

doc. 20 40 45 14

50 376
1995
237

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

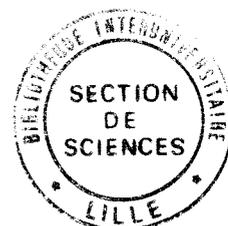
THESE DE DOCTORAT de l'Université de Lille I
pour l'obtention du titre de
Docteur en Chimie Organique et Macromoléculaire
présentée par

Caroline ROLLIN

**Conception, synthèses et études immunologiques d'analogues
peptidiques dérivés de la séquence carboxy-terminale de la
Sm28GST : intérêts de modifications structurales dans le cadre de
stratégies vaccinales et diagnostiques.**

Soutenue le 29 septembre 1995 devant le jury composé de :

Professeur H. SLIWA	:	Président
Professeur M. JOLIVET	:	Rapporteur
Docteur C. AURIAULT	:	Rapporteur
Professeur H. GRAS-MASSE	:	Examineur
Professeur A. TARTAR	:	Examineur



A mes parents qui m'ont apporté leur soutien aussi bien
moral que financier pendant toutes ces années

A ma grand-mère , à mes sœurs dont la présence,
même lointaine, m'a été précieuse

A Carole et Franck qui ont toujours su être là, dans les bons
comme dans les mauvais moments.

Que ce travail soit le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier très vivement :

Monsieur le Professeur A. TARTAR qui a bien voulu m'accueillir au sein de son laboratoire et examiner ce travail. Ses critiques et ses encouragements m'ont été précieux. Que ce travail soit le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur H. SLIWA qui me fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ma thèse.

Madame le Professeur H. GRAS-MASSE qui m'a initiée à la recherche et grâce à qui j'ai pu effectuer ce travail.

Monsieur le Docteur C. AURIAULT dont la collaboration a été efficace et qui a accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur M. JOLIVET qui a accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier

Isabelle FERRU du laboratoire du Docteur C. AURIAULT, pour sa collaboration à ce travail et son amitié.

Corinne Rommens pour son aide technique et sa patience
Josiane Herno pour son travail efficace à l'animalerie
Hervé Drobecq pour ses conseils techniques judicieux
Valérie Lucas pour son aide technique et sa gentillesse
Christophe Boutillon pour ses conseils scientifiques
Bertrand Georges pour son aide scientifique et sa sympathie.

Je tiens vivement à remercier **Carole Desruelle**, et **Marie-Isabelle Steeland**, pour leur aide, leurs conseils et leur soutien qui m'ont été très précieux.

SOMMAIRE

RESUME	1
INTRODUCTION	2
GENERALITES	4
A - LE SYSTEME IMMUNITAIRE	4
B - UTILISATION DES IMMUNOGENES DE SYNTHESE COMME VACCINS POTENTIELS.....	26
C - LA BILHARZIOSE.....	46
RESULTATS	70
A - MELANGES DE PEPTIDES OBTENUS PAR SYNTHESE COMBINATOIRE : UTILISATION COMME ANTIGENES DANS LES TESTS SERODIAGNOSTICS	70
B - MELANGES DE PEPTIDES OBTENUS PAR SYNTHESE COMBINATOIRE : UTILISATION COMME IMMUNOGENES EN STRATEGIE VACCINALE.....	117
C - VACCINATION PAR VOIE ORALE : UTILISATION DE PEPTIDES SYNTHETIQUES	145
CONCLUSION GENERALE	178
Liste des abreviations	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	183
TABLE DES MATIERES	206

RESUME

Notre objectif est d'évaluer différentes modifications apportées à un antigène peptidique, et de tester l'activité biologique de ces peptides modifiés soit comme réactif sérodiagnostic, soit comme modèle de vaccin synthétique. Le peptide modèle choisi est le peptide 190-211, correspondant à l'extrémité carboxy-terminal de la protéine Sm28GST de *Schistosoma mansoni*.

Nous avons dans un premier temps préparé à partir des séquences 115-131 et 190-211 des "mixotopes", ou constructions combinatoires convergentes, obtenus en introduisant en chaque position un mélange équimolaire d'acides aminés apparentés au résidu naturel. Ces mixotopes ont été utilisés comme antigène en phase solide dans des tests ELISA pour étudier des sérums humains, et comparés aux peptides non modifiés. Les mixotopes réagissent au moins aussi bien que les peptides originaux avec les sérums humains et permettent de révéler une séropositivité Sm28GST non détectée par le peptide 190-211.

Nous avons conçu et réalisé des antigènes combinatoires, pour lesquels la variabilité n'était introduite que sur 3 positions de part et d'autre d'une fenêtre de 6 résidus. En dégénéralisant des positions présumées agrétopiques, notre but était de générer une série de peptides combinatoires plus aptes à se fixer aux molécules de CMH de classe II, tout en présentant aux cellules T le motif naturel. Des résultats préliminaires obtenus chez des souris syngéniques nous encouragent dans cette voie.

Enfin, nous avons entrepris d'utiliser des peptides dérivés du peptide 190-211 pour réaliser des immunisations orales. Nous avons obtenu dans les sécrétions intestinales de souris des taux d'IgA spécifiques maximum en immunisant ces souris avec le peptide fixé par son extrémité carboxy-terminale sur de fines particules de polystyrène-divinylbenzène, et modifié en position amino-terminale par une α N(acétyl)- ϵ N(palmitoyl)-lysine.

INTRODUCTION

Les vaccins synthétiques sont des molécules chimiquement caractérisées, susceptibles d'induire une réponse immune dont la cible est prédéterminée par le choix de la séquence employée.

Bien que les peptides synthétiques soient souvent faiblement immunogènes, cette approche de la vaccination connaît depuis les cinq dernières années un renouveau d'intérêt : l'immunisation par un lipopeptide chimiquement caractérisé permet d'induire une réponse cellulaire T cytotoxique capable de reconnaître et de détruire spécifiquement des cellules infectées par un virus. Il apparaît donc que les vaccins synthétiques peuvent être utilisés pour leur capacité à orienter sélectivement la réponse immune.

L'objectif de ce travail a été d'explorer les potentialités d'une séquence peptidique unique, mais présentées selon différentes modifications chimiques.

Nous avons choisi comme modèle le peptide 190-211 (extrémité carboxy-terminal) de la protéine Sm28GST, une glutathion-S-transférase produite à tous les stades du développement de *Schistosoma mansoni*, et présentant un intérêt vaccinal pour la prévention de la bilharziose. Ce peptide a été identifié initialement en tant que cible d'une réponse cellulaire chez l'homme (Estaquier, J. et coll. 1993). Lorsqu'il est modifié par l'acide α -amino-palmitique, il est capable d'induire chez la souris une réponse cellulaire protectrice (Pancré, V. et coll. 1994). Enfin, il est l'une des

cibles de la réponse IgA anti-P28 générées par le parasite, réponse susceptible de participer au contrôle de la maladie (Xu, C.B. et coll. 1993).

Notre travail s'est développé selon 3 axes :

1 - Utilisation de constructions combinatoires convergentes, ou mixotopes, dérivées du peptide 190-211, à des fins sérodiagnostiques. Cette approche dérive d'une observation réalisée au laboratoire, montrant que de telles constructions pouvaient induire une réponse spécifique, capables de reconnaître plusieurs variants d'une séquence hypervariable. La reconnaissance anticorps-antigène est par essence dégénérée : nous avons donc cherché à vérifier s'il était possible d'élargir le recrutement des anticorps anti-peptide 190-211 au moyen d'un antigène constitué de multiples combinaisons proches du peptide initial.

2 - Utilisation de constructions combinatoires sur deux segments limités du peptide, susceptibles d'intervenir comme positions agrétopiques, c'est-à-dire dans l'interaction avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II : cette interaction détermine la restriction de la réponse immune. L'idée est ici de tester la possibilité d'élargir l'immunogénicité de peptides par l'augmentation du nombre de combinaisons agrétopiques, et donc l'augmentation du nombre de molécules de CMH de classe II capables d'accepter le peptide comme ligand, tout en présentant le motif "naturel".

3 - Utilisation du peptide ou du lipopeptide fixé sur de fines particules de résine type polystyrène réticulé au dinitylbenzène, employé pour réaliser une vaccination orale chez la souris et obtenir une production d'IgA sécrétoires spécifiques au niveau des muqueuses intestinales.

GENERALITES

GENERALITES

LE SYSTEME IMMUNITAIRE	4
I - INTRODUCTION	4
II-LES ANTICORPS	5
1 - Structure	6
2 - Liaison antigène-anticorps.....	7
3 - Notions d'affinité et d'avidité	8
III - LES MOLECULES DE CMH	8
1 - Les molécules de CMH de classe I	9
a - Structure.....	10
b - Fixation des peptides aux molécules de CMH I.....	11
c- Peptides antigéniques.....	13
d- Présentation de l'antigène par les molécules de CMH de classe I.....	16
2 - Les molécules de CMH de classe II.....	18
a - Structure.....	18
b - Fixation des peptides aux molécules de CMH II.....	19
c - Peptides antigéniques.....	20
d - Présentation de l'antigène par les molécules de CMH classe II.....	22
3 - Reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TcR.....	23
4- Conclusion	24
 UTILISATION D' IMMUNOGENES PEPTIDIQUES COMME VACCINS POTENTIELS	26
I - RAPPELS SUR LA VACCINATION	26
II - VACCINATION A L'AIDE DE PEPTIDES SYNTHETIQUES	27
1 - Conception	28
2 - Immunogénicité	28
3 - Principe	29
III - CRITERES POUR LA SELECTION D'IMMUNOGENES PEPTIDIQUES	31
1 - Critères pour la sélection de séquences antigéniques	31
a - Localisation en surface	32
b - Mobilité de la chaîne protéique.....	33
c - Conformation de la séquence.....	33
2 - Critères d'immunogénicité	35
a - Taille d'un peptide immunogénique	35
b - Reconnaissance du peptide par le système immunitaire de l'hôte.....	35

IV - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE	36
1 - Principe	36
2 - Le support.....	37
3 - Protection des acides aminés.....	39
a - Fonction α -aminée.....	39
b - Chaînes latérales.....	39
4 - Synthèse.....	40
a - Fixation du premier acide aminé.....	40
b - Elongation de la chaîne.....	41
5 - Elimination de la résine et déprotection des chaînes latérales.....	42
6 - Purification et contrôles	42
a - Introduction.....	43
b - Technique de purification : CLHP préparative en phase inverse	44
c - Contrôles.....	44
α - CLHP analytique en phase inverse.....	44
β - Analyse d'acides aminés.....	45
γ - Spectrométrie de masse	45
 LA BILHARZIOSE.....	 46
I - GENERALITES SUR LA BILHARZIOSE.....	46
1 - Qu'est-ce que la bilharziose ?	47
2 - Fiche signalétique des schistosomes.....	48
3 - Le cycle biologique	48
 II - LA REPONSE IMMUNE CHEZ LES ANIMAUX.....	 53
1 - Choix du modèle animal	53
2 - Caractères de la réponse immune contre les schistosomes.....	54
3 - La réaction granulomateuse.....	55
4 - L'immunité spécifique	56
a - Immunité thymo-dépendante.....	56
b - Mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps (ADCC).....	57
5 - Mécanismes d'échappement du parasite.....	57
 III - LA REPONSE IMMUNE CHEZ L'HOMME.....	 58
1 - L'immunité à la réinfection.....	58
2 - Les différents isotypes d'anticorps mis en jeu.....	59
a - Isotypes effecteurs.....	59
b - Isotypes bloquants.....	59

IV - BILHARZIOSE : VERS UN VACCIN ?	60
1 - Localisation de l'antigène Sm28GST.....	62
2 - Mécanismes effecteurs impliqués dans la protection.....	62
a - Réduction de la charge parasitaire.....	62
b- Réduction de la ponte des parasites.....	64
c - Réduction de la viabilité des œufs.....	64
3 - Réponse immunitaire anti-Sm28GST	65
a - Réponse humorale.....	65
b - Réponse cellulaire.....	65
 V - EPITOPES IMPLIQUES DANS LE POUVOIR PROTECTEUR DE LA Sm28GST.....	66
1 - Prédiction des épitopes de la Sm28GST.....	66
2 - Analyse de l'antigénicité des peptides sélectionnés.....	67
a - Antigénicité B des peptides 115-131 et 190-211.....	67
b - Effet anti-fécondité des peptides N et C terminaux.....	67
c - Peptides reconnus par les anticorps inhibant l'activité enzymatique	68
 VI - CONCLUSION.....	69

LE SYSTEME IMMUNITAIRE

I - INTRODUCTION

La fonction principale du système immunitaire consiste à protéger l'organisme contre les agressions extérieures. La reconnaissance spécifique des antigènes est la principale caractéristique du système immunitaire. Deux types de molécules spécialisées sont impliqués dans ce processus : les immunoglobulines membranaires et solubles des lymphocytes B et le récepteur des lymphocytes T. Ces molécules reconnaissent les structures étrangères grâce à un site spécialisé (paratope) capable de se combiner à un site de la molécule étrangère (épitope).

Les lymphocytes T et les lymphocytes B sont les seuls représentants du système immunitaire capables de reconnaître spécifiquement les antigènes. Cette défense spécifique serait toutefois impossible sans l'intervention d'un élément essentiel qui repose sur la façon dont les cellules perçoivent l'antigène. Les lymphocytes B reconnaissent les déterminants antigéniques (épitopes) portés par les antigènes intacts présents dans leur environnement. Ils assurent ainsi une immunité à médiation humorale.

Les lymphocytes T quant à eux, ont besoin de la collaboration de cellules accessoires qui vont leur présenter des fragments "prédigérés" de ces antigènes. En effet, les récepteurs des lymphocytes T, contrairement aux anticorps, n'ont pas d'interaction directe avec l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. Ils reconnaissent une structure peptidique dérivée de l'antigène

nominal, présentée à la surface de cellules dites de présentation et ce, en association avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) (Rothbard, J.B. et coll. 1991). Ces Cellules Présentatrices de l'Antigène (CPA) sont soit des cellules phagocytaires telles que les macrophages, soit les lymphocytes B eux-mêmes. L'antigène subit un apprêtement (Germain, R. et Margulies, D.H. 1993) comportant les étapes suivantes : une protéolyse de l'antigène en peptides ou "processing", l'association de certains de ces peptides aux molécules présentatrices et l'expression à la membrane des CPA des complexes peptides/molécules du CMH pour être présentés aux récepteurs des lymphocytes T (Unanue et coll. 1987).

II-LES ANTICORPS

Les anticorps sont des molécules solubles qui circulent dans les fluides biologiques. Ils ont la capacité de se fixer sur des corps étrangers et de conduire à leur élimination de l'organisme. Les anticorps sont produits par les lymphocytes B, lesquels présentent à leur surface une forme d'anticorps possédant une extrémité "collante" qui permet leur ancrage dans la membrane cellulaire. Cet anticorps de surface est un récepteur. Il se fixe au corps étranger (antigène). Cette fixation active le lymphocyte B qui produit alors de grandes quantités du même anticorps, mais sous forme circulante, c'est à dire sécrétée dans le sang.

1 - Structure

Les immunoglobulines, ou anticorps, sont les molécules de reconnaissance produites par les cellules B. Elles ont une grande hétérogénéité mais présentent une structure de base commune associant deux chaînes polypeptidiques lourdes (H : Heavy chain) et deux chaînes légères (L : Light chain), reliées par des ponts disulfures intercaténaux et des liaisons non covalentes (figure 1).

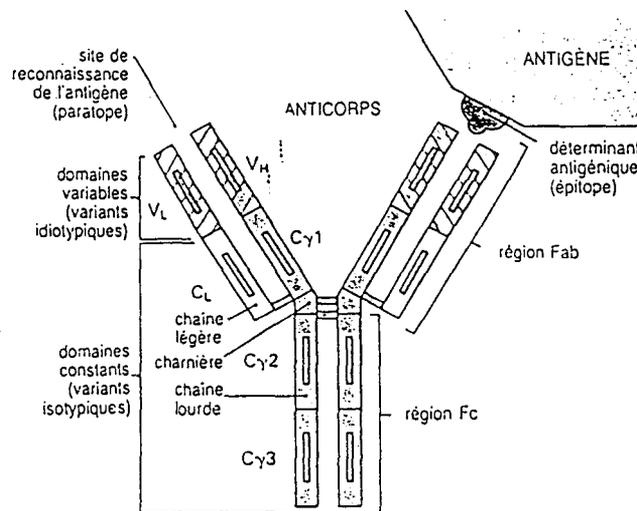


Figure 1 : Structure de l'anticorps

Ces différentes chaînes se composent de plusieurs domaines globulaires. Les domaines N-terminaux des chaînes légères et lourdes forment le site de reconnaissance antigénique ou paratope. Ces domaines sont très variables (V_L et V_H), restreints à certaines régions impliquées directement dans la capacité à interagir avec l'antigène, permettant ainsi de reconnaître toute molécule. Les immunoglobulines présentent aussi des domaines dits "constants" dont certains prennent part dans l'interaction entre les anticorps et le récepteur pour les immunoglobulines.

Les anticorps se répartissent en plusieurs classes et sous-classes selon le type de chaîne lourde qu'ils présentent (Shimizu, A. et Honjo, T. 1984).

Chez l'homme, on définit ainsi cinq classes d'immunoglobulines : les IgM, IgG, IgA, IgD et IgE.

2 - Liaison antigène-anticorps

La molécule d'antigène se niche dans le creux formé par les chaînes lourdes et légères appelé site de combinaison à l'anticorps (figure 2) (Amit, A.G. et coll., 1986 - Alzari, P.M. et coll., 1988).

De nombreuses liaisons non covalentes participent à l'interaction antigène-anticorps :

- liaisons hydrogènes
- forces électrostatiques
- forces de Van-der-Waals
- liaisons hydrophobes

Bien que ces forces attractives soient faibles comparées aux liaisons covalentes, leur grand nombre permet une énergie de liaison élevée. Une complémentarité parfaite entre le déterminant antigénique (épitope) et le site anticorps (paratope) favorise la formation de forces attractives intermoléculaires.

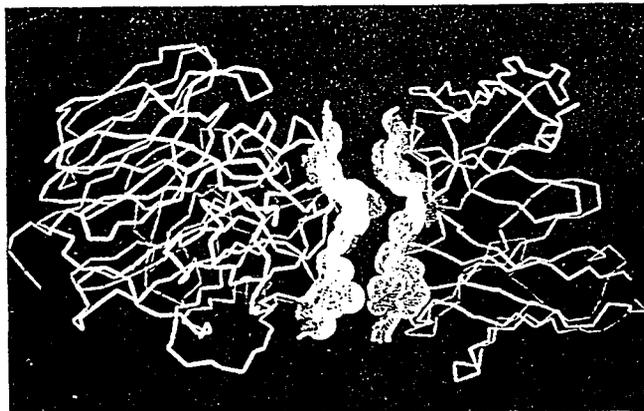


Figure 2 : L'antigène (à gauche) et l'anticorps (à droite) s'imbriquent comme deux pièces d'un puzzle. (Pour la Science. Novembre 1993)

Ainsi, un anticorps reconnaît plutôt la configuration de l'épitope que des groupements chimiques particuliers. Les anticorps sont très spécifiques et reconnaissent de petites différences dans la structure primaire d'un antigène, des différences de charge ou de conformation stérique (Berzofsky, J.A. 1985).

3 - Notions d'affinité et d'avidité

La force de liaison antigène-anticorps est appelée affinité de l'anticorps. Elle représente la somme des forces attractives et répulsives. L'anticorps avec ses quatre chaînes polypeptidiques, possède deux sites de liaison pour l'antigène. Quand un antigène multivalent se combine à plus d'un site anticorps, l'énergie de liaison qui en résulte est nettement supérieure à la somme des énergies de liaison de chacun des sites impliqués.

L'avidité désigne la force avec laquelle un anticorps multivalent se lie à un antigène multivalent.

Les anticorps reconnaissent les antigènes dans leur conformation native en solution ou présents à la surface des cellules. Tous les déterminants antigéniques reconnus par les anticorps sont situés à la surface de la protéine.

III - LES MOLECULES DE CMH

On sait depuis une vingtaine d'années que les antigènes sont présentés fragmentés aux lymphocytes T en association avec des protéines codées par le CMH. Les très nombreux gènes du CMH, appelés HLA (Human Leucocyte Antigen) chez l'homme et H2 chez la souris, sont

regroupés sur un court fragment chromosomique et sont classés en fonction des caractéristiques structurales et fonctionnelles de leurs produits (Campbell, R. et coll. 1993). La principale fonction des molécules de CMH est de présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T.

Les molécules de CMH sont divisées en deux groupes : les molécules de classe I et les molécules de classe II. L'existence de deux types de molécules CMH-I et CMH-II correspond à une spécialisation de la fonction de présentation (Unanue, E.R. et coll. 1992 - Townsend, A.R.M. et coll. 1985). En effet, chaque type de molécule est impliqué dans la capture et la présentation de peptides présents dans des compartiments cellulaires différents (Germain, R.N. et Margulies, D.H. 1993).

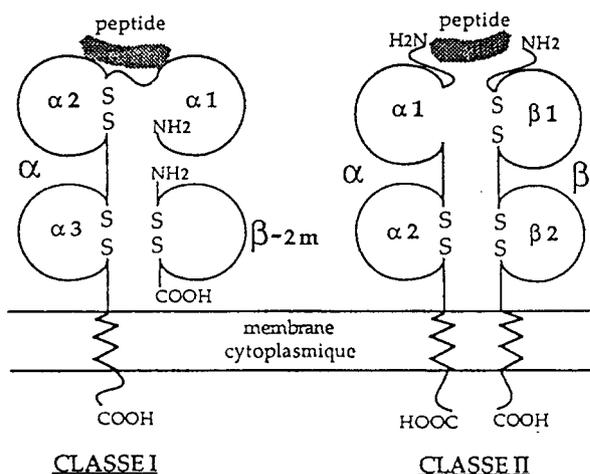


Figure 3 : Les molécules du CMH classes I et II (Biofutur. Septembre 1992).

1 - Les molécules de CMH de classe I

Les molécules de classe I ont en charge la surveillance du domaine cytosolique des cellules en présentant essentiellement les peptides rencontrés dans le réticulum endoplasmique issus de la dégradation des protéines endogènes (Braciale, T.J. 1992). Les complexes ainsi formés sont

ensuite transportés et exprimés sur la membrane cellulaire. La majorité des cellules nucléées assure cette fonction. De cette manière, les cellules infectées présentant des molécules de CMH associées à des peptides étrangers sont identifiées et détruites par des lymphocytes cytotoxiques exprimant le marqueur CD8.

a - Structure

Les molécules de classe I sont représentées à la surface de la plupart des cellules nucléées. Les gènes de classe I codent pour une glycoprotéine transmembranaire de 46kDa composée de trois domaines extracellulaires, α_1 , α_2 , α_3 (figure 3). Cette chaîne est associée de façon non covalente à la surface de la cellule avec une chaîne légère de 12kDa : la β_2 -microglobuline (Bjorkman, P.J. et Parham P. 1990). Chez l'homme, il existe 3 loci HLA de classe I : HLA-A, HLA-B et HLA-C. L'une des caractéristiques majeures des molécules du CMH est l'existence d'un important polymorphisme. Ces molécules sont dites polymorphes car elles présentent une variabilité de structure d'un individu à l'autre à l'intérieur d'une même espèce. Ainsi chaque locus peut compter jusqu'à plusieurs dizaines d'allèles différents. Dans le cas des molécules de classe I, le polymorphisme est porté par les domaines α_1 et α_2 .

L'étude cristallographique en haute résolution de plusieurs molécules de classe I a été réalisée. Les modèles des structures tridimensionnelles de plusieurs molécules de classe I ont ainsi été déterminés (HLA-A2 : Bjorkman, P.J. et coll. 1987 - Saper, M.A. et coll. 1991 ; HLA-Aw68 : Garrett, T.P.J. et coll. 1989 ; HLA-B27 : Madden, D.R. et coll. 1991 - H-2K^b : Fremont, D.H. et coll. 1992 - Zhang, W. et coll. 1992). Chacun des modèles comporte une formation particulière, au niveau des deux domaines les plus externes α_1 et α_2 qui sont structurés de façon à présenter

une cavité dont le fond est composé de 8 feuillets β anti-parallèles et les bords de 2 hélices α délimitant le sillon (figure 4). Cette structure formant un présentoir est impliquée dans la fixation des peptides et leur présentation au récepteur des lymphocytes T.

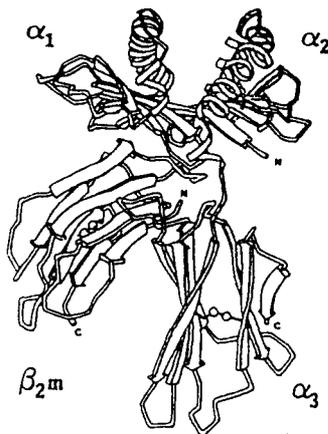


Figure 4 : Modèle tridimensionnel d'une molécule de classe I humaine (Bjorkman et coll. 1987)

b - Fixation des peptides aux molécules de CMH de classe I

Certains acides aminés conservés et polymorphes, bordant la cavité, sont impliqués dans la formation de microenvironnements que l'on appelle également poches. Six poches (A, B, C, D, E, F) ont été décrites pour toutes les molécules de classe I étudiées (Garrett, T.P.J., et coll. 1989). Ces dépressions possèdent certains caractères physicochimiques (profondeur, largeur, hydrophobicité, polarité) permettant l'ancrage des peptides. Les peptides ont une longueur de 8 à 10 acides aminés selon l'allèle étudié (figure 5). Des analyses cristallographiques ont montré que les extrémités amino et carboxy terminales du peptide sont maintenues à chaque extrémité de la cavité par deux poches, A et F respectivement, très profondes et très conservées grâce à un réseau de ponts hydrogènes permettant une liaison de forte affinité (Bouvier, M. et Wiley, D.C. 1994), et

imposant un sens de fixation du peptide au CMH (Gopalakrishnan, B. et Roques, B.P. 1992).

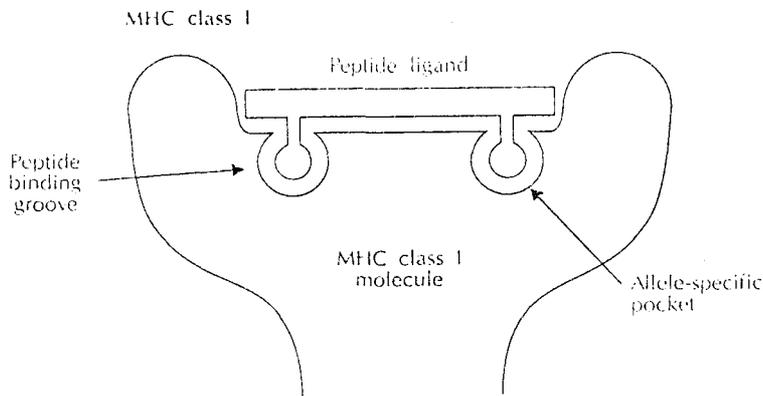


Figure 5 : Ancrage du peptide au CMH I (Rammensee et coll. 1993^a)

Une ou deux autres poches profondes et très polymorphiques, au centre de la cavité, interagissent chacune avec une chaîne latérale du peptide par complémentarité chimique et structurale, garantissant la spécificité de l'interaction (Fruci, D. et coll. 1993 - Neefjes, J.J. et coll. 1993 - Solheim, J.C. et coll. 1993 - Colbert, R.A. et coll. 1994). Des études de mutations au niveau de ces poches ont été réalisées (Parker, K.C. et coll. 1994) et montrent que ces dernières jouent un rôle essentiel dans la liaison peptide-CMH. La poche B en particulier semble influencer la stabilité de cette liaison (Yun, T.J. et coll. 1994). La chaîne latérale de l'acide aminé en position 2 du peptide se lie à la poche B. La sélectivité de cette dernière a été élucidée par la cristallisation de plusieurs molécules de classe I (Saper, M.A. 1991 - Silver, M.L. 1992 - Carreno, B.M. 1993).

La partie centrale du peptide subit moins de contraintes et peut être accommodée en fonction de sa séquence et de sa longueur en formant une protubérance hors de la cavité (figure 6), s'offrant ainsi aux interactions

directes avec le récepteur des cellules T (Fremont, D.H. et coll. 1992 - Latron F. et coll. 1992 - Parham, P. 1992 - Silver, M.L. et coll. 1992).

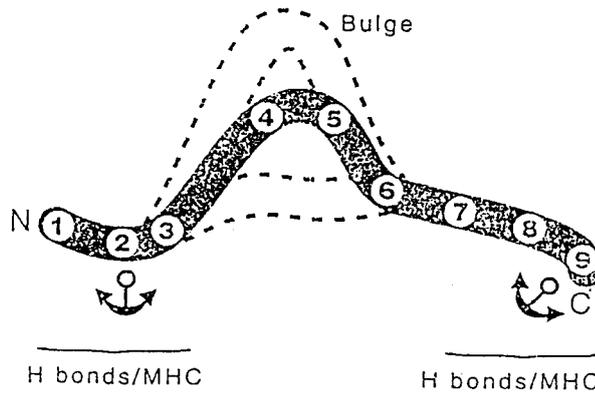


Figure 6 : Formation d'une protubérance hors de la cavité (Parham 1992).

c- Peptides antigéniques

Les peptides capables de s'associer à divers allèles de classe I ont été extensivement étudiés (Matsumura, M. et coll. 1992 - Rammensee, H.G. et coll. 1993^b - Engelhard, V.H. 1994^a, 1994^b - Kubo, R.T. et coll. 1994 - Sidney, J. et coll. 1995).

Les principes de fixation étudiés par cristallographie (Garrett, T.P.J. et coll. 1989 - Madden, D.R. et coll. 1991 - Fremont, D.H. et coll. 1992), ou par élution de peptides fixés dans la cavité (Van Bleek, G.M. et Nathenson, S.G. 1990 - Falk, K. et coll. 1991^a - Jardetsky, T.S. et coll. 1991), ont permis d'établir un modèle de l'interaction peptide-CMH de classe I (tableau 1) :

- la longueur prédominante des peptides associés à la plupart des molécules de classe I analysées est de 9 résidus (Kubo, R.T. et coll. 1994).

- des motifs conservés spécifiques d'allèles impliqués dans la liaison peptide-CMH ont été définis et appelés résidus d'ancrage (Matsumura, et coll. 1992).

L'altération des résidus d'ancrage ou de la longueur des peptides modifie considérablement l'affinité de l'interaction peptide-CMH (Cerundolo, V. et coll. 1991 - Fahnestock, M.L. et coll. 1994).

Allèles	POSITIONS									Réf.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
H-2Db					N				M	a
H-2Dd			P						F,L,I	b
H-2Kb					F,Y			M,L,I,V		c
H-2Kd		Y							I,L,V,A	d
H-2Ld		P							F,L,M	e
HLA-A2		L							V	f
HLA-A3		L,M,I							K,Y	g
HLA-A11		V,T							K	h
HLA-A68		V,T							K,R	i
HLA-B7		P	R						A,L	j
HLA-B8			K,R						L,I	k
HLA-B27		R							KRLVA	l
HLA-B35		P							Y	m
HLA-B53		P				Y				m

- a : Falk (1991^{a,b}) ; Rammensee (1993^a) ; Rötzschke (1990)
- b : Corr (1993)
- c : Saito (1993) ; Fremont (1992) ; Matsumura (1992) ; Zhang (1992) ; Falk (1991^a) ; Van Bleek (1990)
- d : Falk (1991^{a,b}) ; Rammensee (1993^a) ; Rötzschke (1990) ; Romero (1991) ; Gill (1994)
- e : Corr (1992) ; Udaka (1992) ; Reddehase (1989)
- f : Nijman (1993) ; Falk (1991^a) ; Chen (1994) ; Ruppert (1993) ; Hunt (1992^b) ; Henderson (1992) ; Morrison (1992) ; Nayersina (1993)
- g : DiBrino (1993) ; Gavioli (1995)
- h : Zhang (1993)
- i : Guo (1992) ; Silver (1992) ; Missale (1993)
- j : Huckzo (1993)
- k : Suhrbier (1993)
- l : Madden (1992) ; Parker (1994) ; Carreno (1993) ; Jardetzky (1991) ;
- m : Hill (1992)

Tableau 1 : Motifs d'ancrages des peptides aux molécules de CMH de classe I

d- Présentation de l'antigène par les molécules de CMH de classe I

Les molécules de classe I fixent essentiellement des peptides dérivés de virus, de bactéries intracellulaires ou de protéines endogènes. Le cytoplasme de la cellule apparaît être le site initial de la dégradation des structures protéiques. Les peptides issus d'une protéolyse cytoplasmique des protéines cellulaires doivent traverser la barrière membranaire du réticulum endoplasmique avant de pouvoir s'associer aux molécules de CMH de classe I (Cox, J.H. et coll. 1990 - Röttschke, O. et Falk, K. 1991 - Elliott, T. 1991 - Kovacsovics-Bankowski, M. et Rock, K.L. 1995). Cette translocation nécessite l'intervention d'un transporteur de peptides situé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Koppelman, B. et coll. 1992 - Kleijmeer, M.J. et coll. 1992). Les gènes codant pour ce transporteur ainsi que ceux codant pour un complexe protéolytique cytoplasmique appelé protéasome ont été identifiés.

