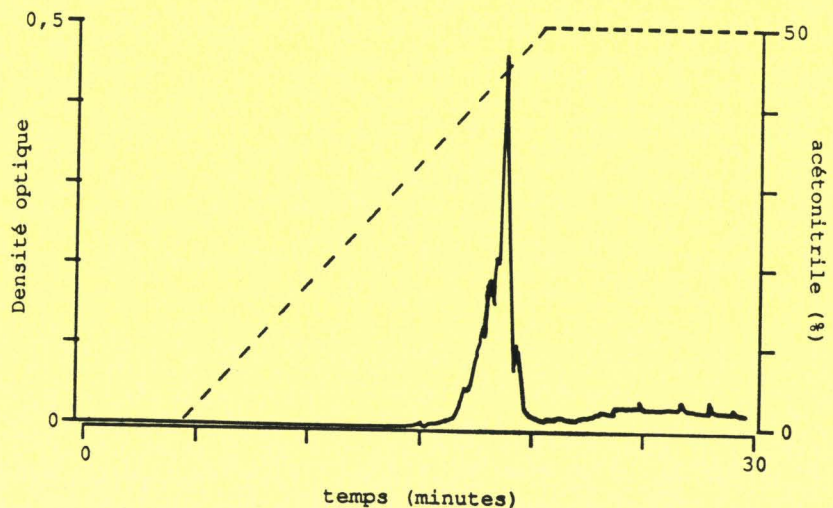
	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	1	1,01	MM (Théor.) 1589
Thr	1	0,80	MM (AcOH) 1650
Ser	0	0	
Glu	6	6,01	
Pro	0	0	
Gly	1	0,84	
Ala	3	3,10	
Cys	0	ND	
Val	2	2,05	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	1	0,99	
Leu	0	0	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	0	0	
Arg	0	0	



P24 (231-250)

Séquence : DEMKVIDDVQ QLEKDKQQLK

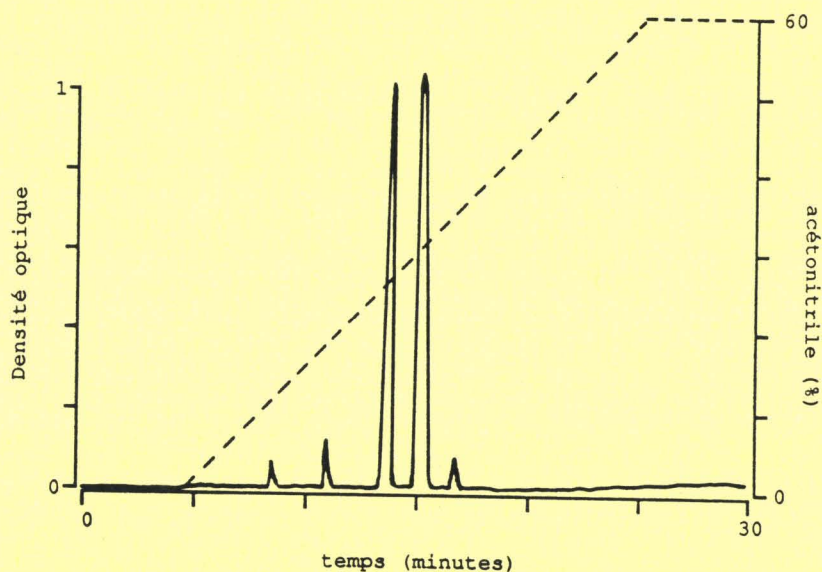
	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	4	4,08	MM (Théor.) 2429
Thr	0	0	MM (AcOH) 2731
Ser	0	0	
Glu	6	6,28	
Pro	0	0	
Gly	0	0	
Ala	0	0	
Cys	0	ND	
Val	2	1,78	
Met	1	0,65	
Trp	0	ND	
Ile	1	0,66	
Leu	2	2,22	
Tyr	0	0	
Phe	0	0	
His	0	0	
Lys	4	3,99	
Arg	0	0	



gp120 (312-327) Préparation 1

Séquence : IRIQRGPGRA FVTIGK(acide amino-2 hexadécanoïque)

	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	0	0	MM (Théor.) 2020
Thr	1	0,97	MM (TFA) 2551
Ser	0	0	MM (Mesurée) 2024
Glu	1	1,05	
Pro	1	1,06	
Gly	3	3,26	
Ala	1	1,09	
Cys	0	ND	
Val	1	1,00	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	3	2,57	
Leu	0	0	
Tyr	0	0	
Phe	1	0,96	
His	0	0	
Lys	1	1,09	
Arg	3	2,91	



gp120 (312-327) Préparation 2

Séquence : (acide amino-2 hexadécanoïque)IRIQRGPGR AFVTIGK(acide amino-2 hexadécanoïque)

	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	0	0	MM (Théor.) 2314
Thr	1	0,95	MM (TFA) 2885
Ser	0	0	
Glu	1	1,08	
Pro	1	1,06	
Gly	3	3,27	
Ala	1	1,11	
Cys	0	ND	
Val	1	1,00	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	3	2,64	
Leu	0	0	
Tyr	0	0	
Phe	1	0,93	
His	0	0	
Lys	1	1,11	
Arg	3	2,99	

gp120 (312-327) Préparation 3

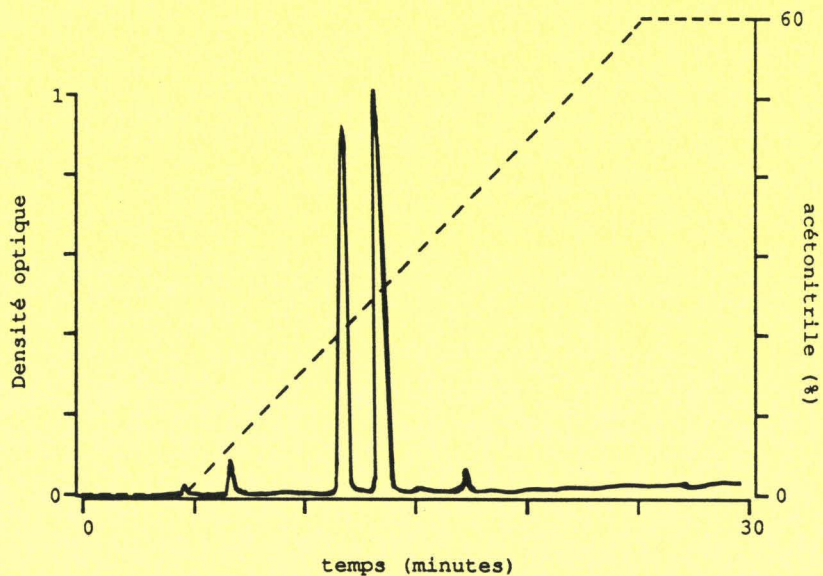
Séquence : (dipalmitoyl-lysine)IRIQRGPR AFVTIGK(acide amino-2 hexadécanoïque)

	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	0	0	MM (Théor.) 2624
Thr	1	0,93	MM (TFA) 3195
Ser	0	0	
Glu	1	1,00	
Pro	1	1,02	
Gly	3	3,14	
Ala	1	1,04	
Cys	0	ND	
Val	1	0,97	
Met	0	0	
Trp	0	ND	
Ile	3	2,64	
Leu	0	0	
Tyr	0	0	
Phe	1	0,94	
His	0	0	
Lys	2	1,88	
Arg	3	2,77	

gp120 (302-335) Préparation 1'

Séquence : TRPNNTRKS IRQRGPR FVTIGKIGNM RQAH(acide amino-2 hexadécanoïque)

	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	4	4,02	MM (Théor.) 4097
Thr	3	2,69	MM (TFA) 5239
Ser	1	0,98	MM (Mesurée) 4100
Glu	2	2,39	
Pro	2	2,08	
Gly	4	4,21	
Ala	2	2,22	
Cys	0	ND	
Val	1	1,09	
Met	1	0,86	
Trp	0	ND	
Ile	4	3,92	
Leu	0	0	
Tyr	0	0	
Phe	1	1,06	
His	1	0,85	
Lys	2	2,17	
Arg	6	6,00	



gp120 (302-335) Préparation 2'

Séquence : (acide amino-2 hexadécanoïque)TRPNNNTRK SIRIQRGPGR AFVTIGKIGN
MRQAH(acide amino-2 hexadécanoïque)

	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	4	3,76	MM (Théor.) 4391
Thr	3	2,66	MM (TFA) 5533
Ser	1	0,99	
Glu	2	2,28	
Pro	2	1,98	
Gly	4	4,28	
Ala	2	2,31	
Cys	0	ND	
Val	1	1,13	
Met	1	1,01	
Trp	0	ND	
Ile	4	3,61	
Leu	0	0	
Tyr	0	0	
Phe	1	1,02	
His	1	0,96	
Lys	2	2,17	
Arg	6	5,70	

gp120 (302-335) Préparation 3'

Séquence : (dipalmitoyl-lysine)TRPNNNTRK SIRIQRGPGR AFVTIGKIGN MRQAH(acide
amino-2 hexadécanoïque)

	<u>Théor.</u>	<u>Calc.</u>	
Asp	4	3,98	MM (Théor.) 4701
Thr	3	2,77	MM (TFA) 5843
Ser	1	0,98	
Glu	2	2,21	
Pro	2	2,06	
Gly	4	4,29	
Ala	2	2,42	
Cys	0	ND	
Val	1	1,13	
Met	1	0,88	
Trp	0	ND	
Ile	4	3,79	
Leu	0	0	
Tyr	0	0	
Phe	1	1,05	
His	1	1,00	
Lys	3	2,97	
Arg	6	5,99	

BILIOGRAPHIE

AALBERSE R.C., VAN DER GAAG R. et VAN LEEUWEN J..
Serologic aspects of IgG₄ antibodies. I. Prolonged immunization results in an
IgG₄-restricted response.

J. Immunol., 1983, 130, 722-726.

AHMAD N. et VENKATESAN S..
Nef Protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR.
Science, 1988, 241, 1481-1485.

AICHELE P., HENGARTNER H., ZINKERNAGEL R.M. et SCHULZ M..
Antiviral cytotoxic T cell response induced by *in vivo* priming with a free
synthetic peptide.

J. Exp. Med., 1990, 171, 1815.

ALIZON M., WAIN-HOBSON S., MONTAGNIER L. et SONIGO P..
Cell, 1986, 46, 63-74.

ALLAIN J.P., LAURIAN Y., PAUL D.A. et SENN D..
Serological markers in early stages of human immunodeficiency virus infection
in hemophiliacs.

Lancet, 1986, 2, 1233-1236.

ALLAN J.S., COLIGAN J.E., LEE T.H., McLANE M.F., KANKI P.J., GROOPMAN J.E.
et ESSEX M..

A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients.
Science, 1985, 230, 810-813.

AMEISEN J.C., GUY B., CHAMARET S., LOCHE M., MOUTON Y., NEYRINCK J.L.,
KHALIFE J., LEPREVOST C., BEAUCAIRE G., BOUTILLON C., GRAS-MASSE H., MANIEZ
M., KIENY M., LAUSTRIAT D., BERTHIER A., MACH B., MONTAGNIER L., LECOCQ J. et
CAPRON A..

Antibodies to the *nef* protein and to *nef* peptides in HIV-1 infected
seronegative individuals.

AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1989, 5, 279-291.

AMIT A.G., MARIUZZA R.A., PHILLIPS S.E.V. et POLJAK R.J..
Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Angström
resolution.

Science, 1986, 233, 747-753.

ANTONI G. et PRESENTINI R..

A least squares computer method for determination of the molecular ratio of conjugates between two different proteins from the results of the amino acid analysis.

Analytical Bioch., 1989, 179, 158.

ARENDE A. et KOLODZIEJCZYK A.M..

Tetrahedron Letters, 1978, 40, 3867.

ARNON R. (Editeur), 1987.

Synthetic Vaccines Vol I et II.

Chemical Rubber Co. Press, Boca Raton, Florida.

ARYA S. et GALLO R..

Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III : immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients.

Proc. Natl. Acad. USA, 1986, 83, 2209-2213.

ASHWELL J. et SCHWARTZ R..

T-cell recognition of antigen and the Ia molecule as a ternary complex.

Nature, 1986, 320, 176-179.

BARRE-SINOUSSE F., CHERMANN J., REY F., NUGEYRE M., CHAMARET S., GRUEST J., DAUGUET C., AXLER-BLIN C., VEZINET-BRUN F., ROUZIOUX C., ROZENBAUM W. et MONTAGNIER L..

Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).

Science, 1984, 220, 868-871.