Les protéines de transport membranaire appelées TAP (Transporter Associated with antigen Processing), sont insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique (Momburg, F. et coll. 1994). Elles permettent le transport du peptide du cytosol vers les molécules de CMH via un canal transmembranaire formé par dimérisation des sous-unités TAP1 et TAP2 (figure 7) (Powis, S.H. et coll. 1992 - Androlewicz, M.J. et coll. 1994). Ces protéines membranaires transportent les peptides à travers la membrane du réticulum par un mécanisme dépendant d'ATP. Les hétérodimères constitués de la chaîne lourde α , et de la β 2-microglobuline se lient à la sous-unité TAP1 avant la fixation du peptide (Ortmann, B. et coll. 1994 - Suh, W.K. et coll. 1994). Cette dernière provoque la dissociation aux protéines TAP et entraîne le transport des molécules de CMH I/peptide du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi.

Les protéasomes appelés LMP (Low Molecular Mass Polypeptides) (Robertson, M. 1991 - Martinez, C.K. et Monaco, J.J. 1991 - Glynn, R. et coll. 1991 - Goldberg, A.L. et Rock, K.L. 1992) sont constitués de deux sous-unités : LMP2 et LMP7. Ces protéines résident dans le cytosol cellulaire, mais leur rôle en tant que transporteur n'est pas encore bien défini.

Le mécanisme par lequel le complexe formé par le peptide, la chaîne α de classe I, la β_2 -microglobuline, montre une succession d'étapes décisives dans la mise à la surface de ce complexe (Pérarnau, B. et coll. 1990 - Rock, K.L. et coll. 1991 - Kozlowski, S. et coll. 1991). Une protéine de 88 kDa (chaperon) retenue dans le réticulum endoplasmique se fixe transitoirement à la chaîne α nouvellement synthétisée (Nöbner, E. et Parham, P. 1995). Elle demeure fixée jusqu'à la formation du complexe classe I- β_2 -microglobuline transitant dans le moyen Golgi (Degen, E. et coll. 1992). L'ensemble est alors stable et verrouillé pour être transporté vers la surface cellulaire. Cette protéine est libérée après la fixation de la β_2 -microglobuline sur la chaîne lourde, jouant ainsi un rôle de régulation dans le transport du complexe (Jackson, M.R. et coll. 1994). Cette libération de la molécule de 88 kDa permet au complexe CMH I/ β_2 -microglobuline d'aller se fixer sur les protéines TAP.

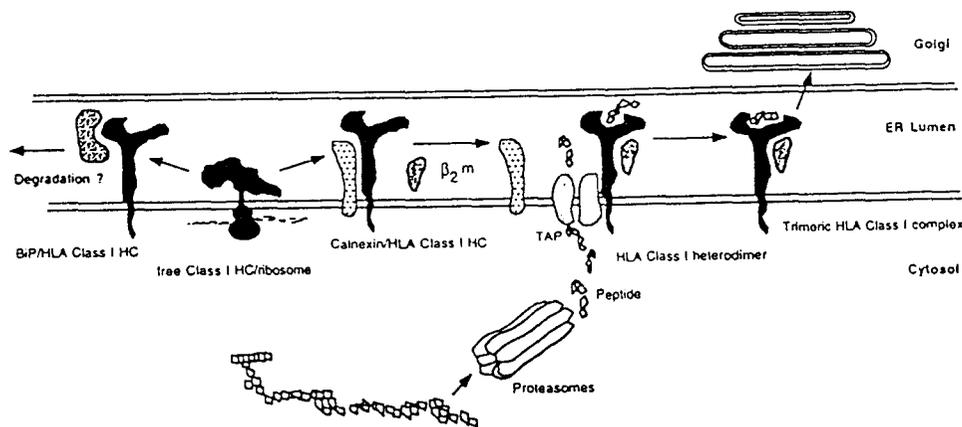


Figure 7 : Formation du complexe peptide/CMH I dans le R.E.
(Nöbner et Parham 1995)

Les peptides exogènes sont le plus souvent internalisés dans les endosomes, donc rarement présentés par les molécules de CMH I. Toutefois le couplage de l'antigène à un lipide ou son incorporation dans des liposomes permet son ciblage dans le cytosol : dans ce cas les peptides produits peuvent être transportés dans le réticulum endoplasmique et présentés par les molécules de CMH I (Rock, K.L. et coll. 1990 - Ulmer, J.B. et coll. 1994).

2 - Les molécules de CMH de classe II

Les molécules de classe II ont pour rôle de présenter essentiellement des peptides issus de la dégradation des protéines exogènes préalablement endocytées. Cette fonction est assurée par différents types cellulaires spécialisés, appelés cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, les molécules de CMH de classe II associées à un peptide antigénique sont soumises à la reconnaissance des lymphocytes T auxiliaires exprimant le marqueur CD4. Ces lymphocytes coopèrent avec les lymphocytes B pour la production d'anticorps.

a - Structure

Les gènes de classe II codent pour deux chaînes glycoprotéiques transmembranaires α et β (respectivement de 34 et 28 kDa) associées de manière non covalente. Ces chaînes α et β sont chacune divisées en deux domaines : α_1 , α_2 pour la première, et β_1 , β_2 pour la seconde (figure 3). Ces dimères sont impliqués dans la présentation d'antigènes. Le polymorphisme est porté par les domaines α_1 et β_1 qui s'associent pour

former une cavité semblable à celle des classe I (Brown, J.H. et coll. 1988 - Rothbard, J.B. 1994).

Le modèle structural des molécules de classe II a été récemment élucidé par Brown et coll. grâce à l'étude cristallographique de la molécule DR1 (figure 8) (Brown, J.H. et coll. 1993, Germain, R.N. 1993). Ces molécules agissent sous forme de dimères d'hétérodimères (Stern, L.J. et coll. 1994 - Schafer, P.H. et Pierce, S.K. 1994).

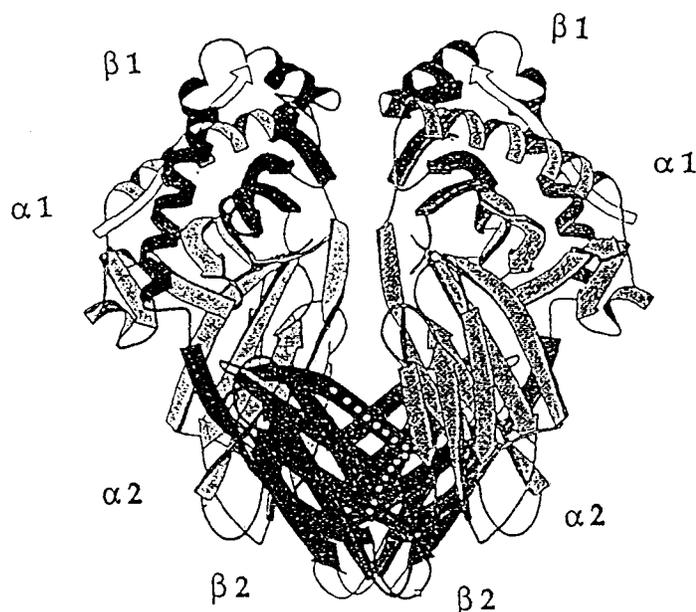


Figure 8 : Modèle tridimensionnel du "dimère de dimère" de la molécule de classe II HLA-DR1 (Brown et coll. 1993)

b - Fixation des peptides aux molécules de CMH de classe II

On retrouve comme pour les molécules de classe I un domaine extracellulaire formant une cavité polymorphe (figure 9). Toutefois, l'interaction peptide-CMH de classe II semble faire intervenir des principes différents de ceux déterminés pour les molécules de classe I (Chicz, R.M. et coll. 1992 - Hunt, D.F. et coll. 1992^a - Rudensky, A.Y. et coll. 1992 - Chicz, R.M. et coll. 1993 - Hammer, J. et coll. 1993 - Nelson, C.A. et coll. 1992).

Les peptides présentés par les molécules de classe II ont une longueur supérieure (12 à 25 acides aminés) à ceux des molécules de classe I : les

extrémités N et C terminales du peptide émergent en dehors du présentoir (figure 9). Cette caractéristique permettrait aux peptides de se présenter dans une conformation étendue. Deux voire trois acides aminés au sein de la séquence sont nécessaires à la stabilité de l'ancrage mais les poches qui les accueillent, semblent moins contraignantes.

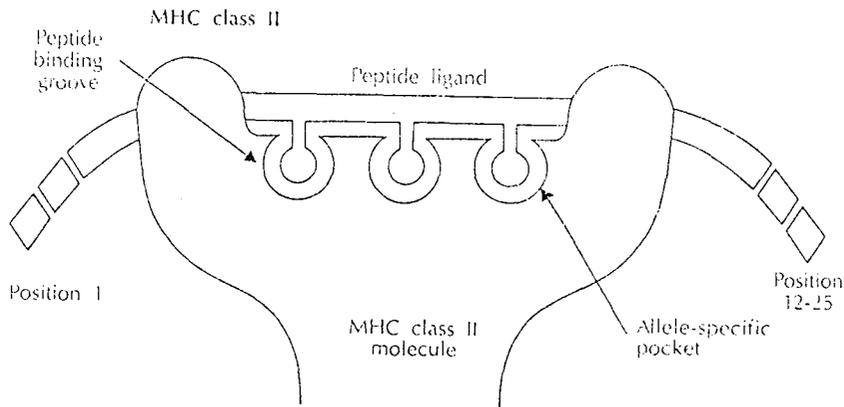


Figure 9 : Ancrage du peptide au CMH II (Rammensee et coll. 1993^a)

c - Peptides antigéniques

Des peptides liés au CMH de classe II ont été caractérisés par Gorga et coll. (1992), par élution acide suivie de chromatographie d'affinité, puis par Hunt et coll. (1992^a) par spectrométrie de masse. Les positions relatives d'ancrage ainsi que les résidus intervenant dans l'interaction peptide-CMH II ont été étudiés (Rudensky, A.Y. et coll. 1991 - Hobohm, U. et Meyerhans, A. 1993 - Hammer, J. et coll. 1994), mais les résultats ne sont pas aussi bien définis que pour les molécules de CMH de classe I. Des règles générales sur la liaison peptides-CMH II commencent cependant à être mises en évidence (Rötzschke, O. et Falk, K. 1994 - Sinigaglia, F. et Hammer, J. 1994).

La variation de longueur des peptides liés au CMH II et la difficulté de mettre en évidence les résidus d'ancrage sont dues à l'ouverture du sillon qui accueille les peptides se liant aux molécules de classe II. Le tableau 2 regroupe les différents motifs d'ancrage mis en évidence.

Allèles	POSITIONS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HLA-DR (a)	Y,F,W					A,G,T			L,M	
HLA-DR1 (b)	I,LV,Y					hydro- phobe			A,I,L,V	A,V
HLA-DR2 (c)	I,LV									K,R,H
HLA-DR3 (c, c')	F,I,L,V			D,N,QT						
HLA-DR4 (c)	F,I,L,V								N,Q,S,T	
HLADR4w4 (d)	YFWMI LV					TSVILM				
HLA-DR7 (c)	FILVY					N,S,T				
HLA-DR8 (c)	FILVY				H,K,R					
HLADR11w52 (e)		Y,F					R,K		R,K	
I-As (f)		I,V,T	T,A,S					H,R		
I-Ab (f)		N,Q						P,I		
I-Eb (f)	Y	L,V						R,K	R,H	

a : Hammer 1993 ;
b : Kropshofer 1992 ;
c : Chicz 1993 ;
c' : Geluk, A. 1994 ;

d : Sette 1993 ;
e : Newcomb 1993 ;
f : Rudensky 1992

Tableau 2 : Motifs d'ancrages des peptides aux molécules de CMH de classe II

d - Présentation de l'antigène par les molécules de CMH II

Les molécules de CMH de classe II fixent des peptides dérivés des protéines extracellulaires internalisées, c'est-à-dire des peptides exogènes provenant du compartiment vésiculaire. Les peptides sont générés au niveau du lysosome (Germain, R.N. et Hendrix, L.R. 1991).

La façon dont les molécules de CMH de classe II atteignent la voie de l'endocytose est maintenant mieux connue (Bénaroch, P. et coll. 1995). Les CMH-II sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (Cresswell, P. 1994) où les sous-unités α et β s'associent transitoirement à une chaîne invariante Ii qui jouerait un rôle de protéine chaperonne (Bertolino, P. et coll. 1991 - Anderson, et Miller, 1992 - Hämmerling, G.J. et Moreno, J. 1990 - Sant, A.J. et Miller, J. 1994 - Loss G.E. et Sant, A.J. 1993). Elle forme dans le réticulum endoplasmique un nonamère avec les chaînes α et β , constitué de 3α , 3β et $3 I_i$ (Roche, P.A. et coll. 1991 - Lamb, C.A. et Cresswell, P. 1992). La formation du nonamère ($\alpha_3\beta_3I_i_3$) permet le transport de celui-ci du réticulum endoplasmique vers les endosomes et/ou les lysosomes (West, M.A. et coll. 1994). L'interaction entre la chaîne invariante et les molécules du CMH II dans le réticulum endoplasmique a pour conséquence une inhibition de la fixation des peptides par les molécules de CMH II (Teyton, L. et coll. 1990).

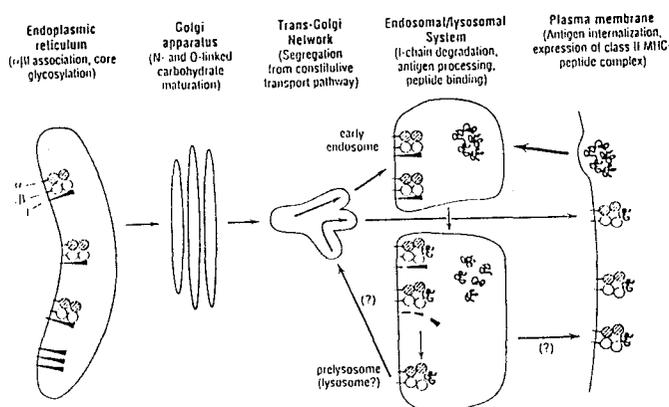


Figure 10 : Formation du complexe peptide/CMH II (Cresswell 1994).

Un segment de la chaîne invariante appelé "CLIP" (class-II-associated invariant chain peptides) semble essentiel à la fois pour l'association de Ii au CMH II et pour la fonction de chaperon dans le réticulum endoplasmique. L'interaction du peptide CLIP avec les CMH II persiste jusque dans le compartiment endosomal et inhibe la fixation des peptides antigéniques. Des études récentes (Sette, A. et coll. 1995 - Malcherek, G. et coll. 1995) ont montré que cette inhibition était due à la fixation des peptides CLIP directement dans le sillon accueillant les peptides antigéniques de classe II. Après la traversée de l'appareil de Golgi, la chaîne Ii est clivée dans le compartiment endosomal acide, ou lysosome, (Morton, P.A. et coll. 1995) permettant la liaison d'un peptide au site de la molécule de classe II (Romagnoli, P. et coll. 1993 - Roche, P.A. et Cresswell, P. 1991 - Newcomb, J.R. et Cresswell, P. 1993). Le complexe α - β -peptide, stabilisé par passage dans un compartiment à pH neutre, est alors exprimé à la membrane cellulaire (Lotteau, V. et coll. 1990 - Lamb, C.A. et Cresswell, P. 1992).

3 - Reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TcR

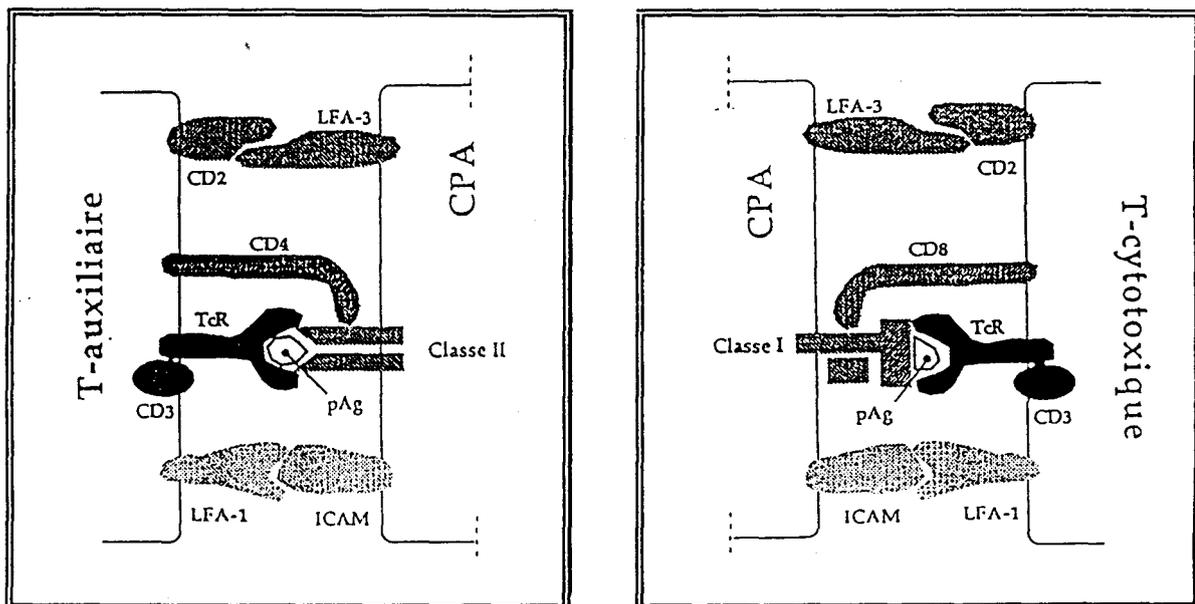


Figure 11 : Molécules impliquées dans les contacts entre CPA et TcR (Biofutur. Septembre 1992)

Une fois à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène (CPA), le complexe peptide-CMH peut être reconnu par les cellules T qui portent le récepteur spécifique de cet antigène complexé (TcR). La participation de molécules accessoires est indispensable pour renforcer l'interaction CPA/lymphocyte T ainsi que pour amplifier le signal de transduction médié par le TcR (figure 11). Chaque allèle des molécules de CMH présentant de nombreux peptides, le nombre de molécules de CMH exposant un même peptide à la surface cellulaire est de quelques centaines. Chaque cellule T exprime environ 50 000 molécules de TcR identiques. Ces observations ont conduit à proposer un modèle selon lequel le contact entre cellule T et CPA est d'abord assuré par des molécules d'adhésion non spécifiques, permettant au TcR d'explorer la surface cellulaire à la recherche de son ligand spécifique. Si celui-ci est trouvé, une redistribution des molécules de TcR et des complexes peptide-CMH conduit à l'activation de la cellule. La production de nombreuses cytokines assure la coordination des réponses entre les différents types cellulaires.

4- Conclusion

Les molécules présentatrices d'antigène de classe I et de classe II ont donc la capacité de présenter une large population de peptides différents. En effet, la spécificité de la reconnaissance ne fait intervenir que quelques résidus au sein de la séquence du peptide. Le polymorphisme allélique contribue donc, de manière capitale, au contrôle de la réponse immune en dictant les règles d'ancrage des agrétopes. Toutefois, un individu n'exprime qu'un nombre très restreint de molécules de CMH ce qui limite considérablement la capacité de faire face à la diversité des antigènes susceptibles d'être rencontrés.

Ainsi, un peptide antigénique peut engendrer une réponse immune s'il répond à deux conditions. Il doit, d'une part, posséder un agrétope permettant son interaction spécifique avec une molécule du CMH, et d'autre part, exprimer dans sa séquence un épitope pouvant être reconnu par un récepteur du répertoire des lymphocytes T.

Grâce à ces mécanismes complexes, le système immunitaire protège l'organisme contre toute espèce d'agents pathogènes. Mais dans certains cas, la réponse immunitaire peut être débordée, comme c'est le cas lors d'une infection.

L'élaboration d'un vaccin synthétisé à partir de molécules purifiées ou recombinantes nécessite la connaissance des déterminants majeurs T et B de la molécule vaccinnante et la détermination des mécanismes effecteurs pouvant être induits en réponse à cette molécule.

UTILISATION D' IMMUNOGENES PEPTIDIQUES COMME VACCINS POTENTIELS

I - RAPPELS SUR LA VACCINATION

Le principe des vaccins, découvert par Edward Jenner en 1798, consiste à inoculer dans un organisme un leurre inoffensif qui mime l'agent pathogène, pour induire une réponse immunitaire contre cet agent. Cette réponse est conservée en mémoire et protège l'organisme lors d'une infection ultérieure. Le développement de la vaccination a permis une prophylaxie efficace contre de nombreuses maladies infectieuses. Elle a par exemple permis chez l'homme l'éradication de la variole, et une lutte efficace contre la fièvre jaune, la rougeole et la rubéole. Trois types de vaccins ont été utilisés pour la prophylaxie des maladies infectieuses : les vaccins inactivés, microorganismes entiers dont l'infectivité a été détruite par la chaleur ou par traitement physique ou chimique ; les vaccins "sous-unité", fractions protéiques purifiées à partir de cultures du microorganisme ; les vaccins vivants atténués, souches vivantes rendues avirulentes par adaptation à des hôtes, à des milieux de culture nouveaux ou par sélection de mutants.

Les parasites présentent plusieurs problèmes à l'élaboration de préparations vaccinales. Tout d'abord, ils se développent chez plusieurs hôtes successifs, ce qui rend leur culture en quantité suffisante quasiment

impossible. Ensuite, des années de co-existence avec leur hôte, pendant lesquelles ce dernier a développé des réponses immunes, a permis au parasite d'établir des mécanismes d'échappement contre lesquels la vaccination n'a pas encore trouvé de solution. Cependant, l'approche vaccinale avec des peptides synthétiques a récemment ouvert la voie à des vaccins anti-parasitaires.

Le recours aux peptides immunogéniques de synthèse évite les inconvénients provoqués par les microorganismes ou leurs produits directs. Les vaccins peptidiques permettraient une production à large échelle reproductible et précise, ainsi que l'association dans une seule préparation vaccinale d'un grand nombre de peptides. Les nombreux travaux réalisés ces dernières années montrent que les immunogènes de synthèse peuvent dans certains cas être utilisés avec succès pour l'obtention d'une immunité protectrice (Lerner, R.A. 1982 - Arnon, R. 1986). Cette dernière peut être de type cellulaire (Taïbi, A. et coll. 1993 - Darcy, F. et coll. 1992 - Rouaix, F. et coll. 1994^a) ou humoral (Xu, C.B. et coll. 1993 - Pancré, V. et coll. 1994).

II - VACCINATION A L'AIDE DE PEPTIDES SYNTHETIQUES

Si la réaction "protectrice" est majoritairement dirigée contre certains antigènes, voire certaines parties de ces molécules, pourquoi ne pas concevoir des vaccins qui ne présenteraient que ces "antigènes protecteurs"?

1 - Conception

Dans une protéine vaccinnante, la région de la surface moléculaire qui interagit directement avec le site complémentaire de l'anticorps est nommée épitope. Chaque antigène possède autant d'épitopes qu'il existe d'anticorps spécifiques différents qui le reconnaissent.

La conception de vaccins synthétiques par synthèse peptidique, commence par la caractérisation des épitopes B, c'est-à-dire induisant des anticorps neutralisants et des épitopes T, reconnus par les cellules T. A ce jour, il est encore bien difficile de prévoir la structure des épitopes B, qui peuvent être linéaires, c'est-à-dire constitués de l'enchaînement primaire des acides aminés, ou conformationnels, dans le cas où l'épitope résulte de l'interaction de parties éloignées de la protéine, rapprochées dans la conformation spatiale adoptée par la molécule. En revanche, il paraît clair que les épitopes T sont linéaires.

2 - Immunogénicité

Les vaccins peptidiques synthétiques ont souvent une immunogénicité beaucoup plus faible que leur équivalent naturel. Les problèmes rencontrés, liés à la perte d'immunogénicité ont montré qu'une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de la réponse immune était indispensable. En particulier, les recherches futures en vaccinologie pourront être centrées sur la compréhension des modalités de la présentation de l'antigène. Un vaccin peptidique synthétique devra quant à lui comporter les éléments nécessaires à l'activation des cellules B, et des cellules T auxiliaires, nécessaires à l'amplification de la réponse.

Un adjuvant, peut contribuer à augmenter la réponse immunitaire. Malheureusement, le seul adjuvant acceptable pour l'homme, à base d'hydroxyde d'aluminium (ALUN), s'avère souvent faiblement actif. Il reste cependant pour les vaccins humains, l'un des adjuvants les plus utilisés. Les solutions bactériennes, dont les effets sont plus puissants, sont peu utilisées chez l'homme en raison des réactions secondaires qu'elles occasionnent. De même, des émulsions d'huile et de bacilles tuberculiniques tués constituant l'adjuvant de Freund, le plus puissant des adjuvants connus, sont toutefois inutilisables pour les vaccins humains. L'un des principaux objectifs, pour l'amélioration des vaccins, est la recherche d'adjuvants qui seraient à la fois efficaces et dépourvus de ces effets. C'est la raison pour laquelle, de nombreux adjuvants à base d'émulsions lipidiques sont aujourd'hui testés pour tenter d'augmenter la réponse immune. Des résultats satisfaisants ont été obtenus lors du couplage d'une ou plusieurs molécules d'acide palmitique sur un peptide antigénique (Schild, H. et coll. 1991 - Robinson, J.H. et coll. 1992 - Rouaix, F. et coll. 1994^b - Borges, E. et coll. 1994). D'autres formulations pour éviter les désagréments d'un adjuvant seraient la vaccination par voie orale ou la dégradation de peptides pour améliorer leur reconnaissance par le système immunitaire.

3 - Principe

Une réponse anticorps efficace contre un antigène donné nécessite une coopération cellulaire entre lymphocytes B et lymphocytes T. La présence d'une séquence reconnue spécifiquement par la cellule T est donc indispensable. Cette reconnaissance se fait dans le contexte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, dont l'ensemble des molécules

présentes à la surface des cellules constitue l'haplotype. Le principe même de la vaccination est de protéger le plus grand nombre possible d'individus, c'est-à-dire d'être efficace dans le plus grand nombre possible d'haplotypes différents. Ces arguments ont considérablement limités le développement des vaccins synthétiques.

Les vaccinologues ont tenté de remplacer l'antigène par son épitope dominant, c'est-à-dire celui contre lequel le système immunitaire réagit le plus. L'immunisation est réalisée avec l'antigène ou l'épitope sous forme libre. Dans ce cas, une bonne présentation par les cellules présentatrices de l'antigène apparaît liée aux propriétés de la protéine (taille, charge, hydrophobicité). Il semble important que les peptides synthétiques ne soient pas constitués exclusivement de la séquence de l'épitope reconnu par les cellules T. En fait, quelques acides aminés de part et d'autres de cette séquence permettent aux protéases d'ajuster la taille du peptide pour qu'il soit correctement adapté à la "niche" dans laquelle il va s'associer avec la molécule de CMH pour être présenté à la cellule T.

La formulation d'un vaccin synthétique reste difficile à mettre en œuvre par le fait qu'une réaction immunitaire caractérisée par la libération d'anticorps nécessite la participation des deux types de lymphocytes (B et T), dont les mécanismes de reconnaissance sont comme nous l'avons déjà vu très différents.

III - CRITERES POUR LA SELECTION D'IMMUNOGENES PEPTIDIQUES

Pour obtenir des peptides susceptibles d'induire une immunité protectrice, il convient de déterminer au sein d'une protéine les séquences qui ont le plus de chances d'induire des anticorps capables de reconnaître et de neutraliser la protéine native. Plusieurs critères ont été proposés pour déterminer ces séquences au sein d'une protéine, afin d'éviter la synthèse indiscriminée d'un très grand nombre de peptides. On peut distinguer d'une part des méthodes basées sur des critères d'antigénicité qui permettent la sélection de peptides induisant des anticorps qui reconnaissent la protéine entière. Et d'autre part, des critères d'immunogénicité qui aideront à sélectionner un peptide capable d'induire une réponse anticorps, ce qui est très important si l'on veut éviter l'emploi de molécules porteuses ou d'adjuvant.

L'immunogénicité représente la capacité d'un peptide à induire une réponse immunitaire, alors que l'antigénicité représente sa capacité à être reconnu par les produits de la réponse immunitaire (humorale ou cellulaire) (Benjamin, E.D.C. et coll. 1984).

1 - Critères pour la sélection de séquences antigéniques

Les principaux critères pour la reconnaissance d'une protéine entière par un immunogène synthétique sont, la localisation de la séquence à la surface de la protéine, la mobilité de la séquence, et sa conformation au sein de la protéine.

a - Localisation en surface

Des séquences situées à la surface de la protéine, donc facilement accessibles aux anticorps, seront plus aisément reconnues par des anticorps induits par un peptide issu de cette protéine. Il faut donc prendre en compte les caractères d'hydrophilie et d'accessibilité.

α - L'hydrophilie

Il est généralement admis que les résidus hydrophiles sont principalement localisés à la surface de la protéine qui se trouve en contact avec le milieu aqueux environnant, tandis que les résidus hydrophobes sont enfouis à l'intérieur de la protéine. Hopp et Woods (1981) ont montré que les séquences situées dans des régions fortement hydrophiles sont plus accessibles aux anticorps. Ils ont établi une méthode qui utilise les facteurs d'hydrophilie proposés par Levitt (Levitt, M. 1976). L'étude est réalisée sur des hexapeptides, et à chaque hexapeptide est attribuée une valeur d'hydrophilie correspondant à la moyenne des facteurs d'hydrophilie des 6 acides aminés qui le constituent. Cette méthode appliquée à l'étude des sites antigéniques de 12 protéines connues a montré que les régions de plus grande hydrophilie correspondent à des sites antigéniques connus (Hopp, T.P. et Woods, K.R. 1981). Mais Tanaka, T. et coll. (1985) ont remarqué qu'un taux de succès de 56% seulement est reporté dans la littérature lorsque la méthode de Hopp et Woods est utilisée pour le choix de séquences immunogéniques. De plus une étude de Tainer, J.A. et coll. (1984) a révélé une corrélation assez mauvaise entre hydrophilie et antigénicité.

La méthode de prédiction de Hopp et Woods modifiée par Fraga, S. (1982) ajoute à la notion d'hydrophilie les possibilités d'interactions des acides aminés entre eux. Cette méthode procure une meilleure corrélation entre les sites antigéniques prédits et ceux observés.

β – L'accessibilité

Chothia, C. (1976) a proposé une méthode prédisant l'accessibilité des segments peptidiques en utilisant des paramètres établis à partir de l'étude du nombre de résidus enfouis et exposés pour des protéines globulaires de structure tridimensionnelle connue. Plus tard, Novotny, J. (1986) a montré avec des protéines de structure tridimensionnelle connue qu'il existe une bonne corrélation entre l'accessibilité des séquences à une sphère de 1 nm de rayon (reproduisant la taille du site anticorps) et leur antigénicité.

b - Mobilité de la chaîne protéique

Une corrélation entre la mobilité de la chaîne protéique et l'antigénicité est observée (Westhof, E. et coll. 1984 - Tainer, J.A. et coll. 1984). Les segments mobiles des protéines pourraient en effet être de bonnes cibles pour les anticorps anti-peptide. Ces segments inclus dans une protéine pourraient adopter différentes conformations, augmentant ainsi la probabilité d'être reconnus par les anticorps.

Pour Novotny, J. (1986), la corrélation entre antigénicité et accessibilité est meilleure que celle entre antigénicité et mobilité, et propose que l'antigénicité des segments mobiles est seulement liée à leur exposition à la surface de la protéine.

c - Conformation de la séquence.

Un épitope séquentiel correspond à une séquence de plusieurs résidus sans repliement dans l'espace, tandis que dans un épitope conformationnel, les résidus sont amenés au voisinage les uns des autres grâce à des interactions de type secondaire, tertiaire, et quaternaire, maintenant ainsi la séquence dans une conformation particulière (Sela, M. 1969). Même si plusieurs déterminants séquentiels ont été mis en évidence,

de nombreux travaux suggèrent que la plupart des déterminants sont discontinus (Atassi, M.Z. 1975 - Benjamin, E.D.C. et coll. 1984). De plus, il semble souhaitable qu'une séquence immunogénique adopte la conformation qui est la sienne dans la molécule intacte. Schulze-Gahmen, U. et coll. (1986) ont montré que des anticorps induits contre une séquence de l'hémagglutinine formant un coude β ne reconnaissent pas la séquence quand elle est linéaire et flexible. Ceci montre l'importance de la conformation d'une séquence protéique pour sa reconnaissance par les anticorps. Parmi les nombreuses méthodes de prédiction de conformation, celle de Chou, P.Y. et Fasman, G.D. (1974) est une des plus utilisée. Elle permet de prévoir la probabilité pour une séquence donnée de s'organiser en hélice α , en feuillet β , ou de former un coude β . Les renseignements donnés par cette méthode peuvent être utilisés de différentes façons.

Ainsi, il est possible d'éviter les régions ayant de fortes probabilités de s'organiser en feuillets β , car cette conformation est difficile à reproduire avec un petit peptide. Novotny, J. (1986^b) a montré que les régions organisées en feuillets β sont faiblement immunogéniques, même si elles sont localisées en surface de la protéine.

En revanche, il peut être intéressant de rechercher des régions présentant des coudes β ou des hélices α , qui peuvent être plus facilement reproduites par des petits peptides. L'intérêt des hélices α amphipathiques pour l'immunogénicité des peptides sera examiné plus loin.

Enfin, on pourra rechercher des régions sans conformation préférentielle, si l'on suppose que de telles régions sont plus flexibles et donc mieux reconnues par les anticorps anti-peptide.