BENJAMIN D.C., BERZOFSKY J.A., EAST I.J., GURD F.R.N., HANNUM C., LEACH S.J., MARGOLIASH E., MICHAEL J.G., MILLER A., PRAGER E.M., REICHLIN M. SERCARZ E.E., SMITH-GILL S.J., TODD P.E. et WILSON A..

The antigenic structure of proteins : a reappraisal.

Annual Review of Immunology, 1984, 2, 67-101.

BENTLEY G.A., BOULOT G., RIOTTOT M.M. et POLJAK R.J..

Three-dimensional structure of an idiotope-anti-idiotope complex.

Nature, 1990, 348, 254-257.

BERMAN P.W., GROOPMAN J.E., GREGORY T., CLAPHAM P., WEISS R.A., FERRIANI R., RIDDLE L., SHIMASAKI C., LUCAS C., LASKY L.A. et EICHBERG J.W..
Human immunodeficiency virus type 1 challenge of chimpanzees immunized with recombinant envelope glycoprotein gp120.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 5200-5204.

BERZOFSKY J., BENSUSSAN A., CEASE K., BOURGE J., CHEYNIER R., LURHUMA Z., SALAUN J., GALLO R., SHEARER G. et ZAGURY D..
Antigenic peptides recognized by T lymphocytes from AIDS viral envelope-immune humans.
Nature, 1988, 334, 706-708.

BETZ A..
Diagnostic sérologique de la toxoplasmose au moyen d'antigènes préparés sur cultures cellulaires.
Bull. Org. Mond. Santé, 1968, 39, 367.

BHAT T.N., BENTLEY G.A., FISCHMANN T.O., BOULOT G. et POLJAK R.J..
Small rearrangements in structures of Fv and Fab fragments of D1.3 on antigen binding.
Nature, 1990, 347, 483-485.

BIDART J.M., TROALEN F., GHILLANI P., ROUAS N., RAZAFINDRATSITA A., BOHUDON C. et BELLET D..
Peptide immunogen mimicry of a protein-specific structural epitope on human choriogonadotropin.
Science, 1990, 248, 736-739.

BIRR C..
Aspects of the MERRIFIELD peptide synthesis.
Reactivity and structure concepts in organic chemistry Vol. 8, Springer-Verlag, Berlin, 1978.

BJORKMAN P.J., SAPER M.A., SAMRAOUI B., BENNETT W.S., STROMINGER J.L. et WILEY D.C..
Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2.
Nature, 1987a, 329, 506-512.

BJORKMAN P.J., SAPER M.A., SAMRAOUI B., BENNETT W.S. STROMINGER J.L. et WILEY D.C..

The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.

Nature, 1987b, 329, 512-518.

BLACK C.M., CATTERALL J.R. et REMINGTON J.S..

In vivo and *in vitro* activation of alveolar macrophages by recombinant interferon γ .

J. Immunol., 1987, 138, 491.

BROWN J.H., JARDETZKY T., SAPER M.A., SAMRAOUI B., BJORKMAN P.J. et WILEY D.C..

A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules.

Nature, 1988, 332, 845-850.

BURNETT F.M., 1959.

The clonal selection theory of acquired immunity.

Cambridge University Press, London.

CARBONE F., FOX B., SCHWARTZ R. et PATERSON Y..

The use of hydrophobic α -helix-defined peptides in delineating the T cell determinant for pigeon cytochrome c.

J. Immunol., 1987, 138, 1838-1844.

CARBONE F.R., MOORE M.W., SHEIL J.M. et BEVAN M.J..

Induction of cytotoxic T lymphocytes by primary *in vitro* stimulation with peptides.

J. Exp. Med., 1988, 167, 1767.

CARBONE F.R. et BEVAN M.J..

Induction of ovalbumine-specific cytotoxic T cells by *in vivo* peptide immunization.

J. Exp. Med., 1989, 169, 603.

CEASE K., MARGALIT H., CORNETTE J., PUTNEY S., ROBNEY W., OUYANG C.,
STREICHER H., FISCHINGER P., GALLO R., DE LISI C. et BERZOFSKY J..
Helper T cell antigenic site identification in the acquired immunodeficiency
syndrome virus *gp120* envelope protein and induction of immunity in mice to
the native protein using a 16-residues synthetic peptide.
Proc. Natl. Sci. USA, 1987, 84, 4249-4253.

CESBRON-DELAUW M.F., GUY B., TORPIER G., PIERCE R.J., LENZEN G., CESBRON
J.Y., CHARIF H., LEPAGE P., DARCY F., LECOCQ J.P. et CAPRON A..
Molcular characterisation of a 23 kDa major antigen secreted by *Toxoplasma*
gondii.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 7537.

CHARIF H., DARCY F., TORPIER G., CESBRON-DELAUW M.F. et CAPRON A..
Toxoplasma gondii : charaterisation and localisation of antigens secreted
from tachyzoites.
Exp. Parasitol., 1990, 71, 114.

CHARLEMAGNE J..
Le système immunitaire.
HERMANN, Paris, 1989.

CHENG-MAYER C., IANELLO P., SHAW K., LUCIW P. et LEVY J..
Differential effect of *nef* on HIV replication : implications for viral
pathogenesis in the host.
Science, 246, 1629-1632.

CHEN I.S.Y..
Regulation of AIDS virus expression.
Cell, 1986, 47, 1-2.

CHOTHIA C. et JANIN J..
Principles of protein-protein recognition.
Nature, 1975, 256, 705-708.

CHOTHIA C..
The nature of the accessible and buried surfaces in protein.
Journal of Molecular Biology, 1976, 105, 1-14.

CHOU Y. et FASMAN G..

Conformational parameters for amino acids in helical, sheet and random coil regims calculated from proteins.

Biochemistry, 1974a, 13, 211-221.

CHOU Y. et FASMAN G..

Prediction of protein conformation.

Biochemistry, 1974b, 13, 222-244.

COHEN E.A., TERWILLIGER E.F., SODROSKI J.G. et HASELTINE W.A.

Présenté à la Fifth International Conference on AIDS, Montreal, 4-9 Juin 1989.

COHEN E.A., TERWILLIGER E.F., JALINOOS Y.J., PROULX J., SODROSKI J.G. et HASELTINE W.A..

Identification of HIV-1 vpr product and function.

Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 1990, 3, 11-18.

COLMAN P.M., LAVER W.G., VARGHESE J.N., BAKER A.T., TULLOCH P.A., AIR G.M. et WEBSTER R.G..

Three-dimentional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase.

Nature, 1987, 326, 358-363.

CORRADIN G., ETLINGER H.M. et CHILLER J.M..

Lymphocyte specificity to protein antigen induced *in vitro* T cell dependent proliferative response with lymph nodes from primed mice.

J. Immunol., 1977, 119, 1048.

COUROUCE A.M..

Latency preceding seroconversion in sexually transmitted HIV infection.

Lancet, 1987, 2, 1025.

CULMANN B., GOMARD E., KIENY M., GUY B., DREYFUS F., SAIMOT A., SERENI D. et LEVY J.P..

An antigenic peptide of the HIV-1 *nef* protein recognized by cytotoxic T lymphocytes of seropositive individuals in association with different HLA-B molecules.

Eur. J. Immunol., 1989, 19, 2383-2386.

DARCY F., DESLEE D., SANTORO F., CHARIF H., AURIAULT C., DECOSTER A.,
DUQUESNE V. et CAPRON A..

Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by
in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*.
Parasite Immunol., 1988, 10, 553.

DARSLEY M.J. et REES A.R..

Three distinct epitopes within the loop region of hen egg white lysozyme
defined with monoclonal antibodies.
The EMBO Journal, 1985, 2, 383- .

DAVIES D.R., SHERIFF S. et PADLAN E.A..

Antibody-antigen complexes.
The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263, 10541-10544.

DE LISI C. et BERZOFKY J..

T-cell antigenic sites tend to be amphipatic structures.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 7048-7052.

DEMOTZ S., GREY H.M., APPELLA E. et SETTE A..

Characterisation of a naturally MHC class II-restricted T-cell determinant of
hen egg lysozyme.
Nature, 1989, 342, 682-684.

DERES K., SCHILD H., WIESMULLER K.H., JUNG G. et RAMMENSEE H.G..

In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic
lipopeptide vaccine.
Nature, 1989, 342, 561-564.

DESROSIERS R., WYAND M., KODAMA T., RINGLER D., ARTHUR L., SEGHAL P.,
LETVIN N., KING N. et DANIEL M..

Vaccine protection against simian immunodeficiency virus infection.
Proc. Natl. Sci. USA, 1989, 86, 6353-6357.

DIMARCHI R.D., TAM J.P. et MERRIFIELD R.B..

Int. Peptide Protein Res., 1982, 19, 270-279.

DUBEAUX C..

Elaboration d'immunogènes synthétiques pour la vaccination : étude des modèles du poliovirus et *Plasmodium falciparum*.

Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Lille, 1988, 188p.

DUQUESNE V., AURIAULT C., DARCY F., DECAVEL J.P. et CAPRON A..

Protection of nude rats against *Toxoplasma gondii* infection by excreted-secreted antigens (ESA) specific helper T cells.

Inf. imm., 1990, 58, 2120.

DURDA P., LEECE B., JENOSKI A., RABIN H., FISHER A. et WONG-STAAAL F..

Characterization of murine monoclonal antibodies to HIV-1 induced by synthetic peptides.

AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1988, 4, 331-341.

DYRBERG T., PETERSEN J.S. et OLDSTONE M.B.A..

Immunological cross-reactivity between mimicking epitopes on a virus protein and a human autoantigen depends on a single amino acid residue.

Clinical Immunology and Immunopathology, 1990, 54, 290-297.

EISENBERG D., WEISS R.M. et TERWILLIGER T.C..

The helical hydrophobic moment : a measure of the amphiphilicity of a helix. Nature, 1982, 299, 371-374.

EISENBERG D., WEISS R.M. et TERWILLIGER T.C..

The helical hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 140.

FARZADEGAN H., POLIS M. et WOLINSKY M..

Loss of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibody with evidence of viral infection in asymptomatic homosexual men.

Ann. Intern. Med., 1988, 108, 7785-790.

FAUCI A..

The human immunodeficiency virus : infectivity and mechanisms of pathogenesis.

Science, 1988, 239, 617-622.

FRANCHINI G., ROBERT-GUROFF M., WONG-STAAAL F., GHAYEB J., KATO I., CHANG T.W., et CHANG N.T..

Expression of the protein encoded by the 3' open reading frame of HTLV-III in bacteria : demonstration of its immunoreactivity with human sera.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1986, 83, 5282-5285.

FRENKEL J.K..

Adoptive immunity to intracellular infection.

J. Immunol., 1967, 98, 1309.

FULTZ P..

Nonhuman primates and the acquired immunodeficiency syndrome : a union of necessity.

J. Med. Primatol., 1989, 18, 73-83.

GALLO R., SALAHUDDIN S., SHEARER G., KAPLAN M., HAYNES B., PALKER T., REDFIELD R., OLESKE J., SAFAI B., WHITE G., FOSTER P. et MARKHAM P..

Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.

Science, 1984, 224, 500-503.

GEYSEN H.M., RODDA S.J., MASON T.J., TRIBBICK G. et SHOOF S.P.G..

Strategies for epitopes analysis using peptide synthesis.

Journal of Immunological Methods, 1987, 102, 259-274.

GISIN R.B..

The monitoring of reactions in solid phase synthesis with picric acid.

Helv. Chim. Acta., 1972, 58, 248.

GNANN J. Jr., McCORMICK J.B., MITCHELL S., NELSON J.A. et OLDSTONE M.B.A..

Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections.

Science, 1987, 237, 1346-1349.

GODARD I., DARCY F., DESLEE D., DESSAINT J.P. et CAPRON A..

Isotypic profile of antibody response to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice. Kinetic study and characterisation of target antigens of IgA antibodies.

Inf. Imm., 1990, 58, 2446.

GOMBERT F.O., BLECHA W., TÄHTINEN M., RANKI A., PFEIFER S., TRÖGER W.,
BRAUN R., MÜLLER-LANTZSCH N., JUNG G., RÜBSAMEN-WAIGMANN H. et KROHN K..
Antigenic epitopes of NEF proteins from different HIV-1 strains as recognized
by sera patients with manifest and latent HIV infection.
Virology, 1990, 176, 458-466.

GOOD M., MALOY W., LUNDE M., MARGALIT H., CORNETTE J., SMITH G., MOSS B.,
MILLER L. et BERZOFKY J..
Construction of a synthetic immunogen : use of a new T-helper epitope on
malaria circumsporozoite protein.
Science, 1987, 235, 1059-1062.