2 - Critères d'immunogénicité :

Sélection de séquences induisant une réponse anticorps

a - Taille d'un peptide immunogénique

Des travaux réalisés sur des peptides non couplés administrés en présence d'adjuvant montrent que même si un peptide de 6 à 8 acides aminés est capable d'entraîner une réponse anticorps (Atassi, Z. et Young, C.R. 1985 - Friedrich, U. et coll. 1986), les séquences de 12 à 18 acides aminés sont plus fréquemment immunogéniques (Singh, B. et coll. 1980).

b - Reconnaissance du peptide par le système immunitaire de l'hôte

Pour qu'un antigène soit immunogénique sans l'aide d'une molécule porteuse, il doit contenir des épitopes capables de stimuler la réponse des lymphocytes T.

DeLisi, C. et Berzofsky, J.A. (1985) suggèrent que les épitopes reconnus par les lymphocytes T sont des structures amphipathiques, ou amphiphiles, induites et stabilisées par des interactions avec les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de l'hôte. Les épitopes T, constitués de résidus polaires, se situeraient sur une face de cette hélice amphiphile, tandis que l'autre face serait constituée par des résidus hydrophobes interagissant avec les antigènes d'histocompatibilité présents sur la membrane des macrophages. La dégradation des protéines par les macrophages aurait pour but la destruction de la conformation repliée de la protéine pour que les résidus hydrophobes enfouis puissent être exposés et interagir avec les antigènes d'histocompatibilité (DeLisi, C. et Berzofsky, J.A. 1985). La sélection de peptides contenant l'information nécessaire pour s'organiser en hélices amphiphiles pourrait donc favoriser leur immunogénicité. La détermination des séquences amphiphiles peut être réalisée par la méthode de Kaiser, E.T. et Kezdy, F.J. (1984), ou par celle d'Eisenberg, D. et coll. (1982).

Des peptides différents peuvent se lier à une même molécule d'histocompatibilité (Guillet, J.G. et coll. 1986), qui possède un site de liaison avec une large spécificité (Buus, S. et coll. 1987 - Sette, A. et coll. 1987). Cette constatation vient à l'appui de l'hypothèse de Rothbard (1986) qui a proposé que différents épitopes T contiennent une séquence primaire de structure comparable. Cette méthode a permis à Rothbard de prédire certains épitopes T (Rothbard, J.B. et Taylor, W.R. 1988).

Lorsque l'immunogène est une protéine homologue d'une protéine de l'hôte, les anticorps sont dirigés préférentiellement vers les sites différents dans la séquence des deux protéines (Benjamin, E.T.C. et coll. 1984).

IV - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE

1 - Principe

La synthèse des peptides s'effectue par le couplage d'une fonction α aminée d'un acide aminé sur la fonction α carboxylique de l'acide aminé suivant. La synthèse est réalisée en phase solide selon la méthode de Merrifield (1963). Le premier acide aminé de la chaîne dont la fonction α aminée est bloquée par un groupement semi-permanent, est ancré par sa fonction carboxylique sur une résine insoluble. L'élimination de ce groupement protecteur régénère l'amine qui va pouvoir réagir avec le deuxième acide aminé de la séquence. L'élongation du peptide se fait ensuite par répétition de ces différentes étapes de déprotection et de couplage (figure 12).

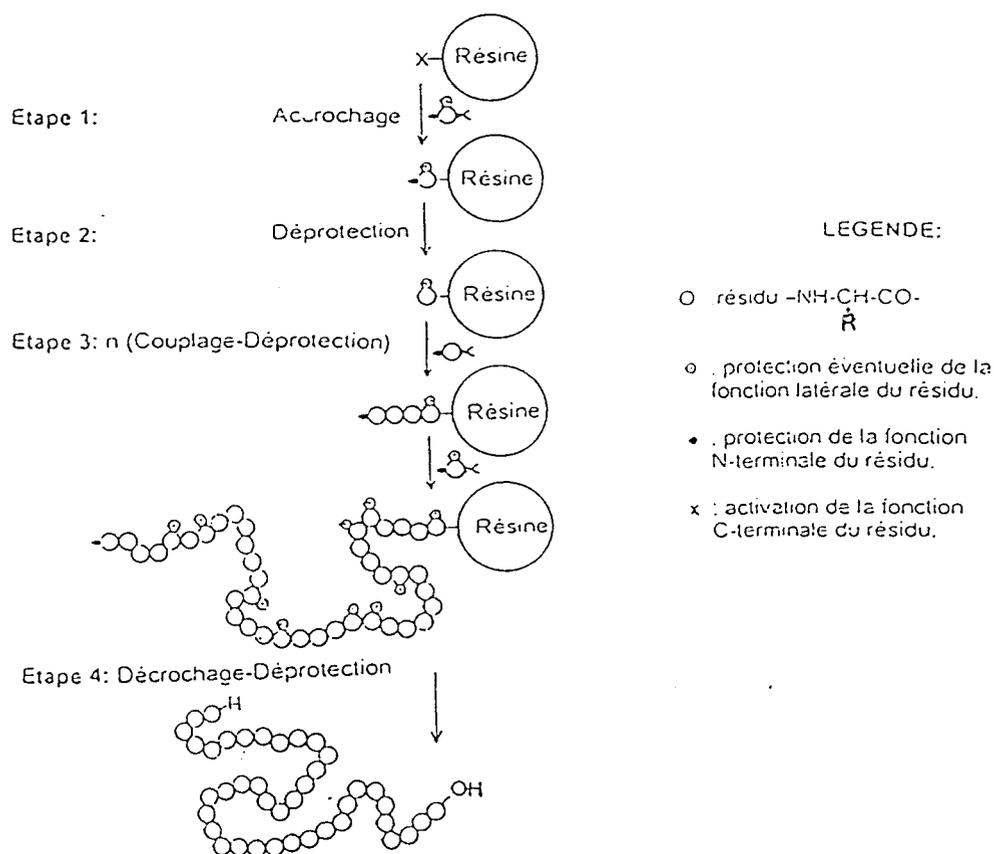


Figure 12 : Schéma générale de la synthèse peptidique en phase solide

L'addition des acides aminés est effectuée de la partie C-terminale vers la partie N-terminale, dans l'ordre inverse de la séquence biologique, afin d'éviter les racémisations. Pendant toute la durée de la synthèse les fonctions réactives des chaînes latérales sont protégées par des groupements permanents, qui seront éliminés lors du clivage peptide-résine.

2 - Le support

Le support utilisé est une résine obtenue par copolymérisation de styrène réticulé avec 1% de divinylbenzène, qui réunit les trois propriétés requises :

- bonne résistance à l'abrasion

- insolubilité et gonflement satisfaisant dans les solvants de synthèse (chlorure de méthylène (DCM) et N-méthylpyrrolidone (NMP))
- porosité suffisante pour permettre le contact entre les réactifs et le peptide en élévation.

Les noyaux benzéniques de la résine sont fonctionnalisés afin d'ancrer par liaison covalente le premier acide aminé de la chaîne. Nous avons utilisé pendant notre étude trois types de résine. Une résine de type méthylbenzhydrylamine (MBHA) qui fournit après clivage, des peptides dont la fonction C-terminale est sous forme carboxamide.

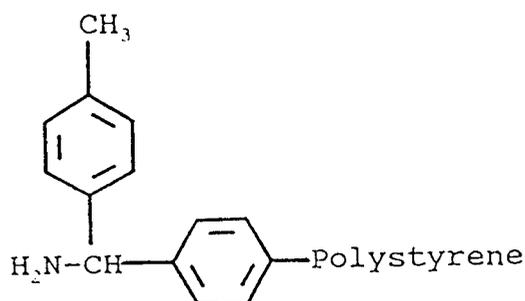


Figure 13 : Résine MBHA

Un autre type de résine que nous avons utilisé est une résine phénylacétamidométhyle (PAM). Le clivage du peptide de la résine permet d'obtenir des peptides dont l'extrémité C-terminale est sous forme carboxylique.

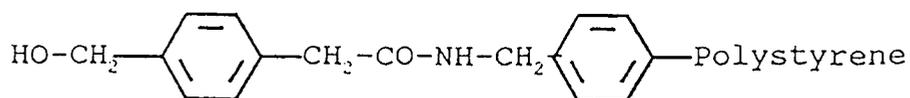


Figure 14 : Résine PAM

Enfin nous avons utilisé une résine aminométhyle qui fixe la chaîne peptidique en élongation par une liaison amide. Cette résine reste couplée au peptide après coupure HF.

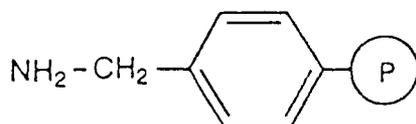


Figure 15 : Résine aminométhyle

La capacité de fixation de la résine est exprimée en mEq/g. Elle est quantifiée par un test de Kaiser quantitatif (dosage des fonctions amines primaires). Sa connaissance permet d'évaluer la quantité de réactifs à utiliser et le poids de peptide attendu.

3 - Protection des acides aminés

a - Fonction α -aminée

Pour éviter les réactions secondaires lors du couplage, la fonction α -aminée des acides aminés est protégée par un groupement semi-permanent. Le groupe protecteur choisi pour notre stratégie est le tertibutyloxy-carbonyl (tBoc). Il fournit une fonction uréthane sensible aux acides forts.

b - Chaînes latérales

Les fonctions réactives des chaînes latérales sont protégées par des groupements permanents, qui ne seront éliminés qu'en fin de synthèse. Les différents groupements protecteurs utilisés lors de nos synthèses sont

regroupés dans le tableau 3. Le choix de certains groupements a été orienté en fonction de la séquence synthétisée.

Acides aminés	Groupements protecteurs
Acide aspartique	Ester de cyclohexyle ou benzylique
Acide glutamique	Ester de cyclohexyle ou benzylique
Lysine	Chloro-2-benzyloxycarbone Fluorényl-9-méthoxycarbonyl (Fmoc)
Arginine	Paratoluène sulfonyl (tosyle)
Sérine	Ether benzylique
Thréonine	Ether benzylique
Histidine	Dinitrophényle (DNP)

Tableau 3 : Groupements protecteurs des chaînes latérales

4 - Synthèse

a - Fixation du premier acide aminé

Dans le cas d'une résine MBHA l'ancrage du premier acide aminé est assuré par une liaison amide. Pour une résine PAM, le premier acide aminé est déjà fixé, il suffit d'accrocher l'acide aminé suivant. La fixation du premier acide aminé est donc identique à celle d'un couplage classique entre deux acides aminés. Avant la réaction, on s'assure par un traitement à la diisopropyléthylamine (DIEA) que les fonctions amines primaires ne sont pas ionisées.

b - Elongation de la chaîne

L'élongation de la chaîne s'effectue en deux étapes qui seront répétées autant de fois qu'il y a d'acides aminés à greffer.

α - Déprotection

La première étape consiste à éliminer le groupement tBoc de l'acide aminé présent sur la résine. Le réactif utilisé est l'acide trifluoroacétique (TFA) à 50% dans le chlorure de méthylène. Après élimination du TFA les fonctions amines sont déprotonées par action de la DIEA à 5%.

β - Couplage

Les acides aminés sont activés par couplage à la dicyclohexylcarbodiimide (DCC). L'addition de la DCC sur la fonction carboxylique de l'acide aminé conduit à la formation d'un intermédiaire O-acyl-iso-urée (figure 16). Ce dernier réagit avec la fonction amine libre de la chaîne peptidique pour former d'une part la liaison peptidique, et d'autre part un sous-produit de la réaction : la dicyclohexylurée (DCU).

Cependant le composé intermédiaire réactif (O-acyl-iso-urée) peut évoluer en un composé inactif la N-acylurée. La formation de ce composé qui entre en compétition avec la réaction de couplage est lente, en particulier lorsqu'un des acides aminés impliqués dans la réaction est fortement encombré. La transformation rapide de l'O-acyl-iso-urée en un deuxième composé réactif limite l'intervention de cette réaction parasite. Pour cela on utilise la formation d'un ester d'hydroxybenzotriazole (HOBt).

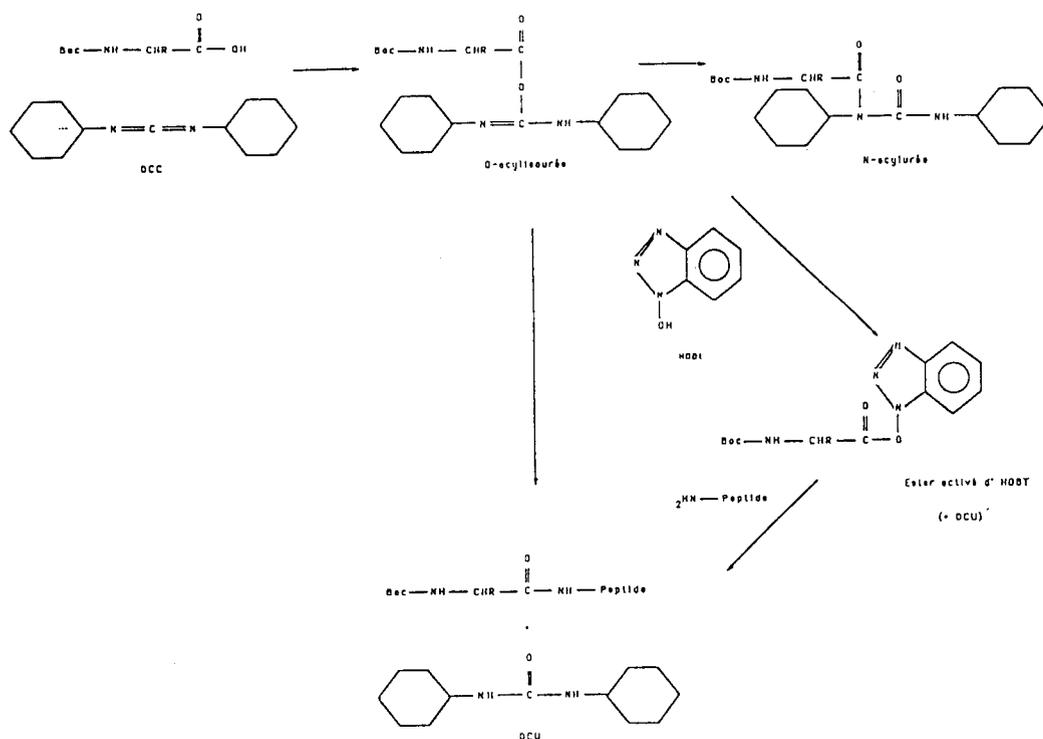


Figure 16 : Mécanisme de couplage des acides aminés par la DCC

5 - Elimination de la résine et déprotection des chaînes latérales

Le peptide est séparé de la résine par action de l'acide fluorhydrique anhydre (HF), qui réalise simultanément la déprotection des chaînes latérales et de la fonction N terminale (tBoc). Cette réaction est effectuée en présence de para-crésol et de parathiocrésol qui piègent les carbocations provenant de l'acidolyse des groupements protecteurs. Pour les peptides contenant une méthionine ou une cystéine, très sensibles à l'alkylation et à l'oxydation, le groupement tBoc de la fonction N-terminale est éliminé préalablement et le milieu réactionnel de coupure à l'HF est additionné de diméthylsulfure.

Après coupure, les peptides sont isolés de la résine par une précipitation TFA/éther. Ils sont ensuite récupérés par des solutions d'acide acétique adaptée à la solubilité de chaque peptide.

6 - Purification et contrôles

a - Introduction

La synthèse peptidique en phase solide s'effectue sans purification intermédiaire. Bien que les tests effectués après couplage et déprotection soient assez sensibles, on ne peut s'assurer que chaque réaction soit totale. Les sous-produits de synthèse sont principalement :

- des peptides tronqués dont l'élongation a été, volontairement (acétylation) ou non, stoppée.
- des peptides à délétion correspondant à une déprotection ou un couplage incomplets, et dont la séquence est privée d'un ou plusieurs acides aminés.
- des peptides branchés issus d'une mauvaise protection des chaînes latérales.
- des peptides provenant de réactions secondaires induites par les réactifs lors des déprotections ou de la coupure finale au fluorure d'hydrogène.

Généralement ces peptides non désirés ne sont pas en très grande quantité, mais ils doivent être séparés du peptide principal pour obtenir un degré de pureté important. De plus des traces de crésol ou de diméthylfulfure peuvent subsister.

Les peptides subissent différentes étapes de contrôle et de purification qui s'échelonnent selon l'ordre suivant :

- Analyse d'acides aminés qui met en évidence une éventuelle aberration dans la composition du peptide : excès ou absence d'un acide aminé.
- Analyse du peptide brut par chromatographie liquide haute pression (CLHP) en phase inverse analytique, qui nous indique la proportion de peptide désiré dans le mélange peptidique.
- Purification par CLHP en phase inverse préparative
- Contrôle par CLHP analytique du degré de pureté du peptide.

- Confirmation de l'identité du peptide par analyse d'acides aminés et spectrométrie de masse.

b - Technique de purification : CLHP préparative en phase inverse

Dans la CLHP en phase inverse, la phase stationnaire est moins polaire que la phase mobile. Les supports utilisés sont des billes de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes hydrocarbonées (4 ou 18 carbones). L'éluant est constitué d'un gradient de solvants aqueux et organiques. Les solvants d'élution sont choisis en fonction de leur viscosité, leur hydrophilie, et leur capacité à solubiliser les échantillons. Les molécules sont séparées en fonction de leur affinité vis à vis des phases stationnaire et mobile, leur temps de rétention augmente avec leur caractère hydrophobe.

Les peptides sont élués par un gradient de concentration croissant en acétonitrile maintenu à pH acide par l'acide trifluoroacétique. Cet acide volatile sera facilement éliminé par lyophilisation. L'éluat est détecté par spectrophotométrie ultraviolette. Le coefficient d'extinction molaire de la liaison peptidique est maximum au voisinage de 215nm, celui des dérivés aromatiques à 254nm pour la phénylalanine et 280nm pour la tyrosine et le tryptophane.

c - Contrôles

α - CLHP analytique en phase inverse

Le principe est identique à celui de la CLHP préparative, la différence provient des quantités d'échantillon injectées, d'où l'utilisation de colonnes de taille inférieure. Le mélange solvant est acidifié par du trifluoroacétate (TFA). En effet les contre-ions TFA ou chlorhydrates qui se positionnent au niveau des charges positives de la molécule augmente l'interaction avec les chaînons hydrophobes de la phase stationnaire, et

donc le temps de rétention des peptides hydrophiles. Le degré de pureté d'un peptide est évalué en intégrant la surface du pic correspondant, à la longueur d'onde la plus sensible, 215 nm.

β - Analyse d'acides aminés

L'analyse d'acides aminés est réalisée après hydrolyse acide totale des peptides traités par l'HCl 6N, à 110°C sous vide en présence de phénol. Ce dernier sert à protéger les tyrosines, sérines et thréonines de l'oxydation. Le mélange d'acides aminés obtenu est passé sur un analyseur Beckman. Les acides aminés sont séparés par passage sur une colonne échangeuse d'ions, révélés par couplage à la ninhydrine en sortie de colonne, puis dosé par colorimétrie. Les pics obtenus sont identifiés par leur temps de rétention par rapport à un standard. Un étalon interne permet de vérifier la qualité de l'injection, du déroulement du gradient et de l'analyse.

Les conditions d'hydrolyse transforment l'asparagine et la glutamine en acides correspondants. Certains acides aminés sont altérés, la sérine et la thréonine ne sont retrouvées que dans une proportion de 80%, le tryptophane n'est pas détectable.

γ - Spectrométrie de masse

Les spectres de masse sont enregistrés sur un spectromètre de masse à temps de vol et desorption de plasma BIO-ION 20. Les spectres sont accumulés pendant 10^6 coups d'une source de Californium 252 qui se décompose en Technicium 106 et Baryum 142. Les ions formés sont accélérés grâce à une différence de potentiel de 15KeV et séparés dans un tube où règne le vide. La solution peptidique est déposée sur un foil (cible de Mylar aluminisée) préalablement recouvert de nitrocellulose.

LA BILHARZIOSE

I - GENERALITES SUR LA BILHARZIOSE

Le parasitisme est une étape vers l'adaptation plus ou moins parfaite entre deux espèces, résultant d'une balance complexe, dynamique et finement élaborée. La capacité de s'accomoder ou résister à l'invasion d'organismes parasites a fait l'objet d'une très grande pression sélective au cours de l'évolution. Elle détermine en effet le succès de la survie de l'espèce parasitée.

L'évolution simultanée du parasite et de son hôte aboutissant à une association compatible avec la survie des deux partenaires, est la clé du maintien des affections parasitaires au cours du temps, et ceci depuis des milliers d'années.

Les relations qu'entretiennent les bilharzies, ou schistosomes, avec leurs hôtes, l'homme en particulier, sont la démonstration d'une adaptation quasi-parfaite. En effet, cette association existait déjà dans l'Ancienne Egypte comme le mentionne le célèbre papyrus d'Eber (1500 ans avant J.C.). Plus de 3000 ans se sont écoulés et les infections par les schistosomes sont encore très répandues et sont responsables de maladies très graves de l'homme et du bétail.

1 - Qu'est-ce que la bilharziose ?

En 1852 Thomas Bilharz, pathologiste allemand travaillant au Caire, décrit *Schistosoma haematobium*, agent d'une bilharziose uro-génitale. Au début du siècle, en 1904, Manson décrit *Schistosoma mansoni*, agent d'une bilharziose intestinale et parfois hépato-splénique. A la même époque, Katsurada, au Japon, découvre *Schistosoma japonicum* qui provoque une bilharziose intestinale pouvant être suivie de complications artérioveineuses. Quant à *Schistosoma intercalum*, il est responsable d'une bilharziose rectale et génitale, et a été individualisé pour la première fois au Zaïre en 1934 par Fisher.

La bilharziose, ou schistosomiase, est une infection parasitaire à transmission aquatique affectant l'homme et certains animaux. C'est la deuxième grande endémie parasitaire après le paludisme. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, cette maladie frappe environ 300 millions de personnes, et elle entraîne 500 000 décès chaque année, dans 79 pays en voie de développement, principalement dans les régions tropicales et sub-tropicales. A ce nombre déjà considérable de personnes infectées, s'ajoute celui de 600 millions d'individus exposés au parasite.

Les schistosomiasés constituent un complexe d'infections parasitaires acquises par l'homme dans toute une gamme d'habitats d'eaux douces. Elles sont transmises par certains mollusques aquatiques, mais l'homme, comme le mollusque, est responsable de la diffusion de la maladie. Un des facteurs de la contamination de l'environnement est le manque d'hygiène des populations. En fait, les êtres humains contractent la maladie par leurs contacts avec une eau douce contaminée lorsqu'ils s'adonnent à l'agriculture, la pêche, à des activités ménagères ou ludiques.

Les schistosomes, ou bilharzies, sont des vers plats munis de ventouses qui se développent successivement chez deux hôtes. Ils vivent dans le système circulatoire et se nourrissent du sang de leur hôte définitif. Plusieurs espèces sont nuisibles pour l'homme : *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* et *Schistosoma intercalum* qui donnent des maladies différentes.

2 - Fiche signalétique des schistosomes

<u>Embranchement</u>	: plathelminthes (vers plats non segmentés)
<u>Classe</u>	: trématodes (appareil digestif avec caecum)
<u>Sous-classe</u>	: digènes (deux hôtes)
<u>Ordre</u>	: distomes (2 ventouses : buccale et ventrale)
<u>Sous-ordre</u>	: Schistosomoïdea (sexes séparés)
<u>Famille</u>	: Schistosomatidae (furcocercaires libres)
<u>Genre</u>	: <i>Schistosoma</i> (hôte définitif mammifère)

3 - Le cycle biologique

La connaissance schématique du cycle (figure 17) est essentielle car elle permet de comprendre le mode d'infestation, les phases évolutives de la maladie, et d'en déduire des notions prophylactiques.

Les schistosomes se développent successivement chez deux hôtes. L'hôte intermédiaire est un mollusque d'eau douce et l'hôte définitif est en général l'homme, mais peut être un bovin. Pour les quatre principales espèces infectant l'homme (*Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalum*, et *Schistosoma haematobium*), le mollusque est spécifique (respectivement : *Biomphalaria*, *Oncomelania*, et *Bulinus* pour les deux derniers).

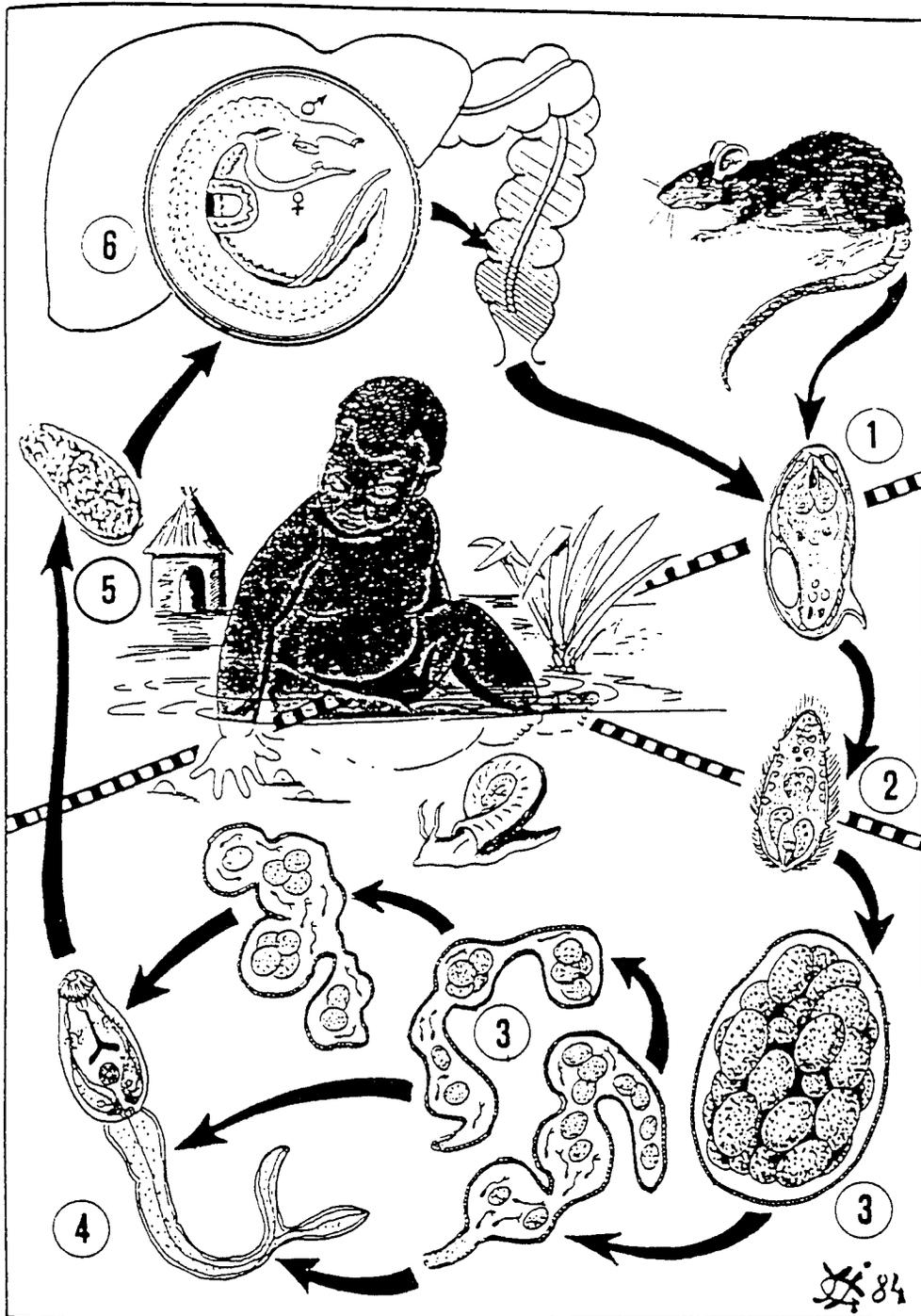


Figure 17 : Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni*.
 (Golvan, Y.J., Ed Flammarion 1969)

Dans l'eau et le mollusque-hôte intermédiaire

Les **œufs** (1) de schistosomes excrétés par l'organisme de l'hôte définitif éclosent lorsqu'ils atteignent l'eau, libérant une larve minuscule : le **miracidium** (2). Les premières études sur les conditions d'éclosion indiquent que les facteurs principaux sont la température (qui doit être entre 25 et 30°C), la luminosité et la pression osmotique. L'hypotonie (osmolarité proche de 12 mOsM) semble être le facteur principal d'induction de l'éclosion. Cette valeur est souvent celle de l'eau douce. Le mécanisme d'éclosion est un phénomène purement physique (l'eau pénètre dans les vacuoles créant un phénomène de turgescence qui va aboutir à l'éclatement de l'enveloppe) qui a lieu même quand le miracidium est mort. Une fois libéré, le miracidium nage à l'aide des cils qui le recouvrent, en quête de son hôte mollusque d'eau douce, dans lequel il pourra poursuivre son développement. Le miracidium ne survit pas dans l'eau au delà de 8 à 12 heures (Chernin, E. et Dunavan, C.A. 1962 - Prah, S.K. et James, C. 1977).

A l'intérieur du mollusque, le miracidium bourgeonne, se transforme en **sporocyste primaire** qui va donner des **sporocystes secondaires** (3). La suite du développement s'effectue dans l'hétopancreas du mollusque et aboutit à la formation des **furcocercaires** (4), larves à queue fourchue, de 500 µm de long. La durée totale du cycle chez le mollusque est d'un mois.

La multiplication intense du parasite chez le mollusque aboutit à la formation, à partir d'un seul miracidium, de milliers de cercaires qui émergent du mollusque aux heures chaudes de la journée (Pitchford, R.J. et coll. 1969 - Nojima, H. et Sato, A. 1982). Elles peuvent vivre en eau libre pendant 24 heures au maximum. En effet, la principale réserve d'énergie de

la cercaire est le glycogène contenu dans la queue et le corps. Lawson, J.R. et Wilson, R.A. (1980) ont montré que cette réserve diminue de façon exponentielle après la libération de la cercaire dans l'eau. Elles doivent donc pénétrer à travers la peau de leur hôte définitif (le plus souvent l'homme) dans ce court délai.

Dans l'hôte définitif

L'homme contracte la maladie par pénétration transcutanée des cercaires en séjournant dans une eau où nagent des mollusques infestés par des parasites. Les cercaires sont dispersées dans l'eau à une concentration moyenne de une cercaire par litre dans les foyers d'endémie. Les cercaires se fixent sur l'épiderme de leur hôte définitif grâce à leur ventouse antérieure munie d'épines. La pénétration à travers la peau fait intervenir une action mécanique et une action chimique (sécrétion d'enzymes kératolytiques : Landsperger, W.J. et coll. 1982). De fascinantes modifications s'opèrent alors permettant au parasite de s'adapter à son "nouveau mode de vie" : modifications de structure (Stirewalt, M.A. 1974 - Mc Laren, D.J. 1980), de morphologie (en traversant la peau de leur hôte définitif, les cercaires perdent leur queue) et biochimiques comme l'apparition de nouvelles molécules. La pénétration est complète en 10 minutes environ. Les cercaires se transforment ainsi en **schistosomules** (5) capables de vivre dans un milieu où l'osmolarité est augmentée.

Par transport lymphatique ou veineux, le schistosomule atteint en quatre jours les poumons, puis il gagne les veinules portes intrahépatiques. La phase migratoire dure dix à vingt jours. Seuls les schistosomules qui atteignent les veines portes intrahépatiques poursuivent leur différenciation jusqu'à la maturité sexuelle, en trois semaines environ.

Ceux qui se perdent dans d'autres organes restent immatures. Des veinules portes intrahépatiques, le couple de schistosomes adulte se déplace à contre-courant grâce à leurs ventouses, par la veine porte, la veine mésentérique inférieure, puis la veine hémorroïdale supérieure vers le plexus hémorroïdal. *Schistosoma mansoni*, *japonicum* et *intercalum* s'arrêtent dans ce plexus. *Schistosoma haematobium* poursuit sa route jusqu'au plexus vésical.

Les vers adultes colonisent alors définitivement le système porte hépatique ou mésentérique (*Schistosoma mansoni* et *Schistosoma japonicum*), ou le système urinaire (*Schistosoma haematobium*). Leur durée de vie est en moyenne de 3 à 5 ans. Toutefois, Vermund, S.H. et coll. (1983) ont rapporté des périodes pouvant atteindre 30 ans. Ils se nourrissent des globules rouges de leur hôte. Dès la cinquième semaine après l'infection, les adultes s'accouplent, puis la femelle (logée dans le canal gynécophore du mâle) (6) pond plusieurs centaines d'œufs par jour. Le nombre d'œufs pondus dépend toutefois de l'espèce de schistosome : pour *Schistosoma mansoni*, il est de 300 par jour (Loker, E.S. 1983).

Ces œufs pourront avoir 2 destinées :

- ceux qui seront bloqués dans les tissus occasionneront la formation du granulome bilharzien. Le dépôt de ces œufs dans les tissus est responsable des lésions bilharziennes.

- ceux qui traverseront la muqueuse et tomberont dans la lumière de la vessie (*Schistosoma haematobium*) ou de l'intestin (*Schistosoma mansoni* et *Schistosoma japonicum*) seront éliminés dans les excréments. Dans l'eau, ils éclosent et libèrent des embryons (miracidium) qui infectent à leur tour les mollusques, bouclant ainsi le cycle des schistosomes. Chez l'homme, la période qui s'écoule entre l'infestation par les cercaires et la ponte des œufs de schistosomes dure de quarante à soixante jours.