GRAS-MASSE H., JOLIVET M., DROBECQ H., AUBERT J., BEACHEY E., AUDIBERT F.,
CHEDID L. et TARTAR A..
Influence of helical organization on immunogenicity of synthetic peptides.
Mol. Immunol., 1988, 25, 673-678.

GREEN M. et LOCUVENSTEIN P..
Cell, 1988, 55, 1179-1188.

GROOPMAN J.E., CAIAZZO T., THOMAS M.A., FERRIANI R.A., SALTZMAN S., MOON
M., SEAGE G., HORSBURGH C.R. Jr. et MAYER K..
Lack of evidence of prolonged human immunodeficiency virus infection before
antibody seroconversion.
Blood, 1988, 71, 1752-1754.

GUERRIN-MARCHAND C., DRUILHE P., GALEY B., LONDONO A., PATARAPOTIKUL J.,
DUBEAUX C., TARTAR A., MERCEREAU-PUIJALON O. et LANGLEY G..
Nature, 1987, 329, 164-167.

GUY B., KIENY M.P., RIVIERE Y., LE PEUCH C., DOTT K., GIRARD M., MONTAGNIER
L. et LECOCQ J.P..
HIV F/3'-orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an
oncogene product.
Nature, 1987, 330, 266-269.

GUYADER M., EMMERMAN M., SONIGO P., CLAVEL F., MONTAGNIER L. et ALIZON M..
Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus
type 2.

Nature, 1987, 326, 662-669.

HAGENMAIER H. et FRANK H..

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1972, 353, 1973-1976.

HAMMES S., DIXON E., MALIM M., CULLEN B. et GREENE W..

Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 : evidence against its
role as a transcriptional inhibitor.

Proc. Natl. Sci. USA, 1989, 86, 9549-9553.

HARLOW E. et LANE L..

Antibodies. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988.

HASELTINE W..

J. AIDS, 1988, 1, 217-240.

HEBER-KATZ E., HANSBURG D. et SCHWARTZ R..

The Ia molecule of the antigen-presenting cell plays a critical role in
immune response gene regulation of T cell activation.

J. Mol. Cell. Immunol., 1983, 1, 3.

HIRSCH V.M., OLMSTED R.A., MURPHY-CORB M., PURCELL R.H. et JOHNSON P.R..

An african lentivirus (SIV sm) closely related to HIV-2.

Nature, 1989, 339, 389-391.

HOGAN K.T., SHIMOJO N., WALK S.F., ENGELHARD V.H., MALOY W.L., COLIGAN J.E.

et BIDDISON W.E..

Mutations in the $\alpha 2$ helix of HLA-A2 affect présentation but de not inhibit
binding of influenza virus matrix peptide.

J. Exp. Med., 1988, 168, 725.

HOPP T.P. et WOODS K.R..

Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 3824-3828.

HOPP T.P. et WOODS K.R..

A computer program for predicting protein antigenic determinants.
Molecular Immunology, 1983, 20, 483-489.

HOPP T.P..

Immunogenicity of a synthetic HBs Ag peptide : enhancement by conjugation to a fatty acid carrier.
Molecular Immunology, 1984, 21, 13-16.

HOPP T.P..

Anal. Scalvo., 1984, 2, 47-60.

HOSMALIN A., NARA P., ZWEIG M., CEASE K., GARD E., MARKHAM P., PUTNEY S., DANIEL M., DESROSIERS R. et BERZOFKY J..

Enhancement of an antibody response to the envelope glycoprotein of HIV-1 in primates by priming with helper T-cell epitope peptides.
Vaccines 89 : Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS (Ed LERNER R. et al.), p121. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harpor, New York.

HU S.L., FULTZ P.N., McCLURE H.M., EICHBERG J.W., THOMAS E.K., ZARLING J., SINGHAL M.C., KOSOWSKI S.G., SWENSON R.B., ANDERSON D.C. et TODARO G..

Effect of immunization with a vaccinia-HIV env recombinant on HIV infection of chimpanzees.
Nature, 1987, 328, 721-723.

HUNTER W.M. et GREENWOOD F.C..

Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature, 1962, 194, 495-498.

HUSSAIN R. et OTTESEN R.A..

IgE responses in human filariasis. IV. Parallel antigen recognition by IgE and IgG4 subclass antibodies.
J. Immunol., 1986, 136, 1859-1863.

IMAGAWA D.T., LEE M. WOLINSKY S., SANO K., MORALES F., KWOK S., SNINSKY J., NISHANIAN P., GIORGI J., FAHEY J., DUDLEY J., VISSCHER B.R. et DETELS R..

N. Engl. J. Med., 1989, 320, 1458-1462.

ISHIOKA G.Y., COLON S., MILES C., GREY H. et CHESNUT R.W..
Induction of class I MHC-restricted, peptide-specific cytolytic T lymphocytes
by peptide priming *in vivo*.
J. Immunol., 1989, 143, 1094.

JANIN J..
Surface and inside volumes in globular proteins.
Nature, 1979, 277, 491-492.

JAVAHERIAN K., LANGLOIS A.J., McDANAL C., ROSS K.L., ECKLER L.I., JELLIS
C.L., PROFY A.T., RUSCHE J.R., BOLOGNESI D.P., PUTNEY S.D. et MATTHEWS T.J..
Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1
enveloppe protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6768-6772.

JONES P.P., MURPHY D.B., HEWGILL D. et MAC DEVITT H.O..
Detection of a common polypeptide chain in I-A and I-E sub-region
immunoprecipitates.
Mol. Immunol., 1979, 16, 51.

JULIUS M.H., SIMPSON E. et HERZENBERG L.A..
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine
lymphocytes.
Eur. J. Immunol., 1973, 3, 645.

KARPLUS P.A. et SCHULTZ G.E..
Naturwissenschaften, 1985, 72, 212-213.

KHALIFE J., GUY B., CAPRON M., KIENY M.P., AMEISEN J.C., MONTAGNIER L.,
LECOCQ J.P. et CAPRON A..
Isotypic restriction of the antibody response to human immunodeficiency
virus.
AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1988, 4, 3-9.

KHAN I.A., SMITH K.A. et KASPER L.H..
Induction of antigen specific parasiticidal cytotoxic T cell slenocytes by a
major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*.
J. Immunol., 1988, 141, 3600.

KIENY M.P., LATHE R., DRILLIEN R., SPEHNER D., SKORY S., SCHMIT W.,
KOPROWSKI H. et LECOCQ J.P..

Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus.
Nature, 1984, 312, 163.

KIM S., IKEUCHI K., BYRN R., GROOPMAN J. et BALTIMORE D..
Lack of a negative influence on viral growth by the *nef* gene of human
immunodeficiency virus type 1.

Proc. Natl. Sci. USA, 1989, 86, 9544-9548.

KOENING S., FUERST T., WOOD L., WOODS R., SUZICH J., JONES G., DE LA CRUZ
V., DAVEY R., VENKATESAN S., MOSS B., BIDDISON W. et FAUCI A..

Mapping the fine specificity of a cytolytic T cell response to HIV-1 *nef*
protein.

J. Immunol., 1990, 145, 127-135.

KONIG W. et GEIGER R..
Chem. Ber., 1970, 103, 788-798.

KOURILSKY P. et CLAVERIE J.M..
MHC-antigen interaction : what does the T-cell receptor see?.
Advance in Immunology, 1989, 45, 107-193.

KURATA A. et BERZOFSKY J.A..
Analysis of peptide residues interacting with MHC molecule or T cell
receptor.

J. Immunol., 1990, 144, 4526-4535.

KVIST S., WIMAN K., CLAESSION L., PATERSON P.A. et DOBBERSTEIN B..
Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility
antigens.

Cell, 1982, 29, 61.

KYTE J. et DOOLITTLE R.F..
A simple method for displaying the hydropatic character of a protein.
Journal of Molecular Biology, 1982, 157, 105-132.

LAEMMLI U.K..

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 1970, 227, 680.

LANE C., MASUR H., EDGAR L., WHALEN G., ROOK A. et FAUCI A..

Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome.

N. Eng. J. Med., 1983, 309, 453-458.

LAURE F., ROUZIOUX C., VEBER F., BLANCHE S. GRISCELLI C. et BRECHOT C..

Detection of HIV-1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction.

Lancet, 1988, 2, 538-541.

LAVER W.G., AIR G.M., WEBSTER R.G. et SMITH-GILL S.J..

Epitopes on protein antigens : microconceptions et realities.

Cell, 1990, 61, 553-556.

LEVINE A.M., HENDERSON B.E., DWORSKY R., ASCHER M., SHEPPARD H., CULLMAN

L., HICKS D., MUNSON C., CARLO D.J., ABRAHAMSON J. et SALK J..

Response of HIV infected individuals with ARC to inoculation of gamma-irradiated HIV. IV. International conference on AIDS (Stockholm), 1988, abstract 6567.

LEVITT M. et CHOTTIA C..

Structural patterns in globular proteins.

Nature, 1976, 261, 552-558.

LEVY J., HOFFMAN A., KRAMER S., LANDIS J., SHIMABUKURO J. et OSHIRO L..

Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS.

Science, 1984, 225, 840-842.

LINDBERG R.E. et FRENKEL J.K..

Toxoplasmosis in nude mice.

J. Parasitol., 1977, 63, 219.

LOCHE M. et MACH B..

Identification of HIV-infected seronegative individuals by a direct diagnostic test based on hybridization to amplified viral DNA.
Lancet, 1988, 2, 418-421.

LUCIW P., CHENG MAYER C. et LEVY J.A..

Mutational analysis of the human immunodeficiency virus : The *orf-B* region down-regulates virus replication.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1987, 84, 1434-1438.

LUFT B.J., NAOT Y., ARAUJO F.G., STINSON B. et REMINGTON J.S..

Primary and reactivated toxoplasma infection in patients with cardiac transplantation.
Ann. Int. Med., 1983, 99, 27.

MAC CABE R. et REMINGTON J.S..

Toxoplasmosis : the time has come.
N. Engl. J. Med., 1988, 99, 27.

MAC KAY F.C. et FALBERTSON N..

J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 4646.

MACATONIA S.E., TAYLOR P.M., KNIGHT S.C. et ASKONAS B.A..

Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses *in vitro*.
J. Exp. Med., 1989, 169, 1255.

MAC SHARRY J., COSTANTINO R., ROBBIANO E., ECHOLS R., STEVENS R. et LEHMAN J..

Detection and quantification of human immunodeficiency virus-infected peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry.
J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 724.

MALE D., CHAMPION B. et COOKE A..

Immunologie. Le système immunitaire et sa régulation.
MEDSI/Mc GRAW-HILL, Paris, 1988.

MARGALIT H., SPOUGE J., CORNETTE J., CEASE K., DE LISI C. et BERZOFISKY J..
Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary
sequence.

J. Immunol., 1987, 138, 2213-2229.

MARIUZZA R.A., PHILLIPS S.E.V. et POLJAK R.J..
The structural basis of antigen-antibody recognition.
Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 1987, 16, 139-159.

MARTZ E. et HOWELL D..
CTL : virus control cells first and cytolytic cells second?..
Immunol. Today, 1989, 10, 79-86.

MAYER K.H., STODDARD A., McCUSKER J., AYOTTE D., FERRIANI R. et GROOPMAN
J..
Human immunodeficiency virus type III in high risk, antibody-negative
homosexual men.
Ann. Intern. Med., 1986, 104, 194-199.

MERRIFIELD R.B..
Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide.
J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149-2154.

MITCHELL A.R., ERICKSON B.W., RYABSEV M.N., HODGES R.S. et MERRIFIELD R.B..
J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 7357-7362.

MUESING M.A., SMITH D.H., CABRADILLA C.D., BENTON C.V., LASKY L.A. et CAPON
D.J..
Nature, 1985, 313, 430-458.

MULLIS K.B. et FALOONA F.A..
Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol., 1987, 155, 335-350.

MURPHEY-CORB M., MARTIN L., DAVISON-FAIBURN B., MONTERALARO R., MILLER M., WEST M., OHKAWA S., BASKIN G., ZHANG J., PUTNEY S., ALLISON A. et EPPSTEIN D..

A formalin-inactivated whole SIV vaccin confers protection in macaques.
Science, 1989, 246, 1293-1297.

MURRAY H.W., SCAVUZZO D., JACOBS J.L., KAPLAN M.H., LIBBY D.M., SCHINDLER J. et ROBERTS R.B..

In vitro and *in vivo* activation of human mononuclear phagocytes by interferon.