Ces données épidémiologiques révèlent le besoin urgent d'un vaccin contre la bilharziose, qui limiterait l'infection et éviterait ses conséquences pathologiques. Mais quelle que soit son efficacité, une vaccination ne peut prétendre qu'à la réduction du nombre de parasites. La diminution du nombre d'œufs émis et de leur viabilité affecterait sérieusement les possibilités de transmission.

II - LA REPOSE IMMUNE CONTRE *S. mansoni* CHEZ LES ANIMAUX

La connaissance et la compréhension des mécanismes contrôlant la réponse immune dirigée contre les schistosomes et les subterfuges utilisés par ces parasites pour malgré tout survivre chez leur hôte sont indispensables à la mise en place d'une stratégie vaccinale efficace contre la bilharziose.

1 - Choix du modèle animal

En 1958, Kagan divise les espèces animales en 3 catégories suivant leur comportement face à l'infection par les schistosomes.

Ainsi, on définit :

- * les hôtes résistants, comme chez le pigeon où les cercaires sont détruites au niveau de l'épiderme.
- * les hôtes semi-permissifs, (ou partiellement résistants) qui rejettent les vers adultes avant la ponte. Le rat par exemple, s'infecte et les formes larvaires accomplissent le stade de migration hépatique, mais il ne permet pas un développement complet du parasite. A la 4^{ème} semaine d'infection, il y a une chute brutale de la charge parasitaire (Smithers S.R et Terry R.J.

1965 - Maddison, S.E. et coll, 1970). Cependant le rat développe une immunité à la réinfection très importante.

* les hôtes permissifs, (ou susceptibles) qui permettent la ponte et la maturation complète du parasite. Parmi ces hôtes, on trouve le hamster, la souris, le singe Rhésus et l'homme.

2 - Caractères de la réponse immune contre les schistosomes.

Comme nous l'avons vu, le schistosome ne se multiplie pas chez son hôte définitif. La plupart des espèces animales développent une résistance à la réinfection par *S. mansoni*. Cette immunité est d'un caractère particulier puisqu'elle est dirigée contre les formes larvaires d'une nouvelle infection, alors même qu'elle est inefficace contre les vers adultes déjà présents dans l'organisme. Le terme d'immunité concomitante a été proposé en 1969 par Smithers et Terry pour décrire cette situation tout-à-fait particulière où une immunité à la réinfection apparaît en présence d'une infection active. Des travaux réalisés *in vivo* par transfert de vers adultes dans différents organismes hôtes et *in vitro* (Smithers, S.R. et Terry, R.J. 1967), ont permis de montrer que peu de temps après leur pénétration, les jeunes schistosomes acquièrent à leur surface des antigènes de l'hôte, ce qui les protègent contre l'attaque immune qu'ils ont eux-mêmes déclenchée.

La chronicité de l'infection mais également le caractère dynamique du développement du parasite dans l'organisme hôte, expose ce dernier de façon répétée à un grand nombre d'antigènes depuis le stade larvaire jusqu'au stade adulte et enfin œuf, du parasite. Le schistosome vivant dans les vaisseaux, libère des produits métaboliques d'excrétions ou de sécrétions, sources d'antigènes circulants présents sous forme libre ou d'immun-complexes, qui pourront stimuler le système immunitaire de

l'hôte. La "parade" habituelle du système immunitaire face à des stimulations répétées ou continues, est de diminuer ou de moduler la réponse, de façon à éviter les hyper-réactivités qui auraient des conséquences néfastes pour l'organisme hôte.

3 - La réaction granulomateuse

La pathologie de la bilharziose est en fait due à une fibrose (hépatique ou/et intestinale) qui accompagne la réaction granulomateuse développée par l'hôte autour des œufs qui n'ont pu être évacués. Le nombre d'œufs pondus étant en partie proportionnel au nombre de parasites infectants (Dessein, A. et coll. 1992), l'Organisation Mondiale de la Santé considère donc qu'une préparation vaccinale capable d'induire une réduction de la charge vermineuse de 50 à 60% permettrait d'alléger considérablement la souffrance des individus vivant en zone d'endémie. La seule condition est qu'elle ne s'accompagne pas d'une exacerbation des réactions immunopathologiques liées aux œufs pondus par les quelques couples survivants. De façon inverse, une stratégie vaccinale capable d'induire, outre une diminution de la charge parasitaire, une réduction de ces manifestations pathologiques serait fortement sollicitée.

De nombreuses études ont été entreprises pour comprendre ce qu'était la réaction granulomateuse, pourquoi elle s'accompagnait d'une fibrose, et comment ces 2 mécanismes étaient susceptibles d'être contrôlés.

4 - L'immunité spécifique

Le système immunitaire contrôle la résistance à la réinfection par *Schistosoma mansoni* mais également les mécanismes de régulation de la pathologie associée à l'infection.

a - Immunité thymo-dépendante

L'immunité développée contre *S. mansoni* est thymo-dépendante. En effet, des animaux à fonction thymique déficiente présentent une très faible résistance à la réinfection (Capron, M. et coll. 1983 - Phillips, S.M. et coll. 1983). La nature thymo-dépendante de l'immunité vis-à-vis de *S. mansoni* implique une coopération entre les deux principaux compartiments du système immunitaire : celui des lymphocytes B et celui des lymphocytes T. Contrairement aux infections bactériennes et virales, les lymphocytes T ne semblent pas impliqués directement dans des mécanismes de cytotoxicité contre le parasite (Butterworth, A.E. et coll. 1979). Cependant, si les cellules T ne participent pas directement à la destruction du parasite leur implication indirecte n'en est pas moins effective. En effet, ils ont un rôle inducteur dans la prolifération et la différenciation des cellules B (qui produiront des anticorps impliqués dans des mécanismes de cytotoxicité cellulaire mettant en jeu d'autres cellules effectrices). De plus, les lymphocytes T activés à la suite de la reconnaissance spécifique de l'antigène, produisent de nombreux médiateurs solubles appelés "lymphokines" dont certains faciliteront la réponse des lymphocytes B face au même antigène.

Cette coopération étroite et réciproque entre les cellules T et les cellules B - (en effet si les produits de sécrétions des lymphocytes T aident à la maturation des lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps, il a été démontré que lymphocytes B et anticorps interviennent dans la

sélection puis le maintien du répertoire T d'un individu (Martinez-A, C. et coll. 1988)) - rend donc inadéquate la totale séparation de l'immunité humorale et de l'immunité cellulaire. En réalité, cette distinction sera faite sur la base de la nature (humorale ou cellulaire) des mécanismes effecteurs impliqués dans la protection contre le parasite.

b - Mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps (ADCC)

L'infection de rats par *Schistosoma mansoni* conduit à une réponse humorale très importante avec une production remarquable d'anticorps anaphylactiques (Sadun, E.H. et Gore, R.W. 1970 - Rousseaux-Prévost, R. et coll. 1978) : IgE et IgG2a. De plus, des expériences de transfert de sérum (Capron, A. et coll. 1980^a) ont mis en évidence le rôle essentiel de cette réponse humorale dans l'immunité protectrice du rat. Les travaux de Santoro, F. et coll. (1978) ainsi que ceux de Stevens, W.J. et coll. (1983) ont montré que dès 8 à 10 jours après la pénétration, les jeunes parasites libèrent de grandes quantités de produits métaboliques : c'est ainsi que des antigènes circulants et des immun-complexes se retrouveront dans la circulation de l'hôte.

Des études *in vitro* montrent que l'ADCC est un des premiers mécanismes de défense contre le parasite (Capron et coll. 1980^b). Enfin, la cible de ces mécanismes d'ADCC est le stade larvaire du parasite, le ver adulte n'étant aucunement affecté (Dessein, A. et coll. 1981).

5 - Mécanismes d'échappement du parasite

Qu'ils soient décrits chez la souris, chez le rat ou même chez l'homme, les mécanismes d'échappement mis en place par le parasite pour échapper à la réponse immune de l'hôte apparaissent remarquablement ingénieux. Ces mécanismes sont les suivants :

* Quelques jours après la pénétration cutanée, des modifications du tégument du schistosomule apparaissent : il y a remplacement de déterminants antigéniques par d'autres, créant ainsi un leurre pour les mécanismes effecteurs spécifiques (Torpier, G. et coll. 1977). Par ailleurs, le parasite agglutine à sa surface des molécules de l'hôte (exemple : α 2-macroglobuline, molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et des groupes sanguins ABO (Torpier, G. et coll. 1979) qui lui permettent de masquer ses antigènes de surface. L'hôte ne produit ainsi que peu d'anticorps contre la surface tégumentaire du schistosome (Lewis, S.A. et Srand, M. 1991).

Le parasite induit la production d'anticorps bloquants. Ces anticorps sont d'isotype IgG_{2c} chez le rat. Ils bloquent une des fonctions effectrices des éosinophiles (celle dépendante des IgG_{2a}) en se fixant aux antigènes qui auraient pu être reconnus par les IgG_{2a} (Grzych, J.M. et coll. 1984).

III - LA REPONSE IMMUNE CHEZ L'HOMME

1 - L'immunité à la réinfection

Une étude épidémiologique récente menée dans une zone où la bilharziose vient de s'installer (région de St Louis au Sénégal), montre que le nombre d'œufs excrétés par gramme de selles est plus élevé chez les enfants que chez les adultes (Renom, G. 1992). Etant donné que ces populations sont toutes non immunes au départ, ceci montre qu'une influence directe de l'âge sur l'immunité à la réinfection est même possible.

Deux autres paramètres semblent influencer l'acquisition de cette immunité. D'une part, le statut génétique du patient : certaines familles

développent aisément une immunité à la réinfection alors que d'autres non (Dessein, A. et coll. 1992). D'autre part l'intensité de l'infection primaire : plus celle-ci serait lourde, moins le patient deviendrait immun (Dessein, A. et coll. 1992).

2 - Les différents isotypes d'anticorps mis en jeu.

a - Isotypes effecteurs

Des études réalisées sur des populations kenyanes (Dunne, D.W. et coll. 1992) et brésiliennes (Rihet, P. et coll. 1991) infectées par *S. mansoni* ont démontré que l'acquisition de l'immunité à la réinfection est corrélée avec le développement d'une réponse IgE dirigée contre les antigènes du ver adulte. Aucun autre isotype d'anticorps anti-extrait antigénique total de vers adulte ne permet d'établir de corrélations positives. Toutefois, les travaux de Grzych, J.M. et coll. (1993) montrent clairement que des anticorps d'isotype IgA spécifiques d'une glutathion-S-transférase de *S. mansoni* de 28kDa sont significativement plus élevés chez les individus immuns.

b - Isotypes bloquants

Butterworth, A.E. et coll. (1988) observent que les jeunes enfants, mais pas les adolescents ni les adultes, produisent beaucoup d'anticorps d'isotypes IgG2 et IgM. Ces anticorps qui reconnaissent surtout des déterminants glycaniques communs aux stades œuf et schistosomule du parasite seraient donc des marqueurs de susceptibilité à la réinfection. Des anticorps d'isotype IgG4 partageraient aussi cette propriété (Hagan, P. et coll. 1991). Ces anticorps, surtout dirigés contre des structures protéiques (Butterworth, A.E. 1988), entreraient en compétition directe avec les IgE au niveau du site de reconnaissance de l'antigène (Rihet, P. et coll. 1992).

La résistance vis-à-vis de la réinfection par *S. mansoni* ne serait donc pas due à la présence d'anticorps ayant des fonctions effectrices protectrices mais plutôt à l'absence d'anticorps bloquants.

Ainsi le lent développement de l'immunité pourrait s'expliquer par :

- (1) l'apparition très précoce de réponses protectrices (IgG₁, IgG₃) dirigées contre le stade larvaire, associée à :
- (2) l'apparition parallèle d'anticorps (IgM, IgG₂, IgG₄) bloquant ces mêmes réponses protectrices. Ces anticorps seraient dirigés contre des antigènes polysaccharidiques de l'œuf partageant des épitopes avec des antigènes larvaires.
- (3) la diminution des anticorps bloquants avec le temps, permettra ainsi l'expression des réponses protectrices et, par conséquent, de l'immunité.

Bien sûr l'immunité chez l'homme ne se résume pas à cette balance entre réponse protectrice et réponse bloquante. Comme chez l'animal, elle est multifactorielle et donc infiniment plus complexe. Toutefois, la connaissance de ces mécanismes est essentielle dans le développement d'un vaccin efficace pour lequel il faudra limiter, voire empêcher, l'apparition des anticorps bloquants.

IV - BILHARZIOSE : VERS UN VACCIN ?

Le développement d'une immunité protectrice, chez les populations humaines, est lent et ne devient décelable qu'après la puberté. L'infection est établie avant que cette immunité ne soit efficace. Les modèles expérimentaux et mathématiques montrent que si l'on parvenait à réduire le nombre de parasites adultes de 60 à 70% chez les sujets infectés,

l'incidence des formes graves de la maladie, et à terme, l'extension de l'endémie seraient limitées.

Comme le système immunitaire est incapable de détruire le parasite adulte trop volumineux, deux stratégies vaccinales sont envisagées : un vaccin doit, soit détruire les larves (les schistosomules) après leur pénétration dans l'organisme, pour empêcher les parasites de devenir adultes et de pondre, soit diminuer la fécondité des vers, pour éviter que les œufs ne provoquent des lésions graves et ne propagent la maladie.

Un antigène parasitaire qui induit une immunité protectrice chez les animaux, et chez les êtres humains infectés à été découvert. L'immunisation avec cet antigène prévient partiellement les réinfections et empêche l'aggravation de la maladie, en déclenchant la destruction des larves infectantes et en réduisant la fécondité parasitaire. Cet antigène découvert dans les produits d'excrétion du parasite adulte, se retrouve aussi à la surface des larves (cible du futur vaccin), ainsi que dans le tégument ou dans d'autres parties du ver adulte. Cet antigène est une protéine de masse moléculaire égale à 28 000 qui a initialement été nommée P28. Cette protéine a une homologie avec une famille d'enzymes, les glutathion-S-transférases (GST). Elle a donc été rebaptisée Sm28GST (Sm indique qu'elle a été initialement extraite de *Schistosoma mansoni*). La molécule Sm28GST est un antigène sécrété transitoirement exprimé à la surface du parasite à tous les stades du développement.

Pour optimiser le potentiel vaccinant de la protéine Sm28GST, il faut connaître les régions de la protéine, nommées épitopes, qui induisent une réponse immunitaire.

1 - Localisation de l'antigène Sm28GST

La Sm28GST n'est pas une protéine intégrale de membrane mais c'est un antigène transitoirement exprimé à la surface du parasite quel que soit son stade de développement (schistosomule, ver adulte ou miracidium). Des études de microscopie électronique montrent que cette molécule est trouvée dans le tégument, dans des cellules du parenchyme sous-tégumentaire et dans le système d'excrétion protonéphridien. Elle n'est pas présente au niveau de l'épithélium cæcal ou des organes reproducteurs. Il est suggéré que la Sm28GST est exprimée à la surface du parasite lors de la formation de la structure multilamellaire du tégument qui est constamment régénéré (Holy, J.M. et coll. 1989).

2 - Mécanismes effecteurs impliqués dans la protection

a - Réduction de la charge parasitaire

α - Chez le rat

Des rats ayant reçu deux ou même une seule injection de Sm28GST recombinante en présence d'adjuvant de Freund, d'hydroxyde d'alumine ou de BCG, présentent plus de 50% de réduction de la charge parasitaire (Balloul, J.M. et coll. 1987^b - Grezel, D. et coll. 1993). La participation des anticorps dans cette protection est suggérée par l'observation qu'un transfert passif de sérum anti-Sm28GST avant infestation reproduit cette protection (Balloul, J.M. et coll. 1987^a). Cette réponse humorale serait au moins en bonne partie dépendante des lymphocytes T (Auriault, A. et coll. 1987) et son rôle ne se limiterait pas à neutraliser l'activité enzymatique de la molécule. En effet, l'injection d'anticorps ne neutralisant pas cette

activité GST induit aussi une forte protection (Xu, C.B. et coll. 1991). De plus, des mécanismes effecteurs de type ADCC dirigés contre les schistosomules et impliquant d'une part plaquettes et IgE spécifiques et, d'autre part éosinophiles et IgE ou IgG2a ou encore IgA spécifiques, sont clairement mis en évidence *in vitro*. (Balloul, J.M. et coll. 1987^a - Balloul, J.M. et coll. 1987^b - Grezel, D. et coll. 1993).

β - Chez la souris

Des souris ayant reçu deux injections de Sm28GST recombinante en présence d'hydroxyde d'alumine avant infection présentent une réduction de la charge parasitaire d'environ 30% comparée aux souris contrôles (Grezel, D. 1992). Par ailleurs, le transfert de cellules T CD4⁺ de souris immunisées par la Sm28GST en présence d'adjuvant de Freund, à des souris saines ultérieurement infectées réduit de moitié le nombre de vers. Des mécanismes effecteurs impliquant plaquettes et macrophages en présence de cytokines semblent être à l'origine de cette immunité. La réponse humorale n'interviendrait pas dans ce protocole d'immunisation (Wolowczuk, I. et coll. 1989).

γ - Chez le babouin

L'immunisation de babouins avec la Sm28GST permet l'obtention d'une protection pouvant atteindre 80%. Cependant d'importantes variations individuelles sont notées et une moyenne de 40% de réduction de la charge parasitaire est enregistrée.

La réponse IgG anti-Sm28GST qui est développée par ces primates ne corrèle pas avec leur degré d'immunité. Par contre des mécanismes d'ADCC impliquant plaquettes, éosinophiles et facteurs sériques

thermolabiles sont mis en évidence *in vitro* (Boulanger, D. et coll. 1991). La protection apparaît donc être dépendante d'IgE.

b- Réduction de la ponte des parasites

Les travaux de Boulanger, D. et coll. (1991) ont mis en évidence que la réduction du nombre d'œufs n'était pas due à une diminution du nombre de vers mais était un processus actif d'inhibition de la ponte des parasites.

Les nombreux travaux qui ont été effectués pour comprendre les mécanismes à l'origine de cet effet anti-fécondité, ont déjà révélé que :

- Les sérums des animaux immunisés par la Sm28GST sont capables d'inhiber *in vitro* à 30% la ponte des schistosomes sans intervention de cellules effectrices (Boulanger, D. et coll. 1991 - Grezel, D. 1992).

- Les anticorps capables de neutraliser l'activité enzymatique de la molécule ont un effet anti-fécondité qui se manifeste à la fois *in vitro* et *in vivo* (Xu, C.B. et coll. 1991 - Grzych, J.M. et coll. 1993).

- La fraction IgA des sérums d'individus infectés est capable de neutraliser *in vitro* l'activité enzymatique de la Sm28GST et d'inhiber *in vivo* la ponte des vers (Grzych, J.M. et coll. 1993).

L'ensemble de ces résultats a ainsi permis d'établir que l'activité enzymatique de la Sm28GST est essentielle à la reproduction du ver et que les anticorps d'isotype IgA sont capables de la bloquer.

c - Réduction de la viabilité des œufs

L'immunisation de souris ou de singes par la Sm28GST ou le transfert passif d'un anticorps monoclonal bloquant l'activité enzymatique de la molécule induit une réduction de la viabilité des œufs pondus par les schistosomes à la fois *in vitro* et *in vivo* (réduction d'environ 30%) (Boulanger, D. et coll. 1991 - Boulanger, D. 1991 - Xu, C.B. et coll. 1991 -

Grezel, D. 1992). Il semble que, là aussi, seule la fraction IgA des sérums anti-Sm28GST soit impliquée (Grzych, J.M. et coll. 1993).

3 - Réponse immunitaire anti-Sm28GST

a - Réponse humorale

En 1990, Auriault, C. et coll. montrent que parmi 129 enfants bilharziens kenyans âgés de 9 à 16 ans, 64% d'entre eux ont des IgA anti-Sm28GST, 97% ont des IgE anti-Sm28GST et 47% ont des IgG anti-Sm28GST. Au cours d'une seconde étude épidémiologique portant sur des individus âgés de 6 à 66 ans, Grzych, J.M. et coll. (1993) ont montré quant à eux que le taux d'IgA anti-Sm28GST augmente avec l'âge, parallèlement à l'acquisition d'une immunité à la réinfection.

b - Réponse cellulaire

Au cours d'une étude réalisée au Kenya dans une zone d'endémie à *S. mansoni*, Wolowczuk, I. et coll. (1991) ont montré que 77% des enfants infectés par *S. mansoni* ont parmi leurs lymphocytes périphériques des cellules spécifiques de l'antigène Sm28GST.

L'ensemble de ces résultats montre donc que la Sm28GST est chez l'homme aussi, un antigène majeur.

V - EPITOPES IMPLIQUES DANS LE POUVOIR PROTECTEUR DE LA Sm28GST.

Une recherche des épitopes T et B de la Sm28GST fût entreprise à partir de 1987, son objectif étant d'arriver à une compréhension moléculaire des mécanismes impliqués dans la protection, voire d'arriver à définir un vaccin purement synthétique.

1 - Prédiction des épitopes de la Sm28GST.

Trois domaines de la protéine Sm28GST ont été indentifiés qui contiennent des épitopes essentiels :

-un domaine carboxy-terminal (une séquence de 21 acides aminés située à l'extrémité COOH : peptide 190-211)

-un domaine amino-terminal (séquence de 33 acides aminés proche de l'extrémité NH₂ : peptide 10-43)

-un domaine central (séquence de 16 acides aminés : peptide 115-131)

Ces domaines ont été localisés grâce à un programme informatique qui détermine les épitopes possibles en fonction des propriétés chimiques des acides aminés à partir de la séquence de la protéine. En effet, comme nous l'avons déjà signalé, les épitopes qui induisent une synthèse d'anticorps (les épitopes B) sont généralement des zones exposées à la surface des antigènes. Ils peuvent se présenter sous forme d'hélice α ou être linéaire. On sait maintenant que les épitopes qui activent les lymphocytes T (épitopes T) se présentent dans une conformation étendue. Les propriétés chimiques des épitopes B et T sont liés à leurs différents modes de reconnaissance par les cellules immunitaires.

Pour étudier isolément les propriétés immunogènes de chacun de ces trois domaines de la protéine Sm28GST, les peptides reproduisant chacun d'eux ont été synthétisés.

2 - Analyse de l'antigénicité des peptides sélectionnés.

a - Antigénicité B des peptides 115-131 et 190-211.

Les peptides 115-131 et 190-211 couplés ou non à une molécule porteuse sont reconnus par les IgG et par les IgA des sérums de souris ou de rats immunisés par la Sm28GST. Par ailleurs, des injections répétées de Sm28GST engendreraient aussi des IgE spécifiques de ces peptides chez le rat (Auriault, C. et coll. 1988 - Grezel, D. 1992).

Le domaine central de la protéine Sm28GST, compris entre les acides aminés 115 et 131, contient les épitopes qui induisent la cytotoxicité antilarvaire. Des rats immunisés avec la protéine Sm28GST recombinante produisent de nombreux anticorps contre le peptide synthétique 115-131. Chez l'homme, le domaine central déclenche une synthèse abondante d'anticorps de classes IgA, IgG et surtout IgE.

b - Effet anti-fécondité des peptides N et C terminaux.

L'immunisation avec les peptides N- et C-terminaux diminue de plus de 70% la ponte et la viabilité des œufs. Le domaine C-terminal et dans une moindre mesure, le domaine N-terminal, contiennent les principaux épitopes responsables de l'effet anti-fécondité. Cet effet est lié à la production d'anticorps anti-IgA dirigés contre ces domaines, qui agissent en l'absence de cellules cytotoxiques par un mécanisme encore inconnu. Ces résultats ont été confirmés chez l'homme ou chez les populations exposées au parasite, l'augmentation de la réponse IgA contre la protéine Sm28GST,

est corrélée à la diminution de la ponte, au cours de l'acquisition de l'immunité. D'autre part, les IgA purifiées à partir du sérum des malades reconnaissent le domaine C-terminal de cette protéine et inhibent la ponte des parasites.

c - Peptides reconnus par les anticorps inhibant l'activité enzymatique

Seuls les peptides 190-211 et 10-43 sont capables d'inhiber la reconnaissance de la Sm28GST par des anticorps dirigés contre le site actif de l'enzyme. Par ailleurs le peptide 190-211 et dans une moindre mesure le peptide 10-43 peuvent aussi lever l'inhibition de l'activité enzymatique par ces anticorps (Xu, C.B. et coll. 1993 - Grezel, D. 1992). Ainsi il a été mis en évidence que le domaine C-terminal est une région clé du site enzymatique de la protéine Sm28GST. Ce peptide est essentiel pour l'induction de l'effet anti-fécondité qui dépend de l'activité glutathion-S-transférase.

Le site enzymatique de la Sm28GST résulterait donc d'une association spatiale des séquences N et C-terminales de la molécule.

VI - CONCLUSION

Au cours des dernières années, les recherches sur les schistosomiasés ont fait l'objet d'un intérêt croissant du fait de leur incidence considérable sur la santé publique.

L'immunoprophylaxie de ces infections représenterait un progrès considérable et cela justifie tout-à-fait les investissements importants réalisés tant aux niveaux nationaux qu'internationaux. En effet, même si des mesures de contrôle modernes existent (contrôles biologiques ou chimiques des vecteurs hôtes intermédiaires), et malgré le développement d'une drogue schistosomicide très efficace (le praziquantel : pzq), leur utilisation à long-terme et à l'échelle de tout un pays n'est pas envisageable.

Nous l'avons vu, les études réalisées sur les animaux de laboratoire ont permis de démontrer que l'immunité protectrice vis-à-vis de l'infection par *Schistosoma mansoni* fait intervenir à la fois des mécanismes humoraux et cellulaires. De plus, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, les nombreuses relations existant entre les lymphocytes B et les lymphocytes T rendent la séparation entre immunité humorale et immunité cellulaire plus théorique que réelle. Une réponse immune efficace contre le parasite nécessitera l'intervention synchronisée de très nombreux événements impliquant les cellules B, et les cellules T.

Nous nous avons utilisé comme modèles lors de ce travail les peptides 190-211 et 115-131 issus de la protéine Sm28GST.

RESULTATS

MELANGES DE PEPTIDES OBTENUS PAR SYNTHÈSE COMBINATOIRE : UTILISATION COMME ANTIGÈNE DANS LES TESTS SERODIAGNOSTICS

A - INTRODUCTION.....	70
B - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.....	71
I - STRATÉGIE ET CONCEPTION DES PEPTIDES.....	71
1 - Stratégie.....	71
2 - Synthèse peptidique en phase solide.....	75
a - Synthèse des peptides 190-211 et 115-131.....	75
b - Synthèse des lipopeptides 190-211 et 115-131.....	75
c - Synthèse combinatoire.....	76
3 - Déprotection.....	77
a - Déprotection des peptides et des lipopeptides.....	77
b - Déprotection des mélanges combinatoires.....	78
4 - Purification.....	78
a - Purification des peptides.....	78
b - Purification des lipopeptides.....	79
5 - Caractérisation.....	79
II - MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	80
1 - Réactifs utilisés.....	80
2 - Synthèses.....	80
a - Formation d'une résine MBHA-lysine-palmitoyl.....	80
b - Synthèse classique en phase solide.....	81
c - Synthèse des mélanges combinatoires.....	81
3 - Déprotections.....	82
a - Déprotection des histidines-(2,4) dinitrophényle.....	82
b - Coupure HF.....	82
4 - Purification.....	83
a - Purification des peptides.....	84
b - Purification des lipopeptides.....	84
5 - Caractérisation.....	84
a - CLHP analytique en phase inverse.....	84
b - Spectrométrie de masse.....	85
c - Analyse d'acides aminés.....	85
III - RESULTATS.....	85
1 - CLHP préparative en phase inverse.....	85
2 - CLHP analytique en phase inverse.....	87
3 - Spectrométrie de masse.....	88
4 - Analyse d'acides aminés.....	90

C - TESTS IMMUNOLOGIQUES.....	92
I - MATERIEL ET METHODES.....	92
1- Matériel utilisé.....	92
a - Animaux.....	92
b - Sérums humains.....	92
c - Réactifs.....	92
2 - Protocoles d'immunisation.....	93
a - Immunisation sous-cutanée.....	93
b - Hyper-immunisation de lapins.....	93
3 - Infestations.....	94
4 - Prélèvement des sérums.....	94
5 - Test ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay).....	94
6 - Electrophorèse en polyacrylamide/SDS et Western blot.....	95
a - Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	95
b - Immunoélectrotransfert.....	96
c - Coloration des gels au bleu de Coomassie.....	97
d - Coloration des gels au nitrate d'argent.....	97
II - RESULTATS.....	98
1 - Résultats obtenus avec des animaux immunisés.....	98
a - Sérums de souris.....	98
b - Sérums de rats.....	100
2 - Résultats obtenus avec des animaux infestés.....	102
a - Sérums de souris.....	102
b - Sérums de rats.....	103
3 - Résultats obtenus avec des sérums humains.....	105
4 - Mesures d'avidités.....	107
a - Principe de l'élution au thiocyanate.....	107
b - Résultats avec des sérums de rats immunisés.....	109
c - Résultats avec des sérums de rats infestés par Schistosoma mansoni.....	110
d - Résultats avec des sérums d'individus infestés par Schistosoma mansoni.....	111
5 - Western blot.....	112
D - DISCUSSION.....	113
E - CONCLUSION.....	116

MELANGES DE PEPTIDES OBTENUS PAR SYNTHÈSE COMBINATOIRE : UTILISATION COMME ANTIGÈNES DANS LES TESTS SERODIAGNOSTICS

A - INTRODUCTION

Nous avons choisi comme modèles pour nos travaux des peptides issus de la protéine Sm28GST, antigène invariable retrouvé à tous les stades du développement des schistosomes. Plusieurs tests diagnostics existent pour déceler les individus parasités par *Schistosoma mansoni*. La sérologie permet le diagnostic de la plupart des bilharzioses, et cela dès la phase d'invasion. Ces tests sont actuellement réalisés avec des œufs vivants ou des antigènes natifs de schistosomes. Ils manquent de spécificité et parfois de sensibilité. Les tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) basés sur l'utilisation de peptides synthétiques en tant qu'antigènes en phase solide se sont avérés très utiles en sérodiagnostic. Cependant cette approche est souvent limitée par la faible intensité du signal détecté.

Notre idée est d'utiliser en tant qu'antigène en phase solide un mélange de peptides obtenu par synthèse combinatoire. Ces peptides dérivés de la séquence initiale du peptide sont obtenus en remplaçant un acide aminé unique par un mélange de 2 ou 3 acides aminés couplés simultanément. Le résultat est un mélange de peptides désigné par le terme générique de mixotope (après N étapes d'incorporation de mélanges contenant n acides aminés, un mixotope contient n^N peptides différents). Notre hypothèse est que de tels mélanges contiennent, en plus de la séquence initiale, une population de séquences étroitement proches les unes des autres capable de détecter plus efficacement des populations d'anticorps hétéroclites.

B - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

I - STRATÉGIE ET CONCEPTION DES PEPTIDES

Nous avons choisi comme modèles (figure 18), les peptides 115-131 (partie centrale) et 190-211 (extrémité carboxy-terminale) de la protéine Sm28GST, antigène invariable exprimé à tous les stades du développement de *Schistosoma mansoni*.