J. Immunol., 1987, 138, 2457.

NEISSON-VERNANT C. ARFI S., MATHEZ D., LEIBOWITCH J. et MONPLAISIR N..
Needlestick HIV seroconversion in a nurse.

Lancet, 1986, 2, 814.

NIEDERMAN T., THIELAN B. et RATNER L..

Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer.

Proc. Natl. Acad. USA, 1989, 86, 1128-1132.

NIMAN H.L., HOUGHTEN R.A., WALKER L.E., REISFELD R.A., WILSON I.A., HOGLE J.M. et LERNER R.A..

Generation of proteine reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency : implications for the structural basis of immune recognition.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 4949-4953.

NOSAKI Y. et TANFORD C..

The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions.

Journal of Biological Chemistry, 1971, 246, 2211-2217.

OU C.Y., KWOK S., MITCHELL S.Q., MACK D.H., SUINSKY J.J., KREBS J.W., FEORINO P., WARFIELD D. et SCHOCHETMAN G..

DNA amplification for direct detection of HIV-A in DNA of peripheral blood mononuclear cells.

Science, 1988, 239, 295-297.

PADLAN E.A., SILVERTON E.W., SHERIFF S., COHEN G.H., SMITH-GILL S.J. et
DAVIES D.R..

Structure of an antibody-antigen complex : crystal structure of the HyHEL-10
Fab-lysozyme complex.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 5938-5942.

PADLAN E.A..

On the nature of antibody combining sites : unusual structural features that
may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands.

Proteins : Structure, Function and Genetics, 1990, 7, 112-124.

PATERSON Y., ENGLANDER S.W. et RODER H..

An antibody binding site on cytochrome c defined by hydrogen exchange and
two-dimensional NMR.

Science, 1990, 249, 755-759.

PAVIA C.S..

Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy.

J. Immunol., 1986a, 137, 2985.

PAVIA C.S..

Enhanced primary resistance to *Treponema pallidum* infection and increased
susceptibility to toxoplasmosis in T cell depleted guinea pigs.

Inf. Imm., 1986b, 53, 305.

PERKINS D.L., MING-ZONG L., SMITH J.A. et GEFTER M.L..

Identical peptides recognized by MHC class I- and class II-restricted T
cells.

J. Exp. Med., 1989, 170, 279.

PETIT C., TERSMETTE M., TERPSTRA F., DE GOEDE R., VAN LIER R. et MIEDMA F..

Decreased accessory cell function by human monocytic cells after infection
with HIV.

J. Immunol., 1988, 140, 1485-1489.

PIETTA P.G. et MARSHALL G.R..

Amide protection and amide supports in solid phase peptide synthesis.

Chem. Comm., 1970, p650

PONNUSWAMY P.K. et BHASKARAN R..

Int. J. Peptide and Protein Res., 1984, 24, 168-179.

RANKI A., KROHN M., ALLAIN J.P., FANCHINI G., VALLE S.L., ANTONEN J.,
LEUTHER M. et KROHN K..

Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human
immunodeficiency virus infection.

Lancet, 1987, 2, 589-593.

RATNER L., HASELTINE W.A., PATARCA R., LIVAK K., STARCICH G., JOSEPHS C.F.,
DORAN E.R., RAFALSKI J.A., WHITEHORN E.A., BAUMEISTER K., IVANOFF L.,
PETTEWAY S.R., PEARSON M.L., LAUTENBERGER J.A., PAPAS T.S., CHANGE N.T.,
GALLO R.C. et WONG-STAAAL F..

Nature, 1985, 313, 277-284.

RATNER L..

Non publié, 1986, Washington U. Med. School, MO, EMBL.

RIDEL P.R., AURIAULT C., DARCY F., PIERCE R.J., LEITE P., NEYRINCK J.L.,
KUSNIERZ J.P. et CAPRON A..

Protective role of IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis.

J. Immunol., 1988, 141, 978.

ROBERT-GUROFF M., POPOVIC M., GARTNER S., MARKHAM P., GALLO R. et REITZ M..
Structure and expression of *tat*-, *rev*- and *nef*-specific transcripts of human
immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages.

J. Virol., 1990, 64, 3391-3398.

ROBINSON W.E. Jr., MONTEFIORI D.C. et MITCHELL W.M..

Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1
infection.

Lancet, 1988, 1, 790-794.

ROCHE P.A. et CRESSWELL P..

Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic
peptide binding.

Nature, 1990, 345, 615.

ROITT I., BROSTOFF J. et MALE D..
Immunologie fondamentale et appliquée.
MEDSI/Mc GRAW-HILL, Paris, 1989.

ROTHBARD J.B. et TAYLOR W.R..
A sequence pattern common to T-cell epitopes.
The EMBO Journal, 1988, 7, 93-100.

ROTZSCHKE O., FALK K., DERES K, SCHILD H., NORDA M., METZGER J., JUNG G. et
RAMMENSEE H.G..
Isolation and analysis of naturally processed viral peptide as recognized by
cytotoxic T cells.
Nature, 1990, 348, 252-254

RUSCHE J.R., JAVAHERIAN K., MAC DANAL C., PETRO J., LYNN D.L., GRIMAILA R.,
LANGLOIS A., GALLO R.C., ARTHUR L.O., FISHINGER P.J., PUTNEY S.D. et MATTHEWS
T.J..
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 3198-3202.

SALK J.
Prospects for the control of AIDS by immunizing seropositive individuals.
Nature, 1987, 327, 473-476.

SANCHEZ-PESCADOR R., POWER M.D., BARR P.J., STEIMER K.S., STEMPIEN M.M.,
BROWN-SHIMER S.L., GEE W.W., RENARD A., RANDOLPH A., LEVY J.A., DINA D. et
LUCIW P.A..
Science, 1985, 227, 484-492.

SANTORO F., AURIAULT C., LEITE P., DARCY F. et CAPRON A..
Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii*.
Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 1987, 304, série III, 297.

SCHWARTZ R..
T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the
major histocompatibility complex.
Ann. Rev. Immunol., 1985, 3, 237.

SEDLAK J. et LINDSAY R..

Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent.

Anal. Biochem., 1968, 25, 192.

SETTE A., BUUS S., COLON S., MILES C. et GREY H.M..

Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells.

Nature, 1987, 328, 395-697.

SHEARER G., BERNSTEIN D., TUNG K., VIA C., REDFIELD R., SALAHUDDIN S. et GALLO R..

A model for the selective loss of major histocompatibility complex self-restricted T cell immune responses during development of acquired immune deficiency syndrome (AIDS).