(115)NH₂-K P Q E E K E K I T K E I L N G K-COOH(131)

(190)NH₂-E N L L A S S P R L A K Y L S N R P A T P F-COOH(211)

Figure 18 : Séquences des peptides 115-131 (17 acides aminés) et 190-211 (22 acides aminés)

1 - Stratégie

La stratégie pour obtenir un mélange de peptides par synthèse combinatoire consiste à remplacer un acide aminé en une position donnée par un mélange d'acides aminés (2 ou 3 dans notre cas). Dans l'approche que nous nous sommes fixés, il était important que les acides aminés introduits en mélange ne diffèrent pas de manière trop importante de l'acide aminé introduit en mélange. Pour choisir les acides aminés additionnels, nous nous sommes donc basés sur la matrice de remplaçabilité de Geysen (1988). Cette matrice (figure 19) tient compte de la contribution de chaque acide aminé dans la fixation de l'anticorps à l'épitope. Pour définir celle-ci, les auteurs ont choisi 103 épitopes définis par la méthode des Pepscans. Pour chaque épitope, une série d'analogues a

été synthétisée en remplaçant à chaque position l'acide aminé concerné par les 19 autres. Ainsi, pour un hexapeptide, 114 analogues monosubstitués sont synthétisés. Ces peptides sont ensuite testés par ELISA et comparés aux résultats obtenus avec la séquence naturelle. Il se dégage ainsi un modèle de remplaçabilité pour cet épitope. Cette méthode appliquée aux 103 épitopes choisis donne une matrice exprimée en pourcentage de remplaçabilité d'un acide aminé par un autre. C'est cette matrice que nous avons utilisée pour dégénérer les peptides 190-211 et 115-131.

a.a. de remplacement

a.a	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	No
A	100	6	17	11		50		11	6	11	33	22	17	17		50	22	28			18
C	7	100	7			7	13		7		20	13	7	20	27	7	7		7		15
D	12	38	100	50	4		23			4	12	42	4	12		27	15		19		26
E	21	15	42	100	2	13	8	6	6	8	21	13	13	33	4	15	10	6	8	6	48
F	11	16	16	11	100		5	16	5	37	11	11	11	11	5	32	26	16	16	21	19
G	24	3	6	3	6	100	12	6	12	6	15	3		9	18	24	3	3	3	3	33
H				8		23	100		15		8	15	23	23	23	8	15	8	8	8	13
I	47	29	18	29	35	0	0	100	24	59	18	12	6	29	24	24	24	65	6	0	17
K	16	0	10	0	10	10	26	13	100	10	32	23	3	26	39	29	23	13	6	0	31
L	12	10	8	2	22	2	8	49	18	100	29	6	4	12	10	4	4	22	6	10	51
M									100		100		100	100							1
N		4	4	4	4	4	9		9	4	13	100		13	17	9	4		4		23
P	24	8	3	5	8	14	11	11	16	3	16	11	100	16	5	14	11	14	8	0	37
Q	20	15	5	15	5	20	10	5	5	5	25	25	10	100	10	15	10	10	10	10	20
R	67				33		67	33	67	33	67		33	33	100			33	33	33	3
S	33	11		17	11	6	39	6	11	6	22		6		28	100	22	6	17	6	18
T	12	6	6	15	6	3	9	15	12	9	24	12	6	12	3	44	100	21	15	6	34
V	24	5			14		19	52	10	33	5	14	14		10	5	29	100	14	14	21
W																					0
Y	14	14			29			14	14	14	14				14			14	14	100	7

Figure 19 : Matrice de remplaçabilité de Geysen (1988). La remplaçabilité des résidus est exprimée en pourcentage (Nombre de fois où le remplacement de l'acide aminé (a.a.) est permis * 100/Nombre de fois où l'acide aminé à remplacer est représenté (No))

Au cours d'une première étape, nous avons synthétisé des mélanges combinatoires en dégénérant les peptides à toutes les positions excepté les prolines. En effet ces dernières, amines secondaires, imposent des contraintes conformationnelles aux peptides les contenant. Pour créer les séquences, nous

avons tenu compte non seulement de la matrice de remplaçabilité, mais aussi des critères physicochimiques des acides aminés. Nous avons ainsi défini les associations suivantes : Ala (Gly, Ser), Glu (Asp, Gln), Gly (Ala), Ile (Leu, Val), Leu (Ile, Met), Arg (Lys), Tyr (Phe), Ser (Ala), Phe (Leu), Lys (Arg), Gln (Asn), Thr (Ser), Asn (Gln), où les acides aminés entre parenthèses représentent ceux introduits en plus de l'acide aminé initial, dans le mélange combinatoire. En appliquant cette première règle de dégénérescence, nous avons préparé un mélange contenant $2^{11} \times 3^8$ soit 13.10^6 peptides dérivés du peptide 190-211 (figure 20a) et $2^9 \times 3^7$ soit 11.10^5 peptides dérivés du peptide 115-131 (figure 21a).

Pour l'asparagine (N), nous avons choisi la glutamine (Q), plutôt que la sérine (S) qui possède une fonction alcool, car ces acides aminés ont les mêmes propriétés physicochimiques et ne diffèrent que d'un carbone.

Pour la glutamine (Q), nous avons choisi l'asparagine (N) plutôt que la méthionine (M) qui est un acide aminé soufré.

Pour l'arginine (R), nous avons le choix entre l'alanine (A), la méthionine (M), l'histidine (H) et la lysine (K). Ces deux derniers sont comme l'arginine des acides aminés basiques. Nous avons éliminé l'histidine qui possède un noyau imidazole, et nous avons opté pour la lysine.

Pour la sérine (S), nous avons choisi l'alanine (A) qui est l'analogue de la sérine sans fonction alcool, plutôt que l'histidine (H) qui comporte un groupement imidazole basique.

Dans une deuxième étape, nous avons choisi d'introduire une dégénérescence au niveau des résidus proline. Compte tenu du fait qu'il s'agissait surtout ici d'une incidence conformationnelle, l'alanine, le plus petit acide aminé chiral a été sélectionné. Cette seconde règle de dégénérescence est donc la suivante : Ala (Gly, Ser), Glu (Asp, Gln), Gly (Ala, Ser), Ile (Leu, Val), Leu (Ile, Met), Arg (Lys, Ala), Tyr (Phe, Leu), Ser (Ala, Thr), Phe (Leu, Tyr), Lys (Arg, His), Gln (Asn, Glu), Thr (Ser, Ala), Asn (Gln, Asp), Pro (Ala). Les critères que nous

avons utilisés pour cette seconde série de mélanges combinatoires sont les mêmes que ceux évoqués précédemment. Nous obtenons ainsi un mélange de $9 \cdot 10^9$ peptides pour le 190-211 (figure 20b) et de $9 \cdot 10^7$ peptides pour le 115-131 (figure 21b).

(a)

E	N	L	L	A	S	S	P	R	L	A	K	Y	L	S	N	R	P	A	T	P	F
D	Q	I	I	G	A	A		K	I	G	R	F	I	A	Q	K		G	S		L
Q		M	M	S				M	S			M						S			

(b)

E	N	L	L	A	S	S	P	R	L	A	K	Y	L	S	N	R	P	A	T	P	F
D	Q	I	I	G	A	A	A	K	I	G	R	F	I	A	Q	K	A	G	S	A	L
Q	D	M	M	S	T	T		A	M	S	H	L	M	T	D	A		S	A		Y

Figure 20 : Séquences dérivées du peptide 190-211 : en (a) mélange contenant $13 \cdot 10^6$ peptides (10^6 -peptides) et en (b) mélange contenant $9 \cdot 10^9$ peptides (10^9 -peptides)

(a)

K	P	Q	E	E	K	E	K	I	T	K	E	I	L	N	G	K
R		N	D	D	R	D	R	V	S	R	D	V	I	Q	A	R
		Q	Q		Q		L			Q	L	M				

(b)

K	P	Q	E	E	K	E	K	I	T	K	E	I	L	N	G	K
R	A	N	D	D	R	D	R	V	S	R	D	V	I	Q	A	R
H		E	Q	Q	H	Q	H	L	A	H	Q	L	M	D	S	H

Figure 21 : Séquences dérivées du peptide 115-131 : en (a) mélange contenant $11 \cdot 10^5$ peptides (10^5 -peptides) et en (b) mélange contenant $9 \cdot 10^7$ peptides (10^7 -peptides)

Nous avons cherché à démontrer l'intérêt de ces mélanges combinatoires en tant qu'antigènes en phase solide dans les tests ELISA. Ces tests sérologiques avec les peptides classiques restent limités par la faible intensité du signal obtenu. Notre objectif est d'augmenter cette intensité, sans accroître celle du bruit de fond, en utilisant les mélanges combinatoires qui contiennent, en plus de la séquence initiale, une population de séquences très proches les unes des autres. Nous espérons ainsi, grâce à cette population, pouvoir élargir le recrutement des anticorps en sérodiagnostic, donc augmenter sensiblement l'intensité du signal obtenu.

2 - Synthèse peptidique en phase solide

a - Synthèse des peptides 190-211 et 115-131

La synthèse des peptides en phase solide est réalisée par un synthétiseur automatique ABI 430A. La stratégie Boc/benzyle que nous avons utilisée a été décrite par Merrifield (1963). La fonction α -NH₂ de l'acide aminé protégée par la formation d'une liaison uréthane avec le tertibutyloxycarbonyle (tBoc), est restituée par une acidolyse avec l'acide trifluoroacétique (TFA). L'activation de la fonction carboxylique est réalisée par la dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Le couplage est catalysé par l'hydroxybenzotriazole (HOBt) grâce à la formation d'un ester actif d'HOBt. Cet ester va réagir avec la fonction α -NH₂ de l'acide aminé précédent pour former la liaison peptidique. Chaque couplage est réalisé deux fois. Afin d'éviter la formation de peptides à délétion, les fonctions α -NH₂ qui seraient restées libres après le couplage sont bloquées en réalisant une acétylation systématique par l'anhydride acétique.

La résine utilisée est une para-méthylbenzhydrylamine (MBHA) qui libère après action de l'acide fluorhydrique (HF) des peptides dont la fonction C-terminale est sous forme carboxamide. La fonction α -NH₂ terminale est acétylée pour que le peptide se retrouve dans les mêmes conditions que dans la protéine entière. Les chaînes latérales des acides aminés sont protégées par les groupements classiques (Arg (Tos), Glu (OChx), Lys (2-ClZ), Ser (Bzl), Thr (Bzl) Tyr(BrZ)).

b - Synthèse des lipopeptides 190-211 et 115-131

La synthèse est réalisée par la même méthode que celle utilisée pour les peptides classiques. La seule différence est que nous avons ajouté sur la résine MBHA une lysine sur laquelle nous avons greffé en position ϵ NH₂ un acide palmitique.

Couplage de l'acide palmitique sur la lysine :

La lysine est protégée sur sa fonction α NH₂ par un groupement tBoc sensible aux acides et sur sa fonction ϵ NH₂ par un groupement Fmoc sensible aux bases. Cette stratégie de protections orthogonales va nous permettre de greffer l'acide palmitique sur la fonction ϵ NH₂ sans modifier la fonction α NH₂.

La lysine- ϵ NH₂-Fmoc est greffée par sa fonction carboxylique sur la résine MBHA. La fonction carboxylique est activée par le BOP (Castro, B. 1975), et le couplage est catalysé par l'HOBt grâce à la formation d'un ester actif. Après ce couplage, le groupement Fmoc est éliminé par un traitement à la pipéridine. Le couplage de l'acide palmitique sur la fonction ϵ NH₂ de la lysine est réalisé comme précédemment par action de BOP et d'HOBt. Un test de Kaiser qualitatif à la ninhydrine est effectué. Si il reste des fonctions amines libres dans le milieu, elles vont réagir avec la ninhydrine pour former le violet de Ruhemann (Kaiser, 1970). La coloration bleue de ce test indique qu'il reste des fonctions NH₂ libres. Un deuxième couplage est alors réalisé dans les mêmes conditions, suivi d'un test de Kaiser qualitatif dont la couleur n'est pas bleue. Toutes les fonctions ϵ NH₂ de la lysine sont donc bloquées.

La synthèse se continue normalement sur la fonction α NH₂-Boc de la lysine.

c - Synthèse combinatoire

La synthèse combinatoire est réalisée comme pour les peptides classiques par un synthétiseur Applied Biosystem 430A dont les programmes ont été modifiés (Gras-Masse, H. et coll. 1992). La stratégie Boc/benzyle est là aussi utilisée. L'activation de la fonction carboxylique est effectuée par la DCC et catalysée par l'HOBt. Il n'y a pas d'acétylation au cours de la synthèse, seule la fonction amino terminale des peptides est acétylée.

Les acides aminés sont introduits en mélange, entraînant des risques d'incorporation différentielle. Pour palier à cette contrainte, la synthèse est

réalisée sur une résine MBHA en double couplage. La quantité totale d'acides aminés incorporée lors du premier couplage, est équivalente à celle de la résine, évitant ainsi de favoriser le couplage d'un acide aminé par rapport à un autre. Au cours du deuxième couplage, la quantité d'acides aminés est en excès de 2 par rapport celle de la résine. Les acides aminés sont mis en solution et sont représentés à chaque position en quantité équimolaire. Les chaînes latérales sont protégées par les groupements classiques.(Arg (Tos), Asp (OChx), Glu (OChx), His (DNP), Lys (2 -ClZ), Met (O), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Tyr(BrZ)).

3 - Déprotection

a - Déprotection des peptides et des lipopeptides

Le clivage du peptide de la résine et la déprotection des chaînes latérales se font par action de l'acide fluorhydrique (HF). La déprotection a lieu selon un mécanisme SN1 et libère des carbocations. Il est donc nécessaire de rajouter des molécules (p-crésol et p-thiocrésol) qui vont piéger ces carbocations pour éviter tout risque d'acylation ou d'alkylation. Après élimination de l'HF, le mélange résine/peptide déprotégé est lavé à l'éther diéthylique. Le p-crésol, le p-thiocrésol ainsi que les résidus de déprotection sont solubles dans ce solvant. Ils sont éliminés lors de lavages successifs par l'éther. Le peptide, soluble dans le TFA, est extrait par une précipitation TFA/éther et séparé de la résine. Après centrifugation, le précipité est solubilisé par de l'acide acétique 5%. Cette solution est ensuite lyophilisée et donne un peptide brut à purifier. Il est à noter que la présence d'un acide palmitique, dans les lipopeptides n'augmente pas l'hydrophobicité apparente du peptide.

b - Déprotection des mélanges combinatoires

Le clivage du peptide de la résine et la déprotection des chaînes latérales sont réalisés par action de l'acide fluorhydrique par un traitement appelé "low et high HF". Afin d'éviter tout risque de réactions secondaires (alkylations ou acylations), il faut d'abord opérer dans un mélange contenant 25% d'HF et 75% d'un mélange de molécules "pièges". Le mélange proposé par Merrifield (Tam et coll. 1983) contient le p-crésol, le p-thiocrésol et le diméthylsulfure (low HF). Dans ce milieu la réaction est de type SN₂ et la formation de carbocations est évitée. Une deuxième étape appelée "high HF" où la concentration d'HF est augmentée à 90% assure la déprotection totale des chaînes latérales (cyclohexyle, tosyl). Le mécanisme de la réaction est de type SN₁, libérant des carbocations qui sont piégés par le p-crésol et le p-thiocrésol. La suite du traitement est la même que celle effectuée pour les peptides classiques. Après centrifugation, le précipité est récupéré et deux autres précipitations TFA/éther sont réalisées. Les solutions sont ensuite lyophilisées. Chaque synthèse combinatoire aboutissant à un mélange de peptides, aucune purification ultérieure n'est possible.

Il faut noter que pour les mélanges contenant des histidines, une étape supplémentaire de déprotection est nécessaire avant de réaliser la coupure HF. Le groupement 2,4-dinitrophényle de l'histidine est un groupement semi-permanent qui résiste à l'action des acides forts. Il est clivé par une thiololyse au β-mercaptoéthanol alors que le peptide est encore ancré sur son support.

4 - Purification

a - Purification des peptides

La purification des peptides se fait par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) préparative en phase inverse sur une colonne dont le support est constitué de billes de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes hydrocarbonées comportant 18 carbones (phase C18). Un gradient linéaire de 100

minutes pour passer de 0 à 100% de solvant B (solvant A : eau/TFA 0,05% ; solvant B : eau/acétonitrile /TFA 40/60/0,05%, v/v) est réalisé. Les différentes fractions obtenues sont ensuite récupérées et analysées.

b - Purification des lipopeptides

Pour la purification des lipopeptides, la technique employée est la même que celle utilisée pour les peptides (CLHP préparative en phase inverse). Cependant l'acylation du peptide par une chaîne saturée comportant 16 carbones (acide palmitique) entraîne des modifications des propriétés physicochimiques. Il est donc nécessaire d'adapter les conditions de purification à ces nouvelles propriétés. La phase C18 est remplacée par une phase dont les chaînes hydrocarbonées greffées sont plus courtes (C4). La concentration de l'acétonitrile, solvant polaire, est augmentée et passe de 60 à 80%. Les conditions d'élution sont identiques à celles précédemment décrites pour les peptides.

5 - Caractérisation

Les fractions obtenues lors de la purification sont contrôlées par CLHP analytique en phase inverse et spectrométrie de masse. Une hydrolyse acide totale (HAT) suivie d'une analyse d'acides aminés est ensuite effectuée sur le peptide purifié. Pour les mélanges combinatoires, l'hétérogénéité du mélange final rend impossible l'analyse par CLHP. La seule caractérisation pour ces mélanges est l'analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale.

II - MATERIELS ET METHODES

1 - Réactifs utilisés

Acétonitrile : Scharlau - Acide acétique : Merck - Acide chlorhydrique : Merck - Acide fluorhydrique (HF) : Setic Labo - Acide formique : Prolabo - Acide palmitique : Merck - Acide trifluoroacétique (TFA) : Jansen Chemica - Anhydride acétique : Jansen Chemica - β -mercaptoéthanol : Jansen Chemica - tBOC-acides aminés : Novabiochem - Hexafluorophosphate de benzotriazoloxyltrisdiméthylaminophosphonium (BOP) : Richelieu Biotechnologies - p-crésol : Aldrich - Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) : Jansen Chemica - Dichlorométhane (DCM) : Lambert et Rivière - Diisopropyléthylamine (DIEA) : Aldrich - Diméthylsulfure : Jansen Chemica - Diméthylsulfoxyde : Jansen Chemica - Diméthylformamide (DMF) : Jansen Chemica - Ethanol : Carlo Erba - Hydroxybenzotriazole (HOBt) : Jansen Chemica - Méthanol : Carlo Erba - N-méthylpyrrolidone (NMP) : Aldrich - Nitrocellulose : Schleicher et Schuell - Phénol : Aldrich - Pipéridine : Aldrich - Réactifs de Kaiser : Applied Biosystems - Résine MBHA : Applied Biosystem et Novabiochem - p-thiocrésol : Aldrich.

2 - Synthèses

a - Formation d'une résine MBHA-lysine-palmitoyle

5g de résine MBHA (charge : 0,77 meq/g), soit 3,85 mmoles, sont neutralisés par de la DIEA à 5% dans du DCM (1 fois 2 mn puis 1 fois 10 mn) et lavés au DCM (3 fois 2 mn), dans un réacteur manuel (Asti). La lysine α (NH₂-Boc)- ϵ (NH₂-Fmoc) est mise en solution avec le BOP, l'HOBt et la DIEA dans un mélange NMP/DCM (70/30 ; v/v) et est couplée sur la résine. Chaque réactif est introduit en excès de 2,5 (9,63 mmoles) par rapport à la quantité initiale de résine. Après 90 mn de couplage sous agitation, un test de Kaiser qualitatif à la ninhydrine est réalisé. La transparence de la solution indique qu'il ne reste plus de fonctions NH₂ libres. Une acétylation (1 fois 10 mn) à l'anhydride acétique est cependant effectuée. Le groupement Fmoc de la fonction ϵ NH₂ de la lysine est ensuite clivé par la pipéridine à 20% dans la NMP (1 fois 20 mn). L'acide palmitique est alors

mis en solution avec le BOP, l'HOBt et la DIEA dans un mélange NMP/DCM (70/30 ; v/v) et introduit dans le réacteur. Chaque réactif est introduit en excès de 2,5 (9,63 mmoles) par rapport à la quantité initiale de résine. Après 60 mn de couplage sous agitation, un test de Kaiser qualitatif à la ninhydrine est réalisé. La coloration bleue de ce test nous indique qu'il reste des fonctions libres dans le milieu. Un deuxième couplage est alors réalisé dans les mêmes conditions que précédemment, pendant 60 mn. Le test de Kaiser donne cette fois une solution transparente, et une acétylation à l'anhydride acétique est réalisée (1 fois 10 mn). La synthèse va ensuite se dérouler classiquement sur la fonction α NH₂ de la résine MBHA-lysine α (NH₂-Boc)- ϵ (NH₂-acide palmitique)

b - Synthèse classique en phase solide

La synthèse des peptides et lipopeptides en phase solide est réalisée par un synthétiseur de peptides automatique 430A (Applied Biosystem) avec une stratégie Boc/benzyle sur une résine MBHA dont la charge est de 0,77meq/g. La quantité de résine de départ est de 0,5 mmole et celle des acides aminés est de 2 mmoles à chaque couplage. La synthèse est effectuée en double couplage (DCC/HOBt, 1M/1M) avec une acétylation systématique.

c - Synthèse des mélanges combinatoires

La synthèse des peptides en mélange combinatoire est réalisée par un synthétiseur de peptides automatique 430A dont les programmes ont été modifiés au laboratoire. Les synthèses sont réalisées selon la stratégie Boc/benzyle, en double couplage (DCC/HOBt, 0,5M/0,5M) sur une résine MBHA (0,77meq/g). La quantité de résine de départ est de 0,5 mmole et celle des acides aminés est de 0,5 mmole pour le premier couplage et de 1 mmole pour le second. Les acides aminés sont en quantité équimolaire dans le mélange et sont amenés directement en solution (3 ml) sur le synthétiseur. Cette stratégie permet d'éviter l'incorporation préférentielle d'un acide aminé par rapport à un autre.

Pour introduire 3 acides aminés en une position, ceux-ci sont mélangés à raison de 1 mmole de chaque constituant. Ces 3 mmoles d'acides aminés sont mises en solution dans 9ml (1mmol dans 3ml) d'un mélange de DCM/NMP (70/30, v/v). Pour le premier couplage, 1,5ml de la solution d'acides aminés (0,5mmole) sont prélevés auxquels 1,5ml de solution de DCM/NMP sont ajoutés pour obtenir un volume final de 3ml. Pour le deuxième couplage, 3ml de la solution d'acides aminés (1 mmole) sont directement mis sur le synthétiseur.

3 - Déprotections

a - Déprotection des histidines-(2,4) dinitrophényle

La déprotection des histidine-DNP est réalisée par action du β -mercaptoéthanol en présence de DIEA dans le DMF (20/10/70, v/v/v). La thiolysé dure pendant 2 heures sous agitation. La résine est ensuite lavée avec du DMF (2 fois 1 minute), puis une deuxième déprotection avec le même mélange est réalisée pendant 2 heures sous agitation. La peptidylrésine est lavée avec dans un premier temps avec du DMF (2 fois 1 minute), puis avec du DCM (2 fois 1 minute).

b - Coupure HF

Le clivage du peptide de la résine et la déprotection des chaînes latérales sont réalisés par action de l'acide fluorhydrique (HF) concentré selon la technique du "high" ou du "low et high" HF.

α - "Low" HF

1 gramme de peptidylrésine est mis dans un réacteur en polytétrafluoroéthylène en présence de 1 gramme de molécules "pièges" (para-crésol/para-thiocrésol, 75/25, p/p). A ce mélange est ajouté du diméthylsulfure puis de l'HF (75/25, v/v), dans un volume final de 10ml. L'HF est ajouté par distillation en

utilisant la méthode de la paroi froide (chaîne HF Asti-Courbevoie, France). Le réacteur est plongé dans l'azote liquide et la réaction a lieu pendant 3 heures à 0°C. L'HF est ensuite éliminé par distillation sous vide.

Le produit obtenu est précipité à l'éther diéthylique, récupéré sur un fritté (n°4), lavé abondamment à l'éther puis séché sous vide. La peptidylrésine est remise dans un nouveau réacteur pour subir le traitement "high" HF.

β - "High" HF

La peptidylrésine est remise dans un réacteur en présence de 1 gramme de molécules "pièges" (para-crésol/para-thiocrésol, 75/25, p/p) qui vont piéger les carbocations libérés par la déprotection des chaînes latérales. A ce mélange sont ajoutés 10ml d'HF par la même méthode de distillation que celle utilisée pour le "low" HF. La réaction a lieu pendant 2 heures à 0°C. L'HF est ensuite éliminé par distillation sous vide.

Le produit obtenu est précipité à l'éther diéthylique, récupéré sur un fritté (n°4), lavé abondamment à l'éther. Les peptides sont extraits par une précipitation au TFA pur dans l'éther. Des centrifugations (3000tr/mn pendant 10 minutes) permettent de récupérer les peptides. Si les peptides sont en mélange combinatoire, alors une nouvelle précipitation TFA/éther est réalisée. Les peptides sont ensuite récupérés dans de l'acide acétique à 5% dans le DCM, puis lyophilisés.

4 - Purification

La purification des peptides et lipopeptides est réalisée par CLHP préparative en phase inverse. Les colonnes sont constituées de silice greffée par des chaînes tertiobutyliques (Nucléosyl C18, diamètre 5 μ m, porosité 100Å / Vydac C4, diamètre 7 μ m, porosité 300Å).

a - Purification des peptides

Le peptide est purifié en déposant de 200 à 250mg de peptide brut solubilisé dans 3ml d'acide formique 20%, sur une colonne C18 (diamètre 25mm, longueur 25cm). Le dépôt se fait par 2 injections de 1,5ml. Le débit est de 3ml/mn et le gradient de solvant B (eau/acétonitrile/TFA, 40/60/0,05%, v/v/v) démarre dès que l'acide formique est élué dans le solvant A (eau/TFA 0,05%). Le gradient linéaire de concentrations croissantes en solvant B est de 1%/minute. Le profil de l'élution est enregistré à une longueur d'onde de 235nm.

b - Purification des lipopeptides

Le peptide est purifié en déposant de 100 à 150mg de peptide brut solubilisé dans 2ml d'acide formique 20%, sur une colonne C4 (diamètre 9mm, longueur 50cm). Le dépôt se fait par 2 injections de 1ml. Le débit est de 1,5ml/mn et le gradient de solvant B (eau/acétonitrile/TFA, 20/80/0,05%, v/v/v) démarre dès que l'acide formique est élué dans le solvant A (eau/TFA 0,05%). Le gradient de concentrations croissantes en solvant B est de 1%/minute. Le profil de l'élution est enregistré à une longueur d'onde de 235nm.

5 - Caractérisation

Les peptides ont été caractérisés aux moyens des critères habituels : chromatographie liquide haute pression en phase inverse analytique, spectrométrie de masse et analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale.

a - CLHP analytique en phase inverse

Le principe de la CLHP analytique en phase inverse est le même que celui de la CLHP préparative. La phase et les solvants sont identiques à ceux utilisés en purification. La quantité de peptide injectée est cependant nettement inférieure (5 à 20 µl d'une solution où la concentration du peptide est d'environ 1mg/ml). Le gradient linéaire de solvant B (60% d'acétonitrile pour les peptides et 80% pour

les lipopeptides) est de 2%/minute. Le débit est de 0,7 ml/mn. Le profil de l'élution est enregistré à 215nm.

Les tubes contenant le peptide purifié sont ensuite réunis et une dernière injection est faite pour vérifier l'homogénéité et la pureté du peptide.

b - Spectrométrie de masse

Les spectres de masse sont enregistrés sur un spectromètre de masse à temps de vol et desorption de plasma BIO-ION 20 (Upsala, Suède). Les spectres sont accumulés pendant 10^6 coups d'une source de californium 252 qui se décompose en Technicium 106 et Baryum 142. Les ions formés sont accélérés grâce à une différence de potentiel de 15 keV et séparés dans un tube où règne le vide. 20µl de solution peptidique, à environ 1 mg/ml, sont déposés sur un foil (cible de Mylar aluminisée) sur lequel ont été déposés auparavant 20 µl de nitrocellulose dans l'acétone (20 mg/ml). Cette dernière a la propriété d'adsorber les peptides.

c - Analyse d'acides aminés

Une petite quantité de peptide est hydrolysée par de l'acide chlorhydrique 6N à 100°C pendant 24 heures dans un tube scellé sous vide en présence de phénol. Ce dernier sert à protéger les sérines, thréonines et tyrosines de l'oxydation. Le mélange d'acides aminés obtenu est analysé par un analyseur Beckman type 7300. Les acides aminés sont séparés et dosés par colorimétrie. Les pics obtenus sont identifiés par leur temps de rétention par rapport à un standard.

III - RESULTATS

1 - CLHP préparative en phase inverse

La chromatographie liquide haute pression en phase inverse préparative, permet la purification des peptides et des lipopeptides. Les chromatogrammes que nous avons obtenus pour les différents peptides sont représentés figures 22 et 23. Les temps d'élution que nous observons sont les suivants :

peptide 190-211 : entre 55 et 60% de solvant B à 60%

lipopeptide 190-211 : entre 66 et 71% de solvant B à 80%

peptide 115-131 : entre 51 et 59% de solvant B à 60%

lipopeptide 115-131 : entre 60 et 65% de solvant B à 80%

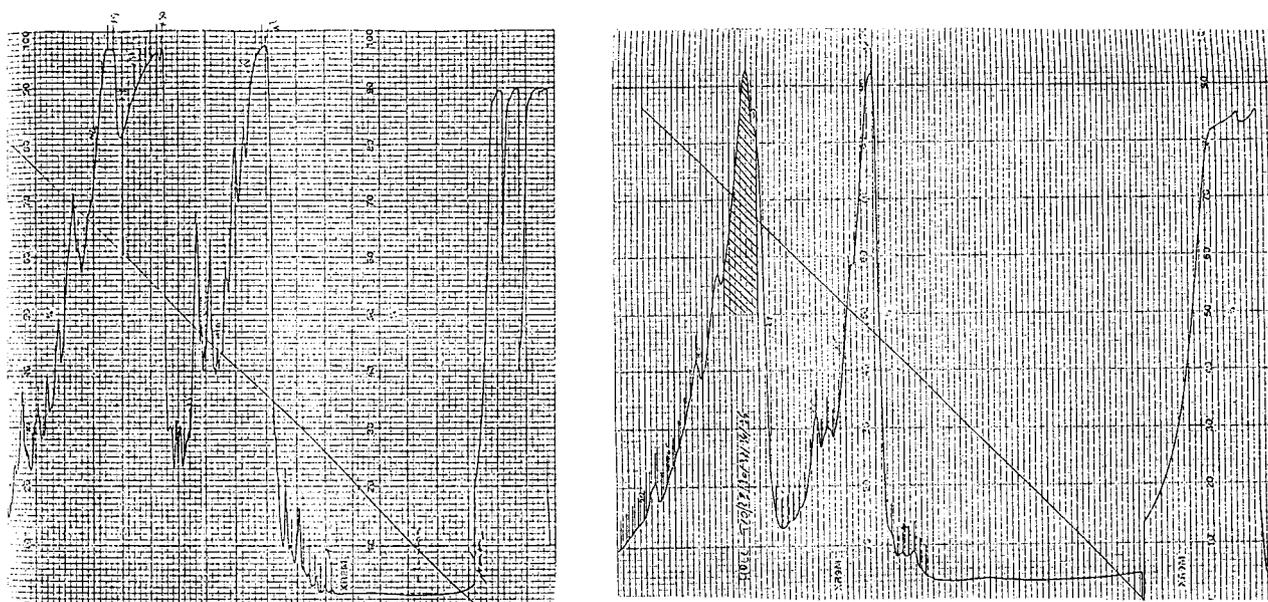


Figure 22 : Profils de chromatogrammes obtenus par CLHP préparative en phase inverse du peptide 190-211 (à gauche) et du lipopeptide 190-211 (à droite).

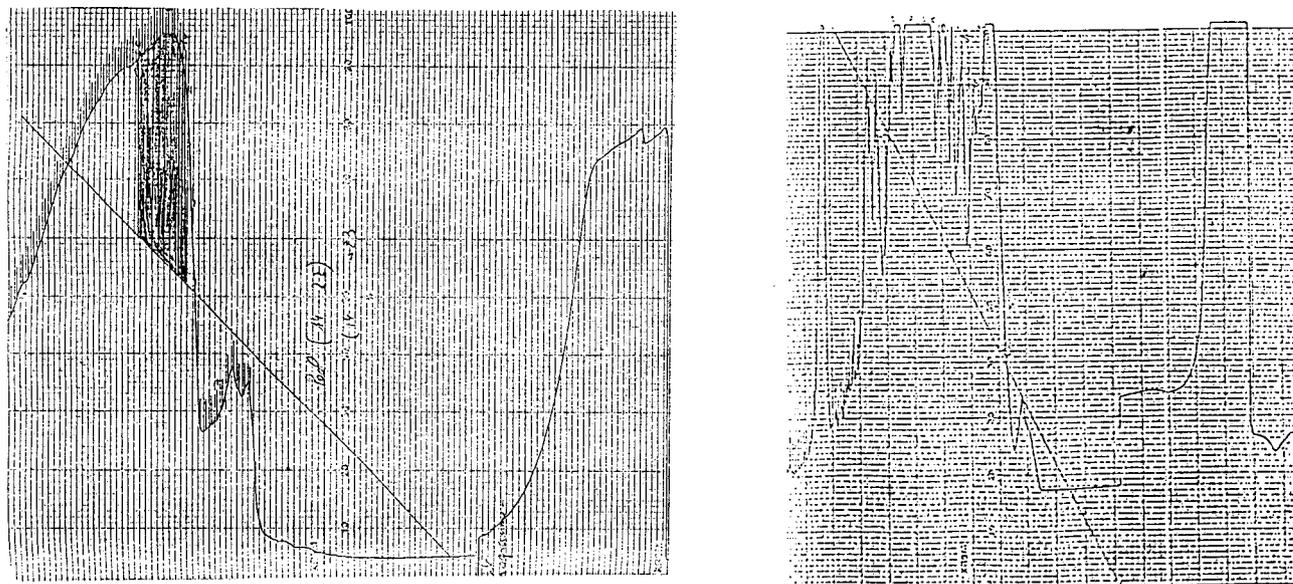


Figure 23 : Profils de chromatogrammes obtenus par CLHP préparative en phase inverse du peptide 115-131 (à gauche) et du lipopeptide 115-131 (à droite).

2 - CLHP analytique en phase inverse

La chromatographie liquide haute pression en phase inverse analytique, permet de vérifier l'homogénéité et la pureté des peptides et des lipopeptides. Les chromatogrammes que nous avons obtenus pour les différents peptides sont représentés figures 24 et 25. Les temps d'élution que nous observons sont les suivants :

peptide 190-211 :	19,23 minutes
lipopeptide 190-211 :	23,56 minutes
peptide 115-131 :	18,66 minutes
lipopeptide 115-131 :	20,20 minutes

Il faut rappeler que le solvant B est constitué de 60% d'acétonitrile pour les peptides, et de 80% pour les lipopeptides.