J. Immunol., 1986, 137, 2514-2521.

SHERIFF S., SILVERTON E.W., PADLAN E.A., COHEN G.H., SMITH-GILL S.J., FINZEL B.C. et DAVIES D.R..

Three-dimensional structure of an antibody-antigen complex.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 8075-8079.

SPOUGE J., GUY R., CORNETTE J., MARGALIT H., CEASE K., BERZOFSKY J. et DE LISI C..

Strong conformational propensities enhance T cell antigenicity.

J. Immunol., 1987, 138, 204-212.

SRINIVASAN A., ANAND R., YORK D., RANGANATHAN P., FEORINO P., SCHOCHETMAN G., CURRAN J., KALYANARAMAN V.S., LUCIW P.A. et SANCHEZ-PESCADOR R..

Gene, 1987, 52, 71-82.

STANFIELD R.L., FIESER T.M., LERNER R.A. et WILSON I.A..

Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Angström.

Science, 1990, 248, 712-719.

STARCICH B., HAHN B.H., SHOW G.M., MAC NEELY P.D., MODROW S., WOLF H., PARKS W.P., PARKS E.S., JOSEPHS S.F., GALLO R.C. et WONG-STAAAL F..

Cell, 1986, 45, 637-648.

SWANK R.T. et MUNKRESS K.D..
Anal. Biochem., 1971, 39, 111-116.

TAKAHASHI H., COHEN J., HOSMALIN A., CEASE K., HOUGHTEN R., CORNETTE J. DE LISI C., MOSS B., GERMAIN R. et BERZOFSKY J.A..
An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 3105.

TAKAHASHI H., GERMAIN R., MOSS B. et BERZOFSKY J.A..
An immunodominant class I-restricted cytotoxic T lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type I induces CD4 class II-restricted help for itself.
J. Exp. Med., 1990, 171, 571.

TAM J.P., WONG T.W., RIEMEN M.W., TJOENG F.S. et MERRIFIELD R.B..
Tetrahedron Lett., 1979, 4033-4036.

TAM J.P., HEATH W.F. et MERRIFIELD R.B..
J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 6442-6445.

TEYTON L., O'SULLIVAN D., DICKSON P.W., LOTTEAU V., SETTE A., FINK P. et PETERSON P.A..
Invariant chain distinguishes between the exogenous antigen presentation pathways.
Nature, 1990, 348, 39.

TONIOLO C., BONORA G.M., PAVONE V. et PEDONE C..
Biopolymers, 1983, 22, 205-215.

TOWBIN H., STAEHELIN T. et GORDON J..
Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 74, 4350.

VAN BLEEK G.M. et NATHENSON S.G..
Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b molecule.
Nature, 1990, 348, 213-216.

VITTECOCQ D., AUTRAN B., BOURSTYN E. et CHERMANN J.C..

Lymphadenopathy syndrome and seroconversion two months after single use of needle shared with an AIDS patient.

Lancet, 1986, 1, 1280.

WABUKE-BUNOTI M.A.N., TAKU A., GARMAN R. et FAN D.D..

Stimulation of anti-influenza cytotoxic T lymphocytes by a synthetic peptide of the influenza hemagglutinin can be modulated by at least three independent helper factors.

J. Immunol., 1984, 133, 2186.

WAIN-HOBSON S., SONIGO P., DANOS O., COLE S. et ALIZON M..

Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV.

Cell, 1985, 40, 9-17.

WALKER C., MOODY D., STITES D. et LEVY J..

CD8⁺ lymphocytes can control HIV infection *in vitro* by suppressing virus replication.

Science, 1986, 234, 1563-1566.

WARD J.W., HOLMBERG S.D., ALLEN J.R., COHN D.L., CRITCHLEZY S.E., KLEINMAN

S.H., LENES B.A., RAVENHOLT O., DAVIS J.R., QUINN M.G. et JAFFE H.W..

Transmission of human immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusion screened as negative for HIV antibody.

N. Engl. J. Med., 1988, 31, 473-478.

WONG-STAAAL F., CHANDA P.K. et GHAYEB J..

AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1987, 3, 33-39.

WRAITH D., SMILEK D., MITCHELL D., STEINMAN L. et MAC DEVITT H..

Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy.

Cell, 1989, 59, 247-255.

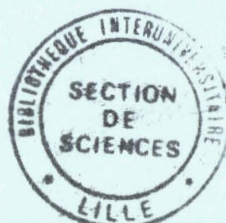
YORK E.J., STEWART J.M., BALDWIN R.L. et SHOEMAKER K.R..

Peptides, 1986, 287-290.

ZAGURY D., BERNARD J., CHEYNIER R., DESPORTES I., LEONARD R., FOUCHARD M.,
REVEIL B., ITTELE D., LURHUMA Z., MBAYO K., WANE J., SALAUN J.J., GOUSSARD
B., DECHAZAL L., BURNY A., NARA P. et GALLO R..

A group specific anamnestic immune reaction against HIV-1 induced by a
candidate vaccine against AIDS.

Nature, 1988, 322, 728-731.



Résumé :

Les bases moléculaires de la reconnaissance immunitaire permettent la prévision des épiotopes B et T d'une protéine à la seule vue de sa structure primaire. Afin de valider et d'améliorer ces méthodes, nous les avons utilisées dans plusieurs modèles parasitaires et viraux pour sélectionner des peptides, les synthétiser et, en collaboration avec plusieurs équipes d'immunologistes, en étudier les propriétés.

Du point de vue de l'antigénicité, il est possible de synthétiser une protéine complète et d'observer sa reconnaissance par des sérums de sujets infectés. Par ailleurs, les fragments peptidiques sont de bons outils pour cartographier les épitopes d'une protéine et peuvent dans certains cas constituer des antigènes plus performants que la protéine elle-même. Il est également possible d'induire une organisation spatiale chez un peptide afin d'en améliorer l'antigénicité.

Du point de vue de l'immunogénicité, nous avons mis en évidence plusieurs peptides actifs, parmi lesquels certains possédaient une structure modifiée par rapport à la séquence naturelle leur conférant des propriétés nouvelles, telle la génération d'une réponse cellulaire cytotoxique spécifique de l'antigène naturel.

Mots-clés :

Antigénicité - Immunogénicité - Prévisions épitopiques -

Peptides synthétiques - Conformation - Structures naturelles -

Structures modifiées.