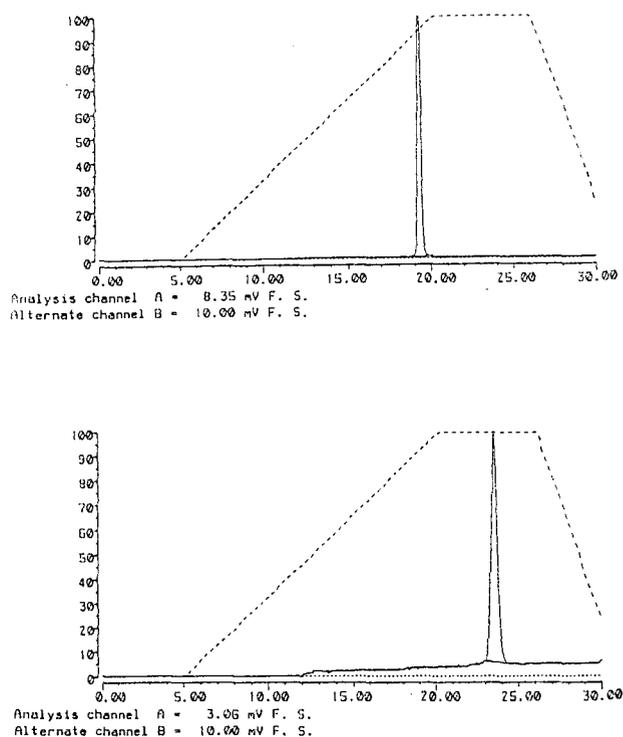


Figure 24 : Profils de chromatogrammes obtenus par CLHP analytique en phase inverse du peptide 190-211 (en haut) et du lipopeptide 190-211 (en bas).

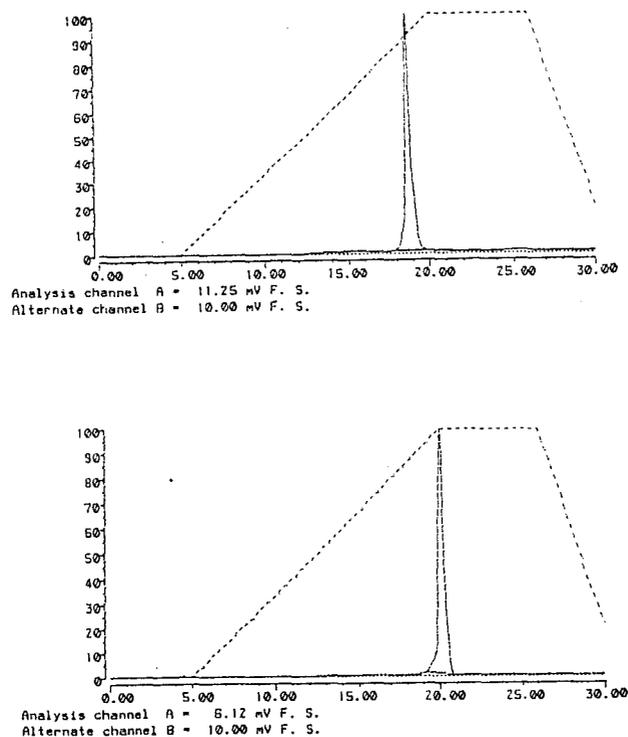


Figure 25 : Profils de chromatogrammes obtenus par CLHP analytique en phase inverse du peptide 115-131 (en haut) et du lipopeptide 115-131 (en bas).

3 - Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet de vérifier que le peptide obtenu est bien celui que nous attendions. Les spectres de masse obtenus pour le peptide et le lipopeptide 190-211 sont illustrés figure 26, et ceux des peptide et lipopeptide 115-131 figure 27.

La masse obtenue pour le peptide 190-211 est de $M/Z = 2448,1$ pour une masse attendue de 2446,2. Celle du lipopeptide 190-211 est de $M/Z = 2813,3$ pour une masse attendue de 2812,36 (figure 26).

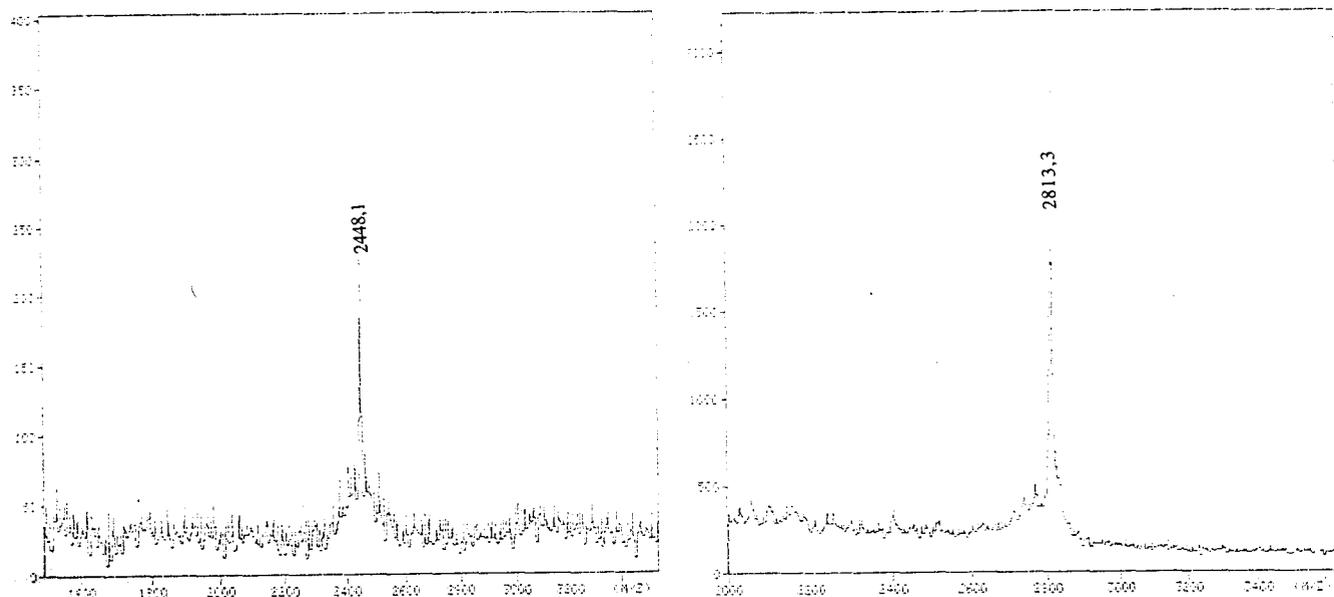


Figure 26 : Spectres de masse du peptide 190-211 (à gauche) et du lipopeptide 190-211 (à droite)

La masse obtenue pour le peptide 115-131 est de $M/Z = 2226,4$ pour une masse attendue de 2225,53. Nous avons en plus une masse de 2248,5 correspondant à la masse du peptide plus une molécule de sodium. La masse obtenue pour le lipopeptide 115-131 est de $M/Z = 2420,8$ pour une masse attendue de 2419,94 (figure 27).

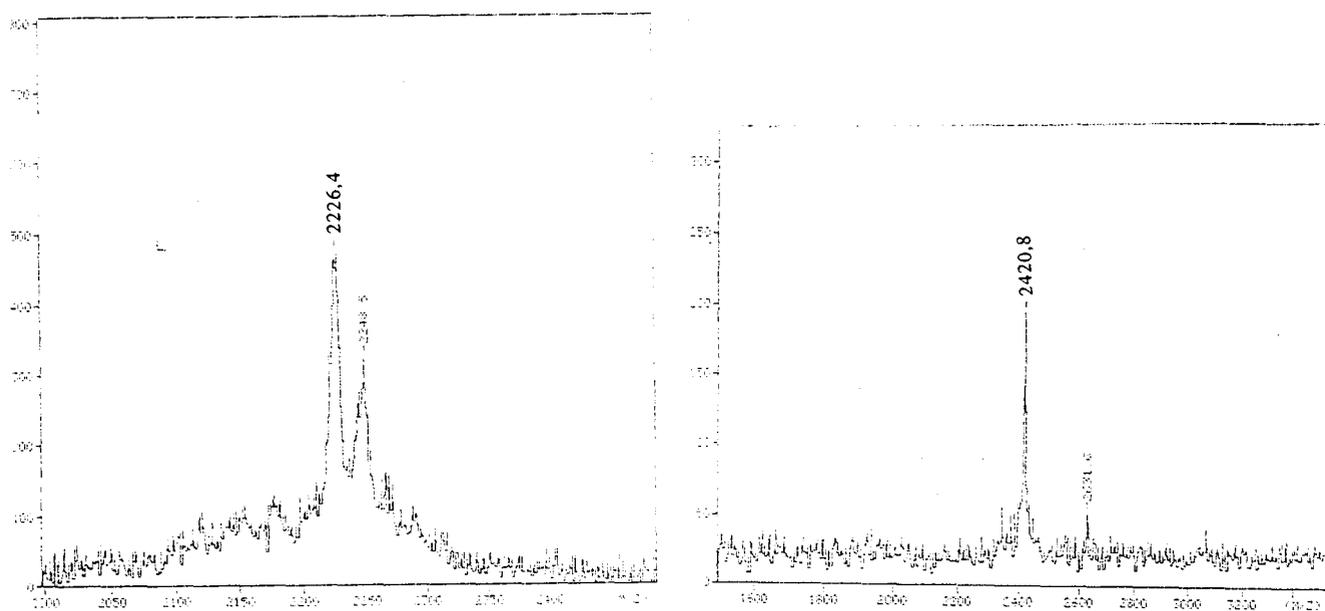


Figure 27 : Spectres de masse du peptide 115-131 (à droite) et du lipopeptide 115-131 (à gauche)

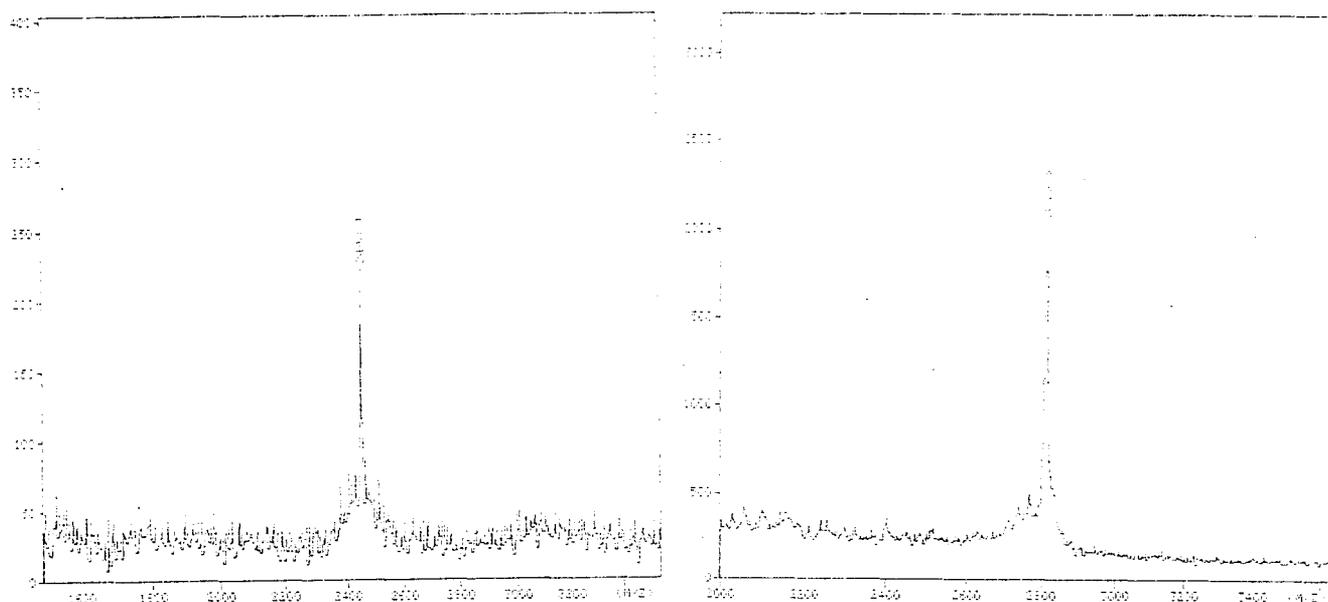


Figure 26 : Spectres de masse du peptide 190-211 (à gauche) et du lipopeptide 190-211 (à droite)

La masse obtenue pour le peptide 115-131 est de $M/Z = 2226,4$ pour une masse attendue de 2225,53. Nous avons en plus une masse de 2248,5 correspondant à la masse du peptide plus une molécule de sodium. La masse obtenue pour le lipopeptide 115-131 est de $M/Z = 2420,8$ pour une masse attendue de 2419,94 (figure 27).

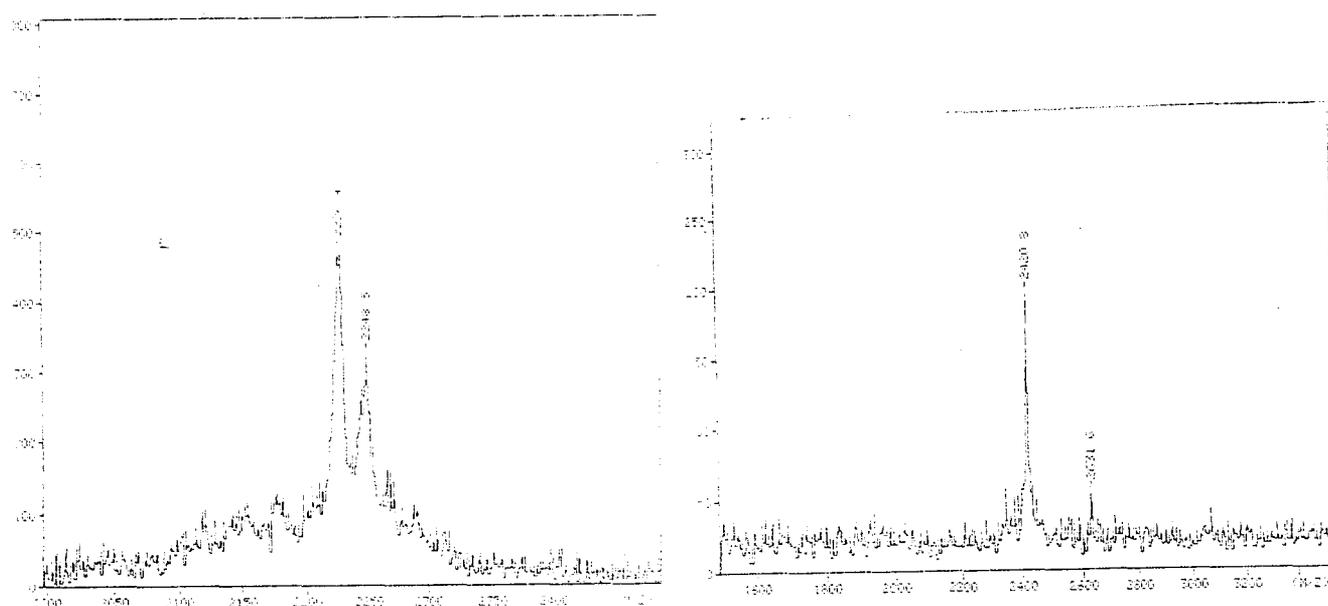


Figure 27 : Spectres de masse du peptide 115-131 (à droite) et du lipopeptide 115-131 (à gauche)

4 - Analyse d'acides aminés

L'analyse d'acides aminés nous permet de vérifier la composition en acides aminés des peptides. Les résultats obtenus par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale des peptide et lipopeptide 190-211 et ceux des peptide et lipopeptide 115-131 sont représentés respectivement dans les tableaux 4 et 5.

A.A. (peptide 190-211)	nmoles	trouvé	théo.	taux	A.A. (lipopeptide 190-211)	nmoles	trouvé	théo.	taux
Asp	1,88	1,84	2	0,92	Asp	2,28	2,02	2	1,01
Thr	0,87	0,85	1	0,85	Thr	0,91	0,81	1	0,81
Tyr	0,96	0,94	1	0,94	Tyr	1,06	0,94	1	0,94
Ser	2,72	2,67	3	0,89	Ser	3,01	2,67	3	0,89
Glu	1,04	1,02	1	1,02	Glu	1,22	1,08	1	1,08
Ala	3,05	2,99	3	1,00	Ala	3,32	2,94	3	0,98
Phe	1,09	1,07	1	1,07	Phe	1,12	0,99	1	0,99
Leu	3,78	3,71	4	0,93	Leu	4,55	4,03	4	1,01
Lys	1,05	1,03	1	1,03	Lys	2,37	2,10	2	1,05
Arg	2,13	2,09	2	1,04	Arg	2,36	2,09	2	1,05
Pro	3,27	3,21	3	1,07	Pro	3,44	3,05	3	1,02

Tableau 4 : Analyse d'acides aminés du peptide et du lipopeptide 190-211. Le taux correspond au nombre de nmoles calculées/nombre de nmoles théoriques. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

A.A. (peptide 115-131)	nmoles	trouvé	théo.	taux	A.A. (lipopeptide 115-131)	nmoles	trouvé	théo.	taux
Asp	0,83	0,98	1	0,98	Asp	1,24	1,02	1	1,02
Thr	0,74	0,87	1	0,87	Thr	1,15	0,95	1	0,95
Glu	4,29	5,05	5	1,01	Glu	6,45	5,31	5	1,06
Gly	0,84	0,99	1	0,99	Gly	1,24	1,02	1	1,02
Ile	1,63	1,92	2	0,96	Ile	2,37	1,95	2	0,97
Leu	0,83	0,98	1	0,98	Leu	1,23	1,01	1	1,01
Lys	4,30	5,06	5	1,01	Lys	6,27	5,16	5	1,03
Pro	0,85	1,00	1	1,00	Pro	1,24	1,02	1	1,02

Tableau 5 : Analyse d'acides aminés du peptide et du lipopeptide 115-131. Le taux correspond au nombre de nmoles calculées/nombre de nmoles théoriques. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

Les résultats des analyses d'acides aminés pour les mélanges de peptides obtenus par synthèse combinatoire des peptide 190-211 et 115-131 sont récapitulés respectivement dans les tableau 6 et 7.

A.A.	nmoles	calc.	théo.	taux	A.A.	nmoles	calc.	théo.	taux
(10 ⁶ peptides)					(10 ⁹ peptides)				
Asp	6,11	6,43	6,12	1,05	Asp	5,47	8,41	7,94	1,06
Thr	1,62	1,71	2,04	0,84	Thr	3,67	5,64	6,35	0,89
Tyr	1,76	1,86	2,04	0,91	Tyr	1,96	3,01	3,17	0,95
Ser	11,26	11,85	14,28	0,83	Ser	6,13	9,43	11,1	0,85
Gly	6,34	6,68	6,12	1,09	Gly	3,34	5,14	4,76	1,08
Glu	7,61	8,01	8,16	0,98	Glu	4,09	6,29	6,35	0,99
Ala	12,45	13,11	12,25	1,07	Ala	12,5	19,24	19,05	1,01
Phe	4,19	4,41	4,08	1,08	Phe	2,20	3,39	3,17	1,07
Ile	7,61	7,99	8,16	0,98	Ile	3,88	5,97	6,35	0,94
Leu	9,51	10,0	10,2	0,98	Leu	6,13	9,42	9,52	0,99
Met	7,67	8,08	8,16	0,99	Met	3,92	6,03	6,35	0,95
Lys	6,34	6,67	6,12	1,09	Lys	3,22	4,95	4,76	1,04
Arg	5,98	6,30	6,12	1,03	Arg	3,03	4,66	4,76	0,98
Pro	6,05	6,36	6,12	1,04	Pro	5,37	8,26	7,94	1,04
					His	1,02	1,57	1,59	0,99

Tableau 6 : Analyse d'acides aminés des peptides en mélange combinatoire issu du peptide 190-211. Ce tableau récapitule le nombre de nmoles trouvées (nmoles), calculées (calc) et théoriques (théo). Le taux correspond au nombre de nmoles calculées/nombre de nmoles théoriques. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

A.A.	nmoles	calc.	théo.	taux	A.A.	nmoles	calc.	théo.	taux
(10 ⁵ peptides)					(10 ⁷ peptides)				
Asp	11,82	15,15	15	1,01	Asp	4,01	14,84	14	1,06
Thr	1,81	2,31	2,5	0,92	Thr	0,46	1,72	2	0,86
Ser	1,73	2,22	2,5	0,88	Ser	0,93	3,41	4	0,85
Gly	1,99	2,55	2,5	1,02	Gly	0,55	2,06	2	1,03
Glu	17,55	22,5	22,5	1,00	Glu	5,88	21,78	22	0,99
Ala	1,99	2,55	2,5	1,02	Ala	1,64	6,06	6	1,01
Ile	5,67	7,27	7,5	0,97	Ile	1,59	5,88	6	0,98
Leu	5,73	7,35	7,5	0,98	Leu	1,60	5,94	6	0,99
Val	3,82	4,9	5	0,98	Val	1,05	3,88	4	0,97
Met	1,93	2,47	2,5	0,99	Met	0,51	1,91	2	0,95
Lys	9,84	12,62	12,5	1,01	Lys	2,73	10,1	10	1,01
Arg	10,04	12,87	12,5	1,03	Arg	2,65	9,81	10	0,98
Pro	1,99	2,55	2,5	1,02	Pro	0,55	2,04	2	1,02
					His	2,14	9,91	10	0,99

Tableau 7 : Analyse d'acides aminés des peptides en mélange combinatoire issu du peptide 115-131. Ce tableau récapitule le nombre de nmoles trouvées (nmoles), calculées (calc) et théoriques (théo). Le taux correspond au nombre de nmoles calculées/nombre de nmoles théoriques. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

C - TESTS IMMUNOLOGIQUES

I - MATERIEL ET METHODES

1- Matériel utilisé

a - Animaux

Les souris Balb/c (H-2d), les rats Fischer, et les lapins Néo-zélandais proviennent de chez Iffa Credo (L'Arbresle, France). Les souris et les rats sont âgés d'environ 6 semaines au début des expériences. Les lapins pèsent 3,5kg.

b - Sérums humains

Les sérums humains proviennent d'individus kényans infestés par *Schistosoma mansoni*. Ils nous ont été fournis par J.M. Grzych (Institut Pasteur de Lille).

c - Réactifs

Acétonitrile : Scharlau - Acide acétique : Merck - Acide citrique : Aldrich - Acide sulfurique : Prolabo - Acrylamide : Sigma - Bis-acrylamide : Kodak - Adjuvant de Freund : Difco, Détroit - Anti-IgG de souris : Diagnostic Pasteur - Anti-IgG humaine : Diagnostic Pasteur - Anti-IgG de lapins : Diagnostic Pasteur - Anti-IgG de rats : Sigma - Bleu de bromophénol : Bio-Rad - Bleu de Coomassie R250 : Sigma - β -mercaptoéthanol : Jansen - Disodium carbonate : Aldrich - Sodium hydrogénocarbonate : Aldrich - 4,Chloro,1,naphthol : Bio-Rad - Chlorure de sodium : Merck - Dithiothréitol (DTT) : Sigma - Eau oxygénée : Prolabo - Ethanol : Carlo Erba - Formaldéhyde : Prolabo - Glutaraldéhyde : Fluka - Glycerol : Prolabo - Glycine : Prolabo - Imalgène : Rhône-Mérieux - Lait écrémé en poudre : Gloria - Méthanol : Carlo Erba - Nitrate d'argent : Prolabo - Nitrocellulose : Schleicher et Schuell - Orthophénylène-diamine (OPD) : Sigma - Disodium hydrogénophosphate : Aldrich - Plaques de microtitration : Nunc, Danemark - Sodium dihydrogénophosphate : Aldrich - Persulfate d'ammonium : Sigma - Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) : Analar Biochemical -

Tétraméthyléthylènediamine (Temed) : Sigma - Thiocyanate d'ammonium : Sigma - Tris : Prolabo - Tween20 : Sigma - Ultrosor : BioSeptra - Valium : Roche.

2 - Protocoles d'immunisation

a - Immunisation sous-cutanée

α - Immunisation des souris

Les souris sont immunisées par 4 injections des différentes constructions peptidiques (100µg à la première immunisation, 50µg par la suite), solubilisées dans 100µl d'eau distillée en présence de 100µl d'adjuvant de Freund (adjuvant complet (CFA) à la première injection et adjuvant incomplet (IFA) par la suite). Les immunisations sont réalisées à la base de la queue par injection sous-cutanée à 15 jours d'intervalle.

β - Immunisation des rats

Les rats (Fischer) sont immunisés par 4 injections du lipopeptide 190-211 (200µg à la première immunisation, 100µg par la suite), solubilisé dans 100µl d'eau distillée en présence de 100µl d'adjuvant de Freund (adjuvant complet (CFA) à la première injection et adjuvant incomplet (IFA) par la suite). Les immunisations sont réalisées à la base de la queue par injection sous-cutanée à 15 jours d'intervalle.

b - Hyper-immunisation de lapins

Les lapins sont immunisés par 3 injections du mélange de peptides combinatoires dérivé du peptide 190-211 contenant $9 \cdot 10^9$ peptides (2mg à la première immunisation, 1mg par la suite), solubilisé dans 1ml d'eau distillée en présence de 1ml d'adjuvant de Freund (adjuvant complet (CFA) à la première injection et adjuvant incomplet (IFA) par la suite). Les immunisations sont réalisées par injection sous-scapulaire à 1 semaine d'intervalle.

3 - Infestations

Les souris et les rats sont anesthésiés avec un mélange d'Imalgène (125 mg/kg) et de Valium (6,2mg/kg) par injection intra-péritonéale. La technique d'infestation que nous utilisons a été décrite par Smithers, S.R. (1965). Le ventre des animaux est rasé et ceux-ci sont placés dans une gouttière. Un anneau est déposé et scotché sur leur ventre. Cet anneau va permettre d'accueillir 0,5ml d'eau d'aquarium contenant 50 cercaires pour les souris, et 1ml contenant 1000 cercaires pour les rats. Le temps d'exposition des cercaires sur la peau dure 30 minutes.

Les cercaires proviennent d'une souche Porto-Ricaine de *Schistosoma manoni* en élevage à l'institut. L'hôte intermédiaire est le mollusque *Biomphalaria glabatra* et l'hôte définitif est le hamster doré.

4 - Prélèvements des sérums

Les saignées sont faites en rétro-orbitale pour les souris et les rats, et à l'oreille pour les lapins. Les tubes contenant le sang sont mis pendant 2 à 3 heures à 4°C, pour permettre aux globules rouges de coaguler et former un précipité. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 trs/mn pendant 30 minutes. Les surnageants (sérums) sont récupérés et conservés à -20°C.

5 - Test ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay)

Les tests sont réalisés sur des plaques de microtitration de 96 puits. Ces plaques sont recouvertes avec 100µl/puits de peptide (190-211, 115-131 ou un des mélanges combinatoires) (10µg/ml) dans du tampon carbonate/bicarbonate (0,05M/pH 9,6) et sont mises pendant une nuit à 4°C, puis lavées 3 fois avec du tampon phosphate (PBS) (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,01M pH 7,2, NaCl, 0,14M). La

saturation se fait ensuite avec 200µl/puits d'Ultroser à 2% dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Les dilutions des sérums se font en série directement sur la plaque dans la solution PBS-ultroser 2% avec un volume final de 100µl/puits. L'incubation dure 2 heures à 37°C. Les puits ne contenant pas de sérum servent de contrôle négatif. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois avec du PBS contenant du tween20 à 1%. Le conjugué (anti-immunoglobulines de souris, de rats ou d'hommes marquées à la peroxydase, dilués respectivement au 1/5 000, 1/15 000 et 1/10 000) est incubé pendant 2 heures à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois avec du tampon PBS-Tween20 1%. La fixation du conjugué est révélée par addition de 200µl/puits d'orthophénylène diamine (1 pastille dans 25ml de tampon citrate 0,1M pH 5,5 contenant 20µl de H₂O₂ ajoutés extemporanément). La révélation a lieu pendant 30mn dans le noir à température ambiante, puis la coloration est arrêtée en ajoutant 50µl de H₂SO₄ (4N). La densité optique est lue à 492nm avec un lecteur de plaques MR 600 (Dynatech).

6 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide/SDS et Western blot

a - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

La séparation des protéines est effectuée selon la méthode décrite par Laemmli (1970), dans un gel de polyacrylamide 13% contenant 0,1% de SDS dans du tampon Tris-HCl 375 mM à pH 8,8. Le gel de concentration à 5% de polyacrylamide dans du tampon Tris-HCl 125 mM à pH 6,8 contient 0,1% de SDS. Chaque échantillon est dilué au 1/2 dans du tampon Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 3%, glycérol 10%, β-mercaptoéthanol 2,5%, bleu de bromophénol 1%, et mis à bouillir pendant 3 minutes. La migration dure environ 2 heures à 150 V dans le tampon Tris-glycine pH 8,3 contenant du SDS à 0,1%.

b - Immunoélectrotransfert

Après séparation électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose selon la méthode de Towbin et coll. (1979). Trois feuilles de papier Whatman 3M et une feuille de nitrocellulose (porosité : 45 μm) sont immergées quelques minutes dans le tampon de transfert (Tris 20 mM, glycine 150 mM et méthanol 20%). Le gel est placé sur une feuille de papier Whatman 3M et mis en contact direct avec la feuille de nitrocellulose recouverte de les deux autres feuilles de papier Whatman 3M. L'ensemble est mis sur l'appareil de transfert (Transblot, BIO-RAD) de manière à ce que la membrane de nitrocellulose soit vers l'électrode positive. Le transfert est réalisé pendant 40 minutes à 150 mA et 20V.

La membrane de nitrocellulose est découpée en plusieurs bandes. Les marqueurs de poids moléculaires, témoins précolorés, sont conservés à part. Pour éviter les phénomènes d'adsorption non spécifiques, les membranes sont saturées pendant 1 nuit à 4°C sous agitation, avec du PBS 0,01M pH 7,4 contenant 5% de lait écrémé. Les bandes sont ensuite incubées avec les sérums de lapins dilués au 1/10, pendant 3 heures à température ambiante, sous agitation, puis lavées 3 fois avec du tampon PBS 0,01M et 1 fois avec du tampon PBS 0,01M/Tween20 0,05%. La révélation des antigènes reconnus se fait par incubation des bandes de nitrocellulose en présence d'anti-IgG de lapins marquées à la peroxydase et diluées au 1/500, pendant 3 heures à température ambiante, . Après 3 lavages en PBS et 1 lavage en PBS-Tween, les bandes sont révélées par la solution contenant le substrat enzymatique : 4-chloro-1-naphtol (60 mg), méthanol froid (20 ml), PBS 0,01M pH 7,4 (80 ml), eau oxygénée à 30% (100 μl).

Lors des réactions positives apparaissent des bandes de couleur violette correspondant à l'antigène reconnu. Les membranes de nitrocellulose sont rincées à l'eau déminéralisée et photographiées.

c - Coloration des gels au bleu de Coomassie

Le gel est coloré dans une solution à 0,04% de bleu de Coomassie contenant 50% de méthanol et 8% d'acide acétique (20 minutes). La décoloration est faite dans une solution d'acide acétique 8% et de méthanol 20%. Le gel est ensuite photographié et séché sous vide.

d - Coloration des gels au nitrate d'argent

Le gel est coloré selon la méthode de Morrissey (1981). Le gel est trempé successivement dans le préfixateur 1 (méthanol 50%, acide acétique 10%), dans le préfixateur 2 (méthanol 5%, acide acétique 7%) et le fixateur (glutaraldéhyde 10%). Chaque bain dure 30 minutes sous agitation. Le gel est ensuite rincé dans de l'eau déminéralisée pendant 3 heures. Les protéines sont réduites par une solution de DTT à 5 µg/ml (30 minutes), puis le gel est plongé dans une solution de nitrate d'argent 0,1% (30 minutes). Après rinçage dans de l'eau déminéralisée, la coloration est développée dans une solution de bicarbonate de sodium 3% contenant du formaldéhyde 0,018%.

Le développement de la coloration est arrêté dans une solution d'acide citrique 2,3 M (10 minutes). Le gel est lavé à l'eau déminéralisée et conservé dans une solution de carbonate de sodium 0,03%. Il est ensuite photographié et séché sous vide.

II - RESULTATS

1 - Résultats obtenus avec des animaux immunisés

Des rats Fischer et des souris Balb/c sont immunisés par injection sous-cutanée avec le lipopeptide 190-211 ou le lipopeptide 115-131 en présence d'adjuvant de Freund. Les animaux reçoivent 4 injections, chacune à 15 jours d'intervalle (J0, J15, J30 et J45).

a - Evaluation des tests avec des sérums de souris

Les sérums de 20 souris Balb/c immunisées avec le lipopeptide 190-211 ont été testés par ELISA. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 190-211 et les mélanges combinatoires issus de ce peptide. Chaque sérum, dilué du 1/10 au 1/80, est testé contre ces 3 antigènes. Parallèlement, les sérums de 10 souris immunisées avec le lipopeptide 115-131, sont testés contre le peptide 115-131 et les mélanges combinatoires synthétisés à partir de ce peptide. Nous avons tracé les courbes représentant la densité optique (DO) en fonction du temps après la première immunisation, comme l'illustrent, pour exemple, les figures 28 et 29 respectivement.

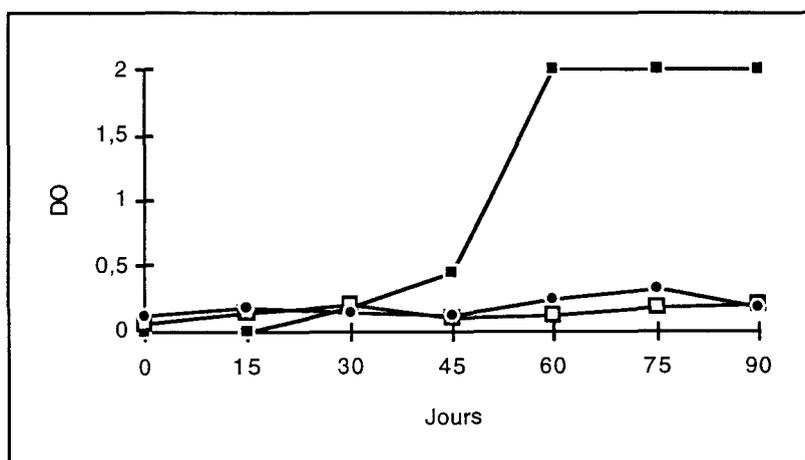


Figure 28 : Résultats des tests ELISA obtenus avec un sérum de souris immunisée par 4 injections de lipopeptide 190-211. La DO est donnée en fonction des jours après la première immunisation (J0). La dilution du sérum est de 1/10. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 190-211 (carrés noirs) et les mélanges combinatoires contenant 10⁶ peptides (carrés blancs) ou 10⁹ peptides (ronds noirs).

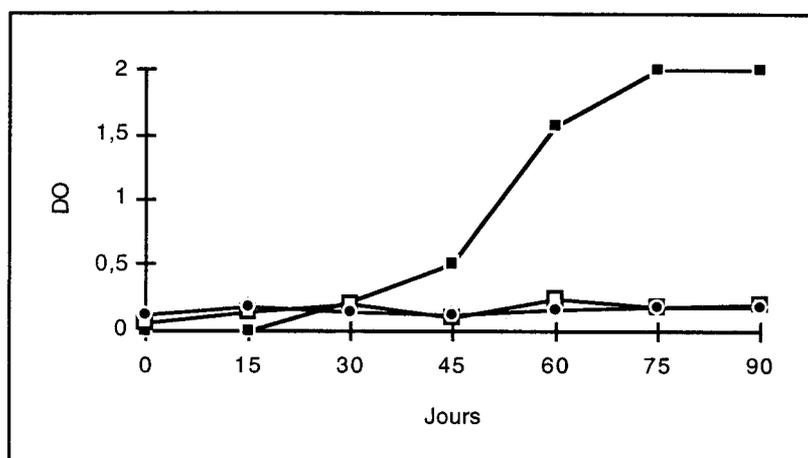


Figure 29 : Résultats des tests ELISA obtenus avec un sérum de souris immunisée par 4 injections de lipopeptide 115-131. La DO est donnée en fonction des jours après la première immunisation (J₀). La dilution du sérum est de 1/10. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 115-131 (carrés noirs) et les mélanges combinatoires contenant 10⁵ peptides (carrés blancs) ou 10⁷ peptides (ronds noirs).

Des résultats identiques à ceux des figures 28 et 29 sont obtenus pour chaque dilution, avec tous les sérums. Ces résultats nous montrent que les anticorps des sérums de souris immunisées ne reconnaissent pas les mixotopes bien qu'ils réagissent avec le peptide original.

Les figures 30 et 31 récapitulent les résultats obtenus avec tous les sérums (prélevés 75 jours après la première injection) de souris immunisées avec le lipopeptide 190-211 et le lipopeptide 115-131, respectivement.

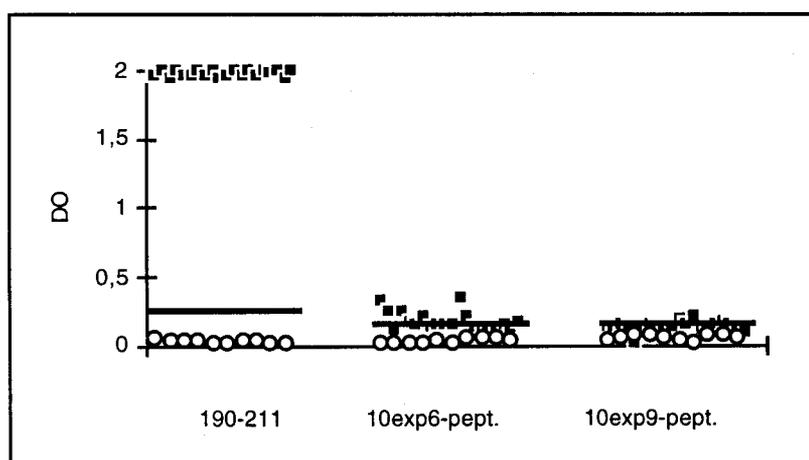


Figure 30 : Résultats obtenus avec les tests ELISA réalisés sur 20 sérums de souris immunisées par 4 injections de lipopeptide 190-211 (carrés) et 10 sérums de souris saines (ronds). La dilution des sérums est de 1/10. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 190-211, et les mélanges combinatoires contenant 10⁶ peptides ou 10⁹ peptides. Le 'cut-off' pour les positifs (moyenne des souris saines + 3 σ) est représenté par une ligne horizontale.

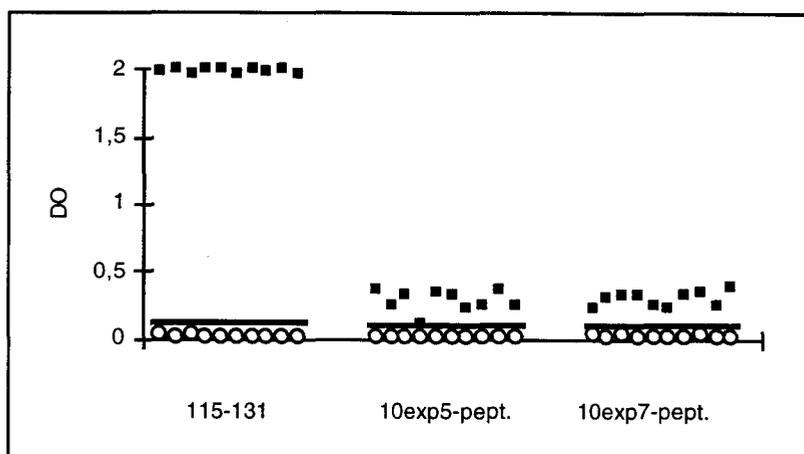


Figure 31 : Résultats obtenus avec les tests ELISA réalisés sur 10 sérums de souris immunisées par 4 injections de lipopeptide 115-131(carrés) et 10 sérums de souris saines (ronds). La dilution des sérums est de 1/10. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 115-131, et les mélanges combinatoires contenant 10^5 peptides ou 10^7 peptides. Le 'cut-off' pour les positifs (moyenne des souris saines + 3σ) est représenté par une ligne horizontale.

Les résultats sont similaires à toutes les autres dilutions et à différents temps de l'expérimentation. Ces graphes nous montrent que les sérums de souris immunisées, que ce soit avec le lipopeptide 190-211 ou le lipopeptide 115-131, ne reconnaissent pas les mixotopes bien qu'ils réagissent avec les séquences initiales des peptides.

b - Evaluation des tests avec des sérums de rats

Les sérums de 6 rats Fischer immunisés par 4 injections de lipopeptide 190-211 ont été testés par ELISA en utilisant comme antigène en phase solide le peptide 190-211 et les mélanges combinatoires contenant 10^6 ou 10^9 peptides.

Une première approche consistant à suivre l'évolution de l'immunisation nous amène à tracer les courbes représentant la DO en fonction du temps après la première injection, comme l'illustre la figure 32. Nous avons ensuite regroupé sous forme de nuages de points, les résultats obtenus avec tous les sérums (prélevés 75 jours après la première injection) de rats immunisés avec le lipopeptide 190-211 (figure 33).

seulement le peptide 190-211, mais aussi le mélange contenant 10^6 peptides obtenu par synthèse combinatoire à partir de la séquence initiale du peptide 190-211. Le signal obtenu avec celui-ci est globalement doublé par rapport à celui obtenu avec le peptide 190-211. En revanche, le mélange le plus dégénéré n'est pas reconnu par les anticorps de sérums de rats immunisés avec le lipopeptide 190-211.

2 - Résultats obtenus avec des animaux infestés

Des rats Fischer et des souris Balb/c ont été infestés par *Schistosoma mansoni*. Leurs sérums sont utilisés pour des tests ELISA en utilisant comme antigène en phase solide le peptide original ou l'un des mixotopes.

a - Evaluation des tests avec des sérums de souris

Les sérums de 30 souris Balb/c infestées par *Schistosoma mansoni* ont été testés par ELISA. Les antigènes en phase solide utilisés sont soit le peptide 190-211, et ses mélanges combinatoires, soit le peptide 115-131 et ses mélanges combinatoires. Les résultats obtenus avec des sérums prélevés 10 semaines après l'infestation sont récapitulés respectivement figures 34 et 35.

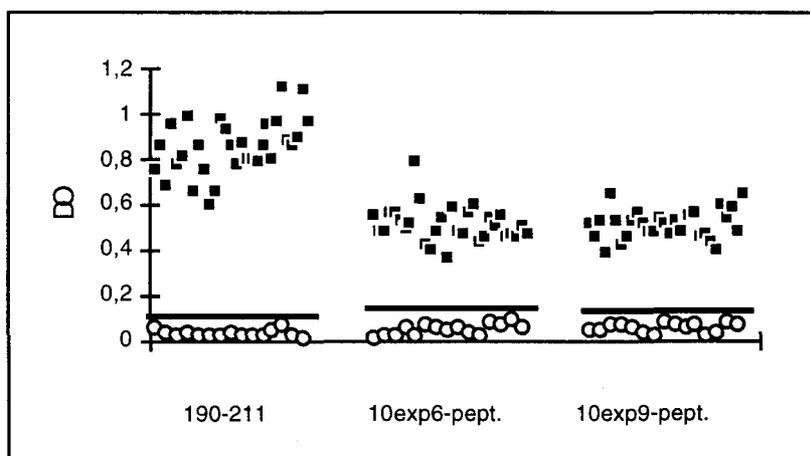


Figure 34 : Résultats obtenus avec les tests ELISA réalisés sur 30 sérums de souris infestées par *Schistosoma mansoni* (carrés) et 20 sérums de souris saines (ronds). La dilution des sérums est de 1/10. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 190-211, et les mélanges combinatoires contenant 10^6 peptides ou 10^9 peptides. Le 'cut-off' pour les positifs (moyenne des souris saines + 3σ) est représenté par une ligne horizontale.

Les anticorps des souris infestées par *Schistosoma mansoni* ont reconnu non seulement le peptide 190-211, mais aussi les mélanges combinatoires contenant 10^6 ou 10^9 peptides (figure 34). L'intensité du signal obtenu est cependant affaibli par l'utilisation de ces mélanges.

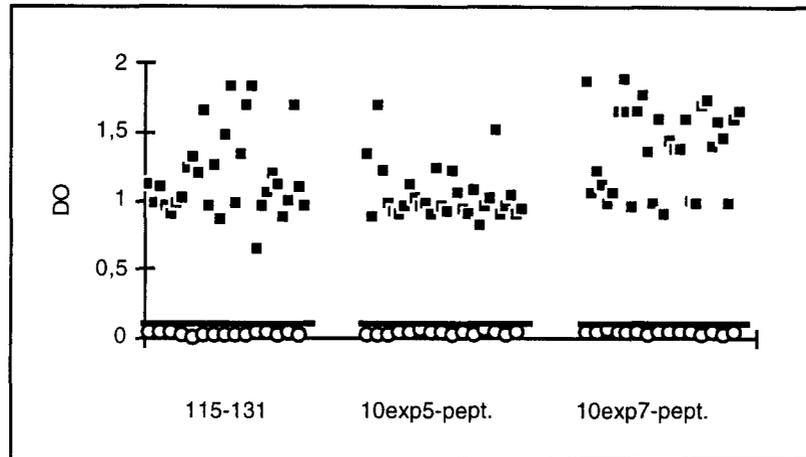


Figure 35 : Résultats obtenus avec les tests ELISA réalisés sur 30 sérums de souris infestées par *Schistosoma mansoni* (carrés) et 20 sérums de souris saines (ronds). La dilution des sérums est de 1/10. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 115-131, et les mélanges combinatoires contenant 10^5 peptides ou 10^7 peptides. Le 'cut-off' pour les positifs (moyenne des souris saines + 3σ) est représenté par une ligne horizontale.

Les anticorps des souris infestées par *Schistosoma mansoni* ont reconnu non seulement le peptide 115-131, mais aussi les mélanges combinatoires contenant 10^5 ou 10^7 peptides (figure 35). L'intensité du signal obtenu est globalement le même que l'antigène en phase solide soit le peptide 115-131 ou l'un des mélanges contenant 10^5 ou 10^7 peptides obtenus par synthèse combinatoire à partir de la séquence initiale du peptide 115-131.

b - Evaluation des tests avec des sérums de rats

Les sérums de 10 rats Fischer infestés par *Schistosoma mansoni* ont été testés par ELISA. Les antigènes en phase solide utilisés sont soit le peptide 115-131, et ses mélanges combinatoires, soit le peptide 190-211 et ses mélanges combinatoires. Les résultats obtenus avec des sérums prélevés 6 semaines après l'infestation sont récapitulés respectivement figures 36 et 37.

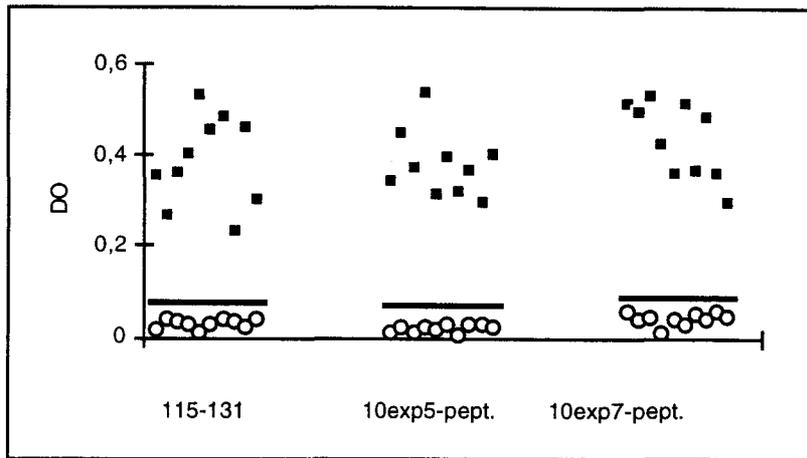


Figure 36 : Résultats obtenus avec les tests ELISA réalisés sur 10 sérums de rats infestés par *Schistosoma mansoni* (carrés) et 10 sérums de rats sains (ronds). La dilution des sérums est de 1/10. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 115-131, et les mélanges combinatoires contenant 10^5 peptides ou 10^7 peptides. Le 'cut-off' pour les positifs (moyenne des rats sains + 3σ) est représenté par une ligne horizontale.

Les anticorps des rats infestés par *Schistosoma mansoni* ont reconnu non seulement le peptide 115-131, mais aussi les mélanges combinatoires contenant 10^5 ou 10^7 peptides (figure 36). L'intensité du signal obtenu est globalement la même que l'antigène en phase solide soit le peptide 115-131 ou l'un des mélanges contenant 10^5 ou 10^7 peptides obtenus par synthèse combinatoire à partir de la séquence initiale du peptide 115-131.

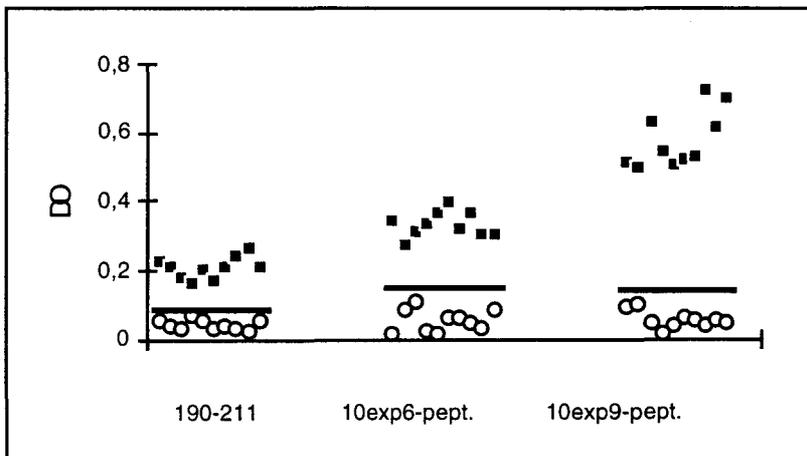


Figure 37 : Résultats obtenus avec les tests ELISA réalisés sur 10 sérums de rats infestés par *Schistosoma mansoni* (carrés) et 10 sérums de rats sains (ronds). La dilution des sérums est de 1/10. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 190-211, et les mélanges combinatoires contenant 10^6 peptides ou 10^9 peptides. Le 'cut-off' pour les positifs (moyenne des rats sains + 3σ) est représenté par une ligne horizontale.

Les anticorps des souris infestées par *Schistosoma mansoni* ont reconnu non seulement le peptide 190-211, mais aussi les mélanges combinatoires contenant 10^6 ou 10^9 peptides (figure 37). L'utilisation du mélange combinatoire contenant 10^6 peptides nous permet de doubler l'intensité du signal obtenu avec le peptide 190-211, et celle du mélange combinatoire contenant 10^9 peptide nous permet de la tripler.

3 - Résultats obtenus avec des sérums humains

L'application finale des mélanges de peptides obtenus par synthèse combinatoire, serait leur utilisation en détection sérologique humaine. Nous avons donc testé nos mélanges contre des sérums humains d'individus kényans infestés par *Schistosoma mansoni*. La présence d'anticorps anti-Sm28GST dans ces sérums a été révélée par des tests ELISA. Ces sérums nous ont été fournis par J.M. Grzych de l'Institut Pasteur de Lille.

Les sérums de 87 individus infestés par *Schistosoma mansoni* et de 20 sujets sains ont été testés par ELISA. Dans un premier tant les antigènes en phase solide que nous avons utilisés sont le peptide 115-131 et les mixotopes dérivés de ce peptide. Les résultats obtenus sont représentés figure 38.

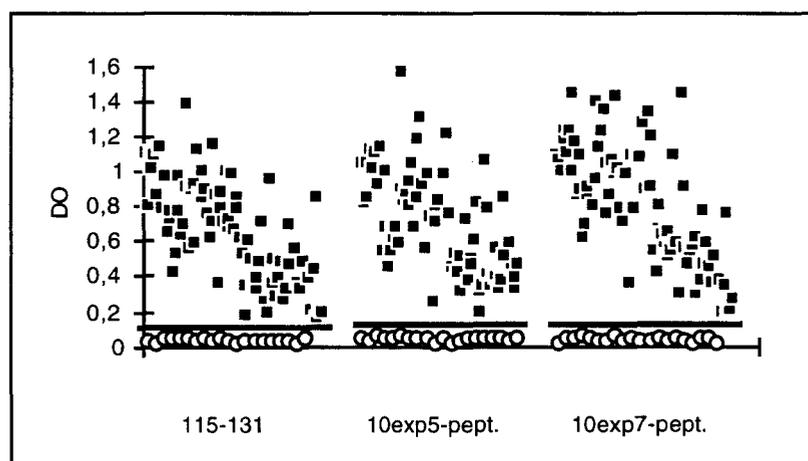


Figure 38 : Résultats obtenus avec les tests ELISA réalisés sur 87 sérums d'individus infestés par *Schistosoma mansoni* (carrés) et 20 sérums de sujets sains (ronds). La dilution des sérums est de 1/20. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 115-131 et les mélanges combinatoires dérivés contenant 10^5 peptides ou 10^7 peptides. Le 'cut-off' pour les positifs (moyenne des sujets sains + 3σ) est représenté par une ligne horizontale.

Les anticorps des 87 sérums testés reconnaissent non seulement le peptide 115-131, mais aussi les mélanges combinatoires dérivés contenant 10^5 ou 10^7 peptides. L'intensité du signal obtenu est équivalente dans les 3 cas de figure, et le bruit de fond n'est pas augmenté. Aucun des 20 sujets sains servant de contrôle ne présentent d'anticorps anti-115-131 ou ses dérivés.

A l'aide du même test et des mêmes sérums, nous avons étudié la réponse anticorps vis-à-vis du peptide 190-211 et des mélanges combinatoires dérivés de ce peptide (figure 39).

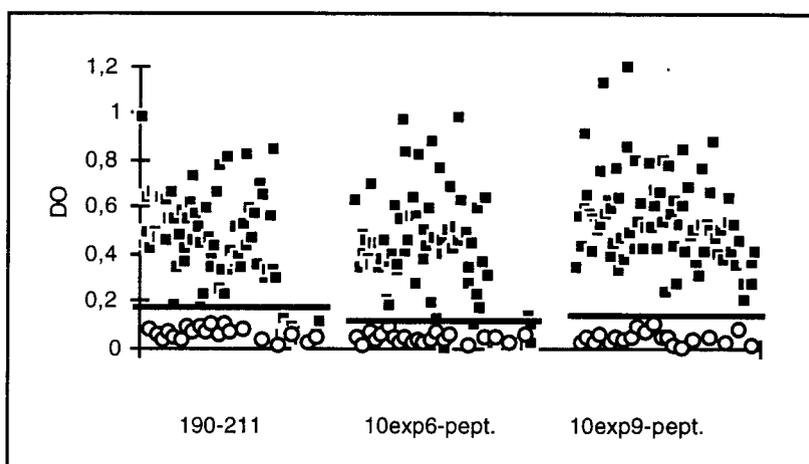


Figure 39 : Résultats obtenus avec les tests ELISA réalisés sur 87 sérums d'individus infestés par *Schistosoma mansoni* (carrés) et 20 sérums de sujets sains (ronds). La dilution des sérums est de 1/20. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 190-211 et les mélanges combinatoires dérivés contenant 10^6 peptides ou 10^9 peptides. Le 'cut-off' pour les positifs (moyenne des sujets sains + 3σ) est représenté par une ligne horizontale.

Seulement 66 sérums sur les 87 testés reconnaissent le peptide 190-211, et 65 le mélange combinatoire dérivé contenant 10^6 peptides. En revanche les 87 sérums d'individus infestés ont été révélés par le mélange combinatoire contenant 10^9 peptides. Aucun des 20 sujets sains servant de contrôle ne présentent d'anticorps reconnaissant le peptide 190-211 ou l'un de ses mixotopes dérivés. Nous avons rassemblé les 21 sérums d'individus infestés qui n'ont pas été détectés par le peptide 190-211 (figure 40).

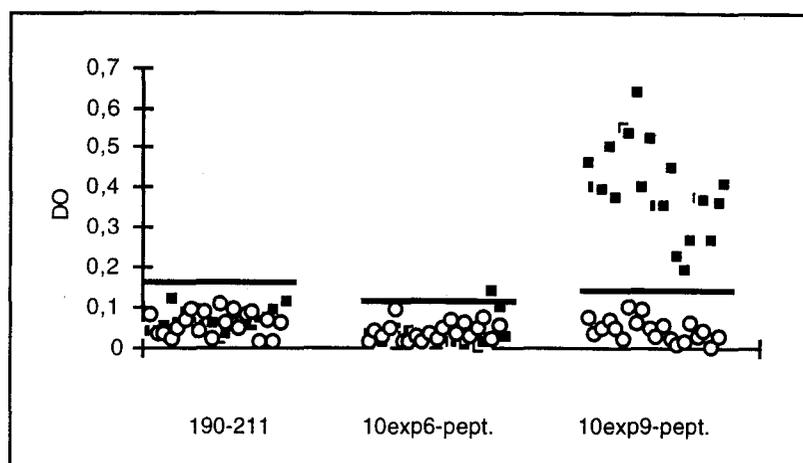


Figure 40 : Résultats obtenus avec les tests ELISA réalisés sur les 21 sérums d'individus infestés par *Schistosoma mansoni* (carrés) non détectés par le peptide 190-211 et 20 sérums de sujets sains (ronds). La dilution des sérums est de 1/20. Les antigènes en phase solide utilisés sont le peptide 190-211 et les mélanges combinatoires dérivés contenant 10^6 peptides ou 10^9 peptides. Le 'cut-off' pour les positifs (moyenne des sujets sains + 3σ) est représenté par une ligne horizontale.

L'utilisation du mélange de 10^9 peptides obtenu par synthèse combinatoire dérivés du peptide 190-211, a permis de détecter plus de sérums positifs vis-à-vis de la protéine Sm28GST que n'a pu le faire le peptide 190-211. Ces résultats peuvent être mis en relation, soit avec une plus grande sensibilité, soit avec un manque de spécificité du test.

4 - Mesures d'avidités

La force de liaison antigène-anticorps est usuellement appelée affinité de l'anticorps pour l'antigène. Chaque paratope peut potentiellement reconnaître plusieurs épitopes proches les uns des autres, mais avec des affinités différentes. La réponse immunitaire naturelle à un antigène est polyclonale. Dans ce cas, la notion d'affinité est remplacée par celle d'avidité. Nous envisageons de mesurer celle-ci lorsque les anticorps reconnaissent à la fois le peptide 190-211 et les mélanges combinatoires dérivés contenant 10^6 ou 10^9 peptides, afin de définir si la différence d'intensité du signal obtenu est due à une différence d'avidité.

a - Principe de l'élution au thiocyanate

Les complexes antigène-anticorps ne sont pas figés : ils sont en équilibre constant. Il est donc possible de diminuer ou d'augmenter le nombre de ces

complexes en modifiant le pH, la température, les solvants ou en ajoutant un agent chaotropique. C'est cette dernière technique que nous avons choisie pour dissocier les complexes antigène-anticorps et mesurer l'avidité. La méthode de l'éluion au thiocyanate que nous avons utilisée a été décrite par Pullen, G.R. et coll. (1986) pour déterminer l'avidité d'un anticorps, et reprise par Mac Donald, R.A. et coll. (1988) pour mesurer l'affinité relative. Cette méthode consiste à rajouter une étape supplémentaire aux tests ELISA : après l'incubation des sérums, le thiocyanate d'ammonium est introduit dans les puits à différentes concentrations (de 0,5 à 3M). Cet agent chaotropique va dissocier les complexes antigène-anticorps d'autant plus facilement que l'affinité relative (ou avidité) des anticorps pour l'antigène sera faible.

Les résultats sont exprimés par des graphes représentant le $\log_{10}(\%DO$ initiale) en fonction de la concentration en thiocyanate d'ammonium, où a DO initiale correspond à la DO obtenue sans addition de thiocyanate. L'index d'affinité relative, ou avidité, correspond à la concentration de thiocyanate nécessaire pour diminuer la DO initiale de 50%. Le type de courbes obtenues est illustré pour exemple figure 41.

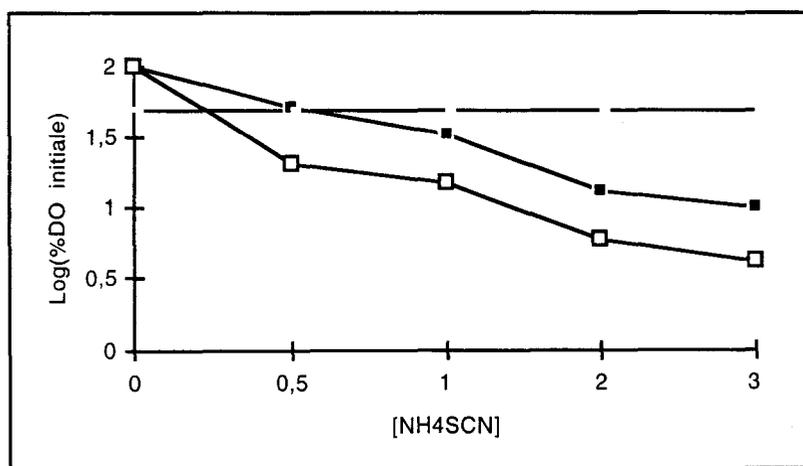


Figure 41 : Exemple de courbes permettant de mesurer l'avidité. Cas d'un sérum de rat infesté, par *Schistosoma mansoni*, prélevé 6 semaines après l'infestation et dilué au 1/10. Le sérum est testé par ELISA sur le peptide 190-211 (carrés noirs) et le mélange combinatoire de 10^6 peptides (carrés blancs). L'abscisse du point correspondant à l'intersection des courbes d'éluion et de la droite représentant 50% d'inhibition nous donne l'index d'affinité relative (avidité). La concentration de NH_4SCN est exprimée en mol/l.

La courbe obtenue avec le peptide 190-211 coupe la droite de 50% d'inhibition pour une concentration en thiocyanate de 0,52 M, alors que pour le mélange de 10^6 peptides, cette valeur est de 0,22 M. La quantité d'agent chaotropique nécessaire à la dissociation du complexe antigène-anticorps est plus importante lorsque l'antigène en phase solide est le peptide que lorsque c'est le mélange combinatoire. Nous pouvons, dans ce cas particulier, conclure que les anticorps ont une plus faible affinité pour le mélange combinatoire de 10^6 peptides que pour le peptide 190-211. Nous avons appliqué cette méthode de l'éluion au thiocyanate, aux sérums d'individus infestés par *Schistosoma mansoni*, ainsi qu'aux différents sérums de rats immunisés ou infestés dont les anticorps testés en ELISA reconnaissaient les mélanges combinatoires en tant qu'antigènes.

b - Résultats avec des sérums de rats immunisés

Comme nous l'avons vu précédemment (figure 33), le mélange de 10^9 peptides n'est pas reconnu par les anticorps de sérums de rats immunisés avec le lipopeptide 190-211. Les mesures d'avidité que nous avons faites ont donc été réalisées en prenant comme antigènes en phase solide, le peptide 190-211 et le mélange de 10^6 peptides. Les résultats obtenus sont récapitulés figure 42.

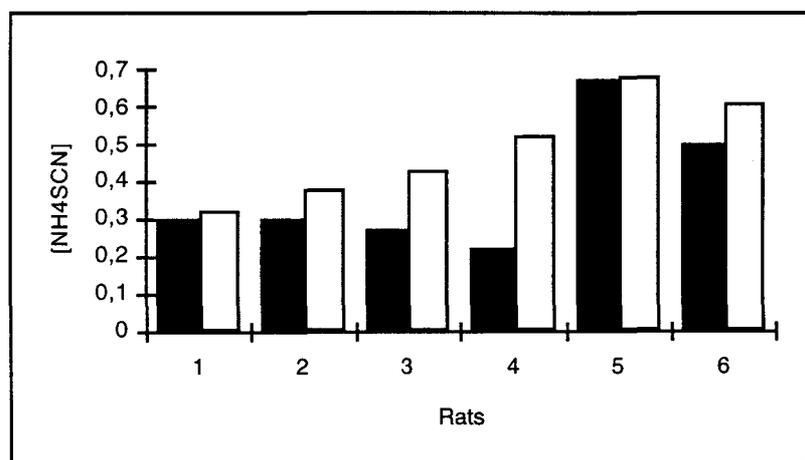


Figure 42 : Comparaison de l'avidité des anticorps vis à vis du peptide 190-211 (barres noires) et du mélange de 10^6 peptides (barres blanches), pour 6 sérums de rats immunisés avec le lipopeptide 190-211, prélevés 75 jours après la première immunisation et dilués au 1/10. La concentration de NH_4SCN est exprimée en mol/l.

Cet histogramme nous montre que les anticorps de sérums de rats immunisés avec le lipopeptide 190-211 ont une plus grande affinité relative pour le mélange combinatoire de 10^6 peptides que pour le peptide 190-211. L'élargissement de la population des anticorps recrutés par le mélange combinatoire contenant 10^6 peptides n'est pas dû à une reconnaissance de ce mélange par des anticorps de plus faible avidité que celle du peptide 190-211.

c - Résultats avec des sérums de rats infestés par *Schistosoma mansoni*

Les études précédentes (figure 37) nous ont montré que, dans le cas de sérums de rats infestés par *Schistosoma mansoni*, l'utilisation du mélange combinatoire de 10^6 peptides en tant qu'antigène en phase solide dans les tests ELISA, permet de doubler l'intensité du signal obtenu avec le peptide et celle du mélange de 10^9 peptides permet de la tripler. Nous avons donc mesuré l'avidité des anticorps des différents sérums pour le 190-211, le mélange de 10^6 peptides et le mélange de 10^9 peptides (figure 43).

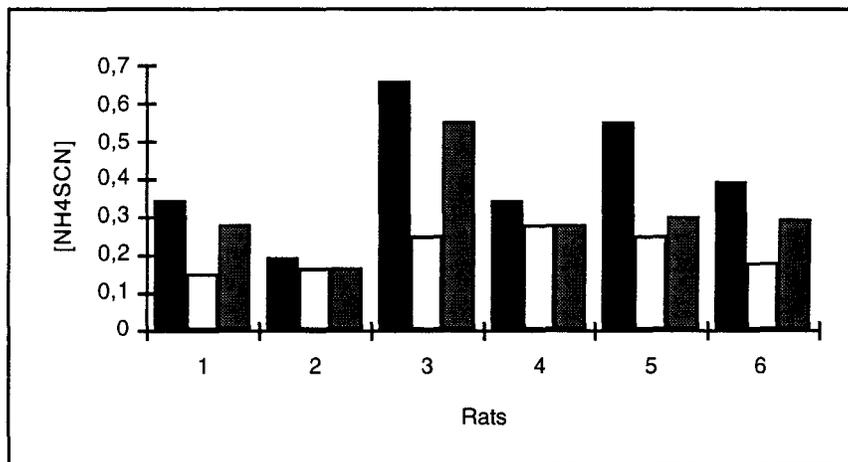


Figure 43 : Comparaison de l'avidité des anticorps vis à vis du peptide 190-211 (barres noires), du mélange de 10^6 peptides (barres blanches) et du mélange de 10^9 peptides (barres grises), pour 6 sérums de rats infestés prélevés 6 semaines après l'infestation et dilués au 1/10. La concentration de NH_4SCN est exprimée en mol/l.

La concentration d'agent chaotropique nécessaire pour dissocier le complexe antigène-anticorps est supérieure lorsque l'antigène en phase solide est le peptide 190-211. L'affinité relative des anticorps de sérums de rats infestés est donc plus forte pour le peptide 190-211 que pour les mélanges combinatoires.

Cette observation nous amène à conclure que, dans le cas de sérums de rats infestés, l'amplification de l'intensité du signal obtenu avec les mélanges combinatoires pourrait être due à un recrutement d'anticorps de plus faible affinité que celle pour le peptide 190-211.

D'autre part, nous constatons que l'affinité relative des anticorps pour le mélange combinatoire de 10^6 peptides est inférieure à celle observée pour le mélange de 10^9 peptides. Les premiers résultats (figure 37) indiquaient que l'intensité du signal obtenu avec le mélange de 10^9 peptides était supérieure à celle du mélange de 10^6 peptides. L'élargissement de la population des anticorps recrutés ne peut donc pas être expliqué en terme d'affinité relative.

d - Résultats avec des sérums d'individus infestés par *Schistosoma mansoni*

Les mesures d'avidité ont été réalisées avec les 66 sérums d'individus infestés par *Schistosoma mansoni* reconnaissant le peptide 190-211 (figure 39). Ces mesures ont été faites en prenant comme antigènes en phase solide, le peptide 190-211 et le mélange combinatoire contenant 10^9 peptides. A titre d'exemple, les résultats obtenus pour 10 des sérums sont représentés figure 44.

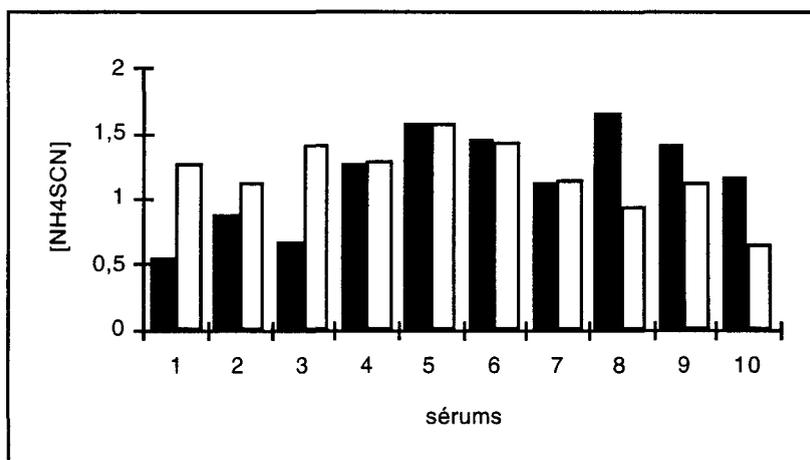


Figure 44 : Comparaison de l'avidité des anticorps vis à vis du peptide 190-211 (barres noires) et du mélange de 10^9 peptides (barres blanches), pour 10 sérums d'individus infestés par *Schistosoma mansoni* et dilués au 1/20. La concentration de NH_4SCN est exprimée en mol/l.

L'affinité relative des anticorps pour le peptide 190-211 est plus élevée dans certains cas, plus faible dans d'autres, que pour le mélange combinatoire

contenant 10^9 peptides. Elle est parfois équivalente avec les deux antigènes. La détection des 21 sérums révélés uniquement par ce mélange de 10^9 peptides ne peut pas s'expliquer par une différence d'avidité des anticorps pour les antigènes utilisés en phase solide.

5 - Western blot

Afin de vérifier que nos tests sérologiques sont bien spécifiques de la protéine Sm28GST, nous avons réalisé des tests de Western blot. Les résultats obtenus par la technique de transfert de Western (Western blot) des anticorps de lapins immunisés avec le mélange combinatoire contenant 10^9 peptides après séparation des protéines du SWAP (antigènes solubles totaux de schistosomes adultes) par électrophorèse en gel de polyacrylamide/SDS sont représentés figure 45.

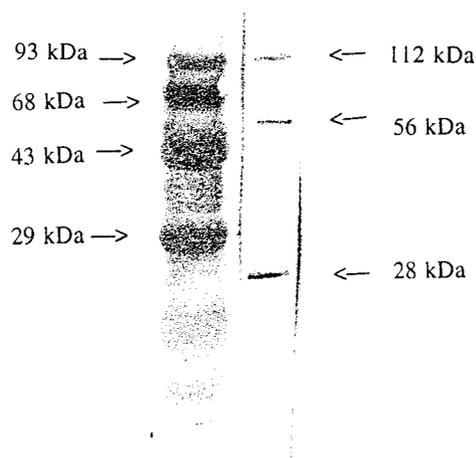


Figure 45 : Identification des anticorps anti-Sm28GST en Western blot dans un sérum de lapin hyper-immunisé avec le mélange combinatoire contenant 10^9 peptides.

Nous voyons sur cette photo que 3 bandes sont révélées. La première correspondant à un poids moléculaire de 28 kDa représente la protéine Sm28GST sous forme monomère, la seconde de 56 kDa au dimère, et la troisième de 112 kDa au tétramère. Les anticorps détectés par le mélange de 10^9 peptides sont donc bien spécifiques de la protéine Sm28GST, puisqu'aucune autre protéine n'est révélée.

D - DISCUSSION

Le tableau ci-dessous récapitule l'intensité des réponses obtenues avec les anticorps d'animaux immunisés (im.) ou infestés (inf.) dirigés contre les différents antigènes en phase solide :

	115-131	10 ⁵ -pept.	10 ⁷ -pept.	190-211	10 ⁶ -pept.	10 ⁹ -pept.
souris im.	+	-	-	+	-	-
rats im.				+	++	-
souris inf.	+	+	+	++	+	+
rats inf.	+	+	+	+	++	+++

Les animaux sont immunisés par le peptide original (115-131 ou 190-211) et les sérums sont testés avec ce même peptide ou un des mixotopes dérivés (10⁵-pept. ou 10⁷-pept. pour le 115-131, 10⁶-pept. et 10⁹-pept. pour le 190-211) dans les tests sérodiagnostics. Ce tableau nous indique que les mixotopes utilisés en tant qu'antigènes en phase solide dans les tests ELISA ne sont pas reconnus par les anticorps des sérums d'animaux immunisés avec le peptide original. Les anticorps de ces sérums reconnaissent pourtant le peptide unique. Une exception est cependant faite avec l'utilisation du mélange combinatoire contenant 10⁶ peptides dérivés du peptide 190-211 qui est reconnu par les anticorps de rats immunisés avec le lipopeptide 190-211 (figure 33). Nous n'avons pas réussi à expliquer ce résultat.

Les anticorps d'animaux infestés par *Schistosoma mansoni* reconnaissent non seulement les peptides 115-131 et 190-211, mais aussi leurs mélanges combinatoires dérivés. L'intensité du signal obtenu avec le peptide 115-131 est la même que celle obtenue avec les mélanges combinatoires contenant 10⁵ ou 10⁷ peptides que ce soit avec des sérums de souris ou de rats infestés (figures 35 et 36).

Les anticorps de souris infestées par *Schistosoma mansoni* reconnaissent le peptide 190-211 et les mélanges combinatoires de 10^6 ou 10^9 peptides, cependant l'intensité du signal diminue lorsque ces derniers sont utilisés en tant qu'antigène en phase solide (figure 34).

Les résultats les plus intéressants sont ceux que nous avons obtenus avec des sérums de rats infestés par *Schistosoma mansoni* testés par ELISA sur le peptide 190-211 et ses mélanges dérivés (figure 37). L'utilisation du mélange combinatoire contenant 10^6 peptides en tant qu'antigène en phase solide, nous permet de doubler l'intensité du signal obtenu avec le peptide 190-211, et celle du mélange de 10^9 peptides nous permet de la tripler. Notre hypothèse de départ qui consistait à dire que :

des mélanges de peptides, dérivés de la séquence initiale d'un peptide, dont les séquences sont très proches les unes des autres, sont capables de détecter plus efficacement des populations d'anticorps hétéroclites, est appuyée par les résultats obtenus, et plus particulièrement avec les anticorps de rats infestés dirigés contre le peptide 190-211 et ses mélanges combinatoires dérivés contenant 10^6 ou 10^9 peptides.

Il est difficile d'expliquer les différences de comportements entre sérums d'immunisation et d'infestation. Il faut cependant noter qu'au cours d'une immunisation, seul le peptide synthétique est représenté, alors que pour une infestation, c'est le parasite entier qui est présent. Nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation des mélanges combinatoires permettait d'élargir le recrutement des anticorps d'animaux infestés grâce à des séquences dérivées proches de la séquence initiale. Il ne faut cependant pas exclure la possibilité que de tels mélanges puissent recruter des anticorps dirigés contre d'autres protéines du schistosome dont les séquences sont proches de celles issues de la Sm28GST. Des tests de transfert de Western, nous ont permis de montrer que la réponse obtenue est bien spécifique de la protéine Sm28GST.

Les 87 sérums humains contenant des anticorps anti-Sm28GST, testés par ELISA, reconnaissent le peptide 115-131 ainsi que les mélanges combinatoires dérivés de ce peptide utilisés en tant qu'antigènes en phase solide (figure 38). En revanche, seulement 66 sérums sur les 87 testés reconnaissent le peptide 190-211 et 65 le mélange combinatoire contenant 10^6 peptides (figure 39). 21 sérums d'individus infestés par *Schistosoma mansoni* ne sont pas détectés dans ces conditions. L'utilisation du mélange combinatoire dérivé du peptide 190-211 contenant 10^9 peptides a permis de révéler la présence d'anticorps anti-Sm28GST dans ces sérums. Les 20 sérums de sujets sains servant de contrôle ne présentent pas d'anticorps dirigés contre ce mélange, et l'augmentation du bruit de fond est négligeable. Le mélange de 10^9 peptides permet donc un recrutement plus large de la population d'anticorps dirigés contre la Sm28GST, grâce à des séquences dérivées proches de la séquence initiale. Les résultats obtenus par les mesures d'avidité montrent que l'élargissement de la population d'anticorps détectés n'est pas dû au recrutement d'anticorps de faible affinité par le mélange combinatoire de 10^9 peptides. Un tel mélange pourrait être capable de recruter des anticorps dirigés contre une ou plusieurs autres protéines dont certaines séquences seraient proches de celle du peptide 190-211, et contenues dans le mélange. Si tel est le cas, les anticorps recrutés sont exclusivement dirigés contre des protéines schistosomiales puisque les 20 sérums de sujets sains servant de contrôle restent négatifs. Lorsque les anticorps des sérums d'individus infestés reconnaissent le peptide 190-211, l'intensité du signal obtenu est sensiblement la même que celle obtenue par les tests avec le mélange combinatoire de 10^9 peptides. Il n'y a donc pas additivité des réponses et cet argument nous conforte dans l'hypothèse que les anticorps recrutés par le mélange combinatoire sont dirigés contre la Sm28GST.

Les tests de western blot réalisés avec des sérums de lapins hyperimmunisés avec le mélange combinatoire dérivé du peptide 190-211

contenant 10^9 peptides dirigés contre du SWAP (antigènes solubles totaux de vers adultes) révèle 3 bandes : la première de poids moléculaire 28 kDa correspond à la protéine Sm28GST, la seconde de 56 kDa à son dimère, et la troisième de 112 kDa à son tétramère. La population d'anticorps recrutée par le mélange de 10^9 peptides est donc spécifiquement dirigée contre la protéine Sm28GST. Le mélange de 10^9 peptides, dérivé de la séquence initiale du peptide 190-211, dont les séquences sont très proches les unes des autres, permet de détecter plus efficacement une population d'anticorps hétéroclites. Le test ELISA est rendu plus sensible, en restant spécifique.

E - CONCLUSION

Les mélanges de peptides obtenus par synthèse combinatoire, peuvent être utilisés en tant qu'antigènes en phase solide pour amplifier significativement la sensibilité des tests ELISA, sans augmentation simultanée du bruit de fond. Ces peptides dérivés de la séquence initiale du peptide sont obtenus en remplaçant un acide aminé unique par un mélange de 2 ou 3 acides aminés, couplés simultanément, définis à partir d'une matrice de remplaçabilité et de critères physicochimiques. De tels mélanges contiennent, en plus de la séquence initiale, une population de séquences étroitement proches les unes des autres, capable de détecter plus efficacement des populations d'anticorps hétéroclites. L'utilisation de ces mélanges permet d'augmenter la sensibilité des tests sérodiagnostics, même quand ils sont dérivés d'une partie non variable d'un antigène. Ce principe pourrait être appliqué à d'autres antigènes, qu'ils soient variables ou invariables.

MELANGES DE PEPTIDES OBTENUS PAR SYNTHÈSE COMBINATOIRE : UTILISATION COMME IMMUNOGENE EN STRATEGIE VACCINALE

A - INTRODUCTION	117
B - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE	118
I - STRATEGIE ET CONCEPTION DES PEPTIDES	118
1 - Stratégie	118
2 - Synthèse peptidique en phase solide.....	121
II - MATERIEL ET METHODES	122
1 - Réactifs utilisés.....	122
2 - Synthèse des mélanges combinatoires.....	122
III - RESULTATS	123
1 - Analyse d'acides aminés des mélanges combinatoires dérivés du peptide 115-131.....	123
2 - Analyse d'acides aminés des mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211.....	124
C - ETUDES IMMUNOLOGIQUES	127
I - INTRODUCTION	127
II - MATERIEL ET METHODES	127
1 - Matériel utilisé.....	127
a - Réactifs	127
b - Animaux.....	128
2 - Protocole d'immunisation.....	128
3 - Récupération des sérums.....	128
4 - Test ELISA.....	129
5 - Tests de prolifération cellulaire.....	129
a - Stimulation in vitro des splénocytes.....	129
b - Quantification de la prolifération cellulaire.....	130

III - RESULTATS	131
1 - Cytotoxicité des lipopeptides pour les cellules en culture.....	131
2 - Etudes avec des souris non syngéniques.....	131
a - Utilisation des mélanges combinatoires dérivés du peptide 115-131.....	131
b - Utilisation des mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211.....	133
3 - Etudes avec des souris syngéniques utilisation des mélanges dérivés du peptide 190-211	135
a - Choix d'une souche mauvaise répondeuse.....	135
α - Etude de la réponse cellulaire	136
β - Etude de la réponse humorale	137
b - Résultats obtenus avec des souris CBA.....	138
α - Etude de la réponse cellulaire	138
β - Etude de la réponse humorale	139
c - Etude du mélange B.....	140
D - DISCUSSION	142
E - CONCLUSION	144

MELANGES DE PEPTIDES OBTENUS PAR SYNTHÈSE COMBINATOIRE : UTILISATION COMME IMMUNOGENES EN STRATEGIE VACCINALE

A - INTRODUCTION

Les résultats décevants obtenus lors de traitements par chimiothérapie des individus atteints de bilharziose, ont axé les recherches vers l'élaboration d'un vaccin anti-parasitaire. Dans l'idéal, un bon vaccin doit toucher un maximum d'individus. Or l'existence du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et de la restriction génétique qui lui est propre rend cette optique difficile à réaliser.

Dans le but de pallier à cette restriction génétique, notre idée est d'utiliser en tant qu'immunogène un mélange de peptides obtenus par synthèse combinatoire. Ces peptides dérivés de la séquence initiale d'un peptide sont obtenus en remplaçant chaque acide aminé impliqué dans la liaison du peptide au CMH (agrétopes) par un mélange de 9 acides aminés. Nous espérons ainsi pouvoir augmenter la capacité de réponse d'individus faiblement répondeurs à la séquence initiale d'un peptide en permettant son association à un plus grand nombre de variants du CMH. Cette démarche implique que les cellules sensibilisées par un tel mélange soient restimulables par le peptide d'origine, voire l'antigène naturel.

B - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

I - STRATÉGIE ET CONCEPTION DES PEPTIDES

Nous avons choisi comme modèles (figure 46), les peptides 115-131 (partie centrale) et 190-211 (extrémité carboxy-terminale) de la protéine Sm28GST, antigène invariable retrouvé à tous les stades du développement de *Schistosoma mansoni*.

(115)NH₂-K P Q E E K E K I T K E I L N G K-COOH(131)

(190)NH₂-E N L L A S S P R L A K Y L S N R P A T P F-COOH(211)

Figure 46 : Séquences des peptides 115-131 (17 acides aminés) et 190-211 (22 acides aminés)

Nous savons que le peptide 115-131 est un bon antigène mais un mauvais immunogène, et que le peptide 190-211 est un bon immunogène.

1 - Stratégie

Dans le but d'augmenter le nombre de cellules capables de présenter les peptides aux molécules de CMH, nous avons utilisé des mélanges de peptides obtenus par synthèse combinatoire comme immunogène. Nous avons dégénéré ces peptides sur leurs parties agrétopiques, c'est à dire sur les séquences impliquées dans l'association peptide-CMH.

La stratégie pour obtenir un mélange de peptides par synthèse combinatoire consiste à remplacer un acide aminé en une position donnée par un mélange d'acides aminés. Pour connaître les acides aminés par lesquels nous devons substituer les acides aminés agrétopiques, nous nous sommes basés sur

les données de la littérature concernant l'ancrage des peptides aux CMH (figure 47).

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	Ref
H-2	Db				N				M	a
	Dd		P						FLI	b
	Kb				FY			MLIV		c
	Kd	Y							LVAI	d
	Ld	P							FLM	e
HLA-	A2	L							V	f
	A3	LMI							KY	g
	A11	VT							K	h
	A68	VT							KR	i
	B7	P	R						AL	j
	B8		KR						U	k
	B27	R						LV	KRA	l
	B35	P							Y	m
	B53	P				Y				m

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	Ref
I-	As		IVT	TAS				HR			n
	Ab		NO					R			n
	Eb	Y	LV					FK	FH		n
HLA-	DR	YPW				AGT			LM		o
	DR1	LIVY				LIV			AILV	AV	p
	DR2	ILV								KFH	q
	DR3	FILV		DNQT							q,r
	DR4	FILV							NQST		q
	DR7	IFLVY				NST					i
	DR8	IFLVY			KFH						q
	DR11		YF				FK		FK		s

Figure 47 : Les tableaux ci-dessus nous montrent les motifs d'ancrage des peptides aux molécules de CMH, de classe I (à gauche) et de classe II (à droite), chez la souris (H-2 et I) et chez l'homme (HLA) définis à partir des données bibliographiques. X correspond à la position de l'acide aminé dans l'épitope. (a, Falk, 1991 - Rammensee, 1993^a - Röttschke, 1990 ; b, Corr, 1993 ; c, Saito, 1993 - Fremont, 1992 - Matsumura, 1992 - Zhang, 1992 - Falk, 1991^a - VanBleek, 1990 ; d, Falk, 1991 - Rammensee, 1993^a - Röttschke, 1990 - Romero, 1991 - Gill, 1994 ; e, Corr, 1992 - Udaka, 1992 - Reddehase, 1989 ; f, Nijman, 1993 - Falk, 1991^a - Chen, 1994 - Ruppert, 1993 - Hunt, 1992^b - Henderson, 1992 - Morrison, 1992 - Nayarsina, 1993 ; g, DiBrino, 1993 - Gavioli, 1995 ; h, Zhang, 1993 ; i, Guo, 1992 - Silver, 1992 - Missale, 1993 ; j, Huckzo, 1993 ; k, Suhrbier, 1993 ; l, Madden, 1992 - Parker, 1994 - Carreno, 1993 - Jardetzky, 1991 ; m, Hill, 1992 ; n, Rudensky, 1992 ; o, Hammer, 1993 ; p, Kropshofer, 1992 ; q, Chiczo, 1993 ; r, Geluk, 1994 ; s, Newcomb, 1993).

A l'aide de ces données, nous avons décidé de remplacer chaque acide aminé susceptible d'être impliqué dans une liaison agrétopique par un mélange de 9 acides aminés qui sont : la valine, l'isoleucine, la leucine, l'alanine, la proline, l'arginine, la tyrosine, la thréonine et la lysine (V,I,L,A,P,R,Y,T,K). La taille et la localisation des épitopes sur les peptides 115-131 et 190-211 n'étant pas connues, nous avons défini à partir de ces mêmes données bibliographiques, une fenêtre épitopique de 6 acides aminés, encadrée de part et d'autre par 2 séquences de 3 acides aminés correspondant aux positions présumées agrétopiques. Nous obtenons un motif U-(aa)₆-U, où U correspond aux agrétopes dégénérés et (aa)₆ à la fenêtre épitopique, que nous faisons glisser le long du peptide. Cette démarche nous a amené à synthétiser 6 mélanges de peptides par synthèse combinatoire dérivés du peptide 115-131 (figure 48) et 11 mélanges dérivés du peptide 190-211 (figure 49).

Une lysine palmitoyle est ajoutée à la partie C terminale des peptides pour augmenter leur immunogénicité (Schild, H. 1991 - Robinson, J.H. 1992 - Rouaix, F. 1994^b). La partie amino terminale des peptides est acétylée pour que l'acide aminé à cette position se retrouve dans les mêmes conditions que dans la protéine entière.

115-131 Ac-K P Q E E K E K I T K E I L N G K K-Palm

1 Ac-U U U E E K E K I U U U I L N G K K-Palm
 2 Ac-K U U U E K E K I T U U U L N G K K-Palm
 3 Ac-K P U U U K E K I T K U U U N G K K-Palm
 4 Ac-K P Q U U U E K I T K E U U U G K K-Palm
 5 Ac-K P Q E U U U K I T K E I U U U K K-Palm
 6 Ac-K P Q E E U U U I T K E I L U U U K-Palm

Figure 48 : Séquences des mélanges combinatoires dérivés du peptide 115-131. U représente le mélange V, I, L, A, P, R, Y, T, K. La fenêtre épitopique de 6 acides aminés, encadrée des agrétopes dégénérés est déplacée le long du peptide 115-131. La partie N terminale est acétylée (Ac), et une lysine palmitoyle (K-Palm) est ajoutée à l'extrémité C terminale.

190-211 Ac-E N L L A S S P R L A K Y L S N R P A T P F K-Palm

1 Ac-U U U L A S S P R U U U Y L S N R P A T P F K-Palm
 2 Ac-E U U U A S S P R L U U U L S N R P A T P F K-Palm
 3 Ac-E N U U U S S P R L A U U U S N R P A T P F K-Palm
 4 Ac-E N L U U U S P R L A K U U U N R P A T P F K-Palm
 5 Ac-E N L L U U U P R L A K Y U U U R P A T P F K-Palm
 6 Ac-E N L L A U U U R L A K Y L U U U P A T P F K-Palm
 7 Ac-E N L L A S U U U L A K Y L S U U U A T P F K-Palm
 8 Ac-E N L L A S S U U U A K Y L S N U U U T P F K-Palm
 9 Ac-E N L L A S S P U U U K Y L S N R U U U P F K-Palm
 10 Ac-E N L L A S S P R U U U Y L S N R P U U U F K-Palm
 11 Ac-E N L L A S S P R L U U U L S N R P A U U U K-Palm

Figure 49 : Séquences des mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211. U représente le mélange V, I, L, A, P, R, Y, T, K. La fenêtre épitopique de 6 acides aminés, encadrée des agrétopes dégénérés est déplacée le long du peptide 190-211. La partie N terminale est acétylée (Ac), et une lysine palmitoyle (K-Palm) est ajoutée à l'extrémité C terminale.

Chaque synthèse aboutit à un mélange de 9⁶, soit 531 341, peptides dérivés de la séquence initiale du peptide, ne différant de la séquence originale que sur 6 positions sur 17 pour le peptide 115-131, et sur 22 pour le peptide 190-211. Nous espérons que chaque individu immunisé par un tel mélange y trouvera le ou les

peptides qui pourront se lier à son CMH, en étant capable d'induire une réponse spécifique de l'antigène initial.

2 - Synthèse peptidique en phase solide

Nous avons vu en détail dans le chapitre précédent, les synthèses, déprotection, purification et caractérisation des peptides et lipopeptides 115-131 et 190-211. Nous nous intéresserons uniquement dans ce chapitre, aux mélanges de peptides obtenus par synthèse combinatoire. Les stratégies de synthèse, de déprotection et de caractérisation pour ces mélanges sont les mêmes que celles utilisées dans le premier chapitre.

La synthèse peptidique en phase solide (Merrifield, 1963) des mélanges combinatoires est réalisée par un synthétiseur Applied Biosystem 430A dont les programmes ont été modifiés (Gras-Masse et coll., 1992), selon la stratégie Boc/TFA, en double couplage, avec une activation par la DCC et l'HOBt (König et Geiger, 1970). La synthèse se déroule sur une résine MBHA sur laquelle une lysine- ϵ NH₂-palmitoyle est greffée par couplage au BOP et à l'HOBt (Castro et coll., 1975). Les acides aminés introduits en mélange sont en quantité équimolaire. Les chaînes latérales sont protégées par les groupements classiques : Arg (Tos), Glu (OChx), Lys (2-ClZ), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Tyr (BrZ).

Le clivage du peptide de la résine et la déprotection des chaînes latérales sont réalisés par action de l'acide fluorhydrique selon la méthode du 'low et high' HF (Tam et coll., 1983). La seule caractérisation possible pour ces mélanges hétérogènes est l'analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale.

II - MATERIEL ET METHODES

1 - Réactifs utilisés

Acide acétique : Merck - Acide chlorhydrique : Merck - Acide fluorhydrique (HF) : Setic Labo - Acide palmitique : Merck - Acide trifluoroacétique (TFA) : Jansen Chemica - Anhydride acétique : Jansen Chemica - tBOC-acides aminés : Novabiochem - Hexafluorophosphate de benzotriazoloxyltrisdiméthylammonium (BOP) : Richelieu Biotechnologies - p-crésol : Aldrich - Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) : Jansen Chemica - Dichlorométhane (DCM) : Lambert et Rivière - Diisopropyléthylamine (DIEA) : Aldrich - Diméthylsulfure : Jansen Chemica - Diméthylsulfoxyde : Jansen Chemica - Hydroxybenzotriazole (HOBt) : Jansen Chemica - N-méthylpyrrolidone (NMP) : Aldrich - Phénol : Aldrich - Pipéridine : Aldrich - Résine MBHA : Novabiochem - p-thiocrésol : Aldrich.

2 - Synthèse des mélanges combinatoires

Les synthèses des mélanges combinatoires sont réalisées en double couplage (DCC/HOBt, 0,5M/0,5M) par un synthétiseur de peptides automatique Applied Biosystem de type 430A dont les programmes ont été modifiés au laboratoire, selon la stratégie tBoc/TFA. La résine que nous utilisons est une résine MBHA sur laquelle est couplée, par activation au BOP et à l'HOBt, une lysine- ϵ NH₂-palmitoyle. La quantité initiale de résine est de 0,5 mmole. Celle des acides aminés est de 0,5 mmole pour le premier couplage et de 1 mmole pour le second. Les acides aminés sont en quantité équimolaire dans le mélange et sont amenés directement en solution (3ml) dans le synthétiseur.

Les acides aminés en mélange (V, I, L, A, P, R, Y, T, K) sont représentés à raison de 1 mmole de chaque constituant. Ces 9 mmoles d'acides aminés sont mises en solution dans 27ml (1mmol dans 3ml) d'un mélange de DCM/NMP (70/30, v/v). Pour le premier couplage, 1,5ml de la solution d'acides aminés (0,5mmole) sont prélevés auxquels 1,5ml de solution de DCM/NMP sont ajoutés

pour obtenir un volume final de 3ml. Pour le deuxième couplage, 3ml de la solution d'acides aminés sont directement mises dans le synthétiseur. Une fois la synthèse achevée, les peptides sont clivés de la résine et les chaînes latérales des acides aminés sont déprotégées par un traitement 'low et high' à l'acide fluorhydrique.

III - RESULTATS

La seule caractérisation possible des mélanges de peptides obtenus par synthèse combinatoire est l'analyse d'acide aminé après hydrolyse acide totale. Les peptides sont hydrolysés par de l'acide chlorhydrique 6N à 100°C pendant 24 heures dans un tube scellé sous vide en présence de phénol. Le mélange d'acides aminés obtenus est analysé par un analyseur Beckman type 7300.

1 - Analyse d'acides aminés des mélanges combinatoires dérivés du peptide 115-131

Les tableaux 8 et 9 illustrent les résultats des analyses des acides aminés obtenus pour les 6 mélanges combinatoires dérivés du peptide 115-131.

A.A	calc.	théo.	taux	A.A	calc.	théo.	taux	A.A.	calc.	théo	taux
		1				2				3	
Asp	5,66	5,6	1,01	Asp	5,76	5,6	1,03	Asp	5,92	5,6	1,05
Thr	3,29	3,7	0,89	Thr	8,37	9,2	0,91	Thr	8,46	9,2	0,92
Ala	3,74	3,7	1,01	Ala	3,81	3,7	1,03	Ala	3,74	3,7	1,01
Val	3,63	3,7	0,98	Val	3,55	3,7	0,96	Val	3,59	3,7	0,97
Ile	13,68	14,1	0,97	Ile	8,65	9,2	0,94	Ile	8,83	9,2	0,96
Leu	9,02	9,2	0,98	Leu	9,1	9,2	0,99	Leu	3,82	3,7	1,03
Tyr	3,50	3,7	0,95	Tyr	3,55	3,7	0,96	Tyr	3,51	3,7	0,95
Gly	5,61	5,6	1,00	Gly	5,66	5,6	1,01	Gly	5,71	5,6	1,02
Lys	26,06	25,8	1,01	Lys	31,2	31,5	0,99	Lys	37,00	37,1	1,00
Arg	3,78	3,7	1,02	Arg	3,78	3,7	1,02	Arg	3,66	3,7	0,99
Pro	3,81	3,7	1,03	Pro	3,88	3,7	1,05	Pro	9,38	9,2	1,02
Glu	17,03	16,7	1,02	Glu	11,32	11,1	1,02	Glu	9,47	9,2	1,03

Tableau 8 : Analyse d'acides aminés des 3 premiers mélanges combinatoires dérivés du peptide 115-131 (1, 2, 3). Ce tableau récapitule le nombre de nanomoles calculées (calc.) et théoriques (théo.) pour chaque acide aminé (A.A.). Le taux correspond au rapport calc./théo. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

A.A	calc.	théo.	taux	A.A	calc.	théo.	taux	A.A.	calc.	théo	taux				
				4				5				6			
Thr	8,19	9,2	0,89	Thr	8,46	9,2	0,92	Thr	8,01	9,2	0,87				
Ala	3,8	3,7	1,03	Ala	3,74	3,7	1,01	Ala	3,74	3,7	1,01				
Val	3,55	3,7	0,96	Val	3,63	3,7	0,98	Val	3,59	3,7	0,97				
Ile	8,19	9,2	0,89	Ile	13,67	14,7	0,93	Ile	14,1	14,7	0,96				
Leu	3,51	3,7	0,95	Leu	3,77	3,7	1,02	Leu	9,11	9,2	0,99				
Tyr	3,59	3,7	0,97	Tyr	3,55	3,7	0,96	Tyr	3,63	3,7	0,98				
Lys	31,97	31,5	1,01	Lys	32,76	31,5	1,04	Lys	20,6	20,2	1,02				
Arg	3,77	3,7	1,02	Arg	3,74	3,7	1,01	Arg	3,71	3,7	1,00				
Pro	9,67	9,3	1,04	Pro	9,58	9,3	1,03	Pro	9,29	9,2	1,01				
Glu	17,66	16,7	1,05	Glu	17,03	16,7	1,02	Glu	24,06	22,7	1,06				
Gly	5,66	5,6	1,01												

Tableau 9 : Analyse d'acides aminés des 3 derniers mélanges combinatoires dérivés du peptide 115-131 (4, 5, 6). Ce tableau récapitule le nombre de nanomoles calculées (calc.) et théoriques (théo.) pour chaque acide aminé (A.A.). Le taux correspond au rapport calc./théo. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

Ces résultats nous indiquent que les synthèses se sont déroulées dans de bonnes conditions.

2 - Analyse d'acides aminés des mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211

Les tableaux 10, 11 et 12 illustrent les résultats des analyses d'acides aminés obtenus pour les 11 mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211.

A.A	calc.	théo.	taux	A.A	calc.	théo.	taux	A.A.	calc.	théo	taux				
				1				2				3			
Asp	4,39	4,35	1,01	Asp	4,57	4,35	1,05	Asp	8,87	8,7	1,02				
Thr	6,45	7,25	0,89	Thr	6,52	7,25	0,90	Thr	6,59	7,25	0,91				
Ser	11,74	13,05	0,90	Ser	11,48	13,05	0,88	Ser	11,22	13,05	0,86				
Ala	11,86	11,6	1,02	Ala	11,72	11,6	1,01	Ala	11,72	11,6	1,01				
Val	2,84	2,9	0,98	Val	2,81	2,9	0,97	Val	2,87	2,9	0,99				
Ile	2,87	2,9	0,99	Ile	2,78	2,9	0,96	Ile	2,84	2,9	0,98				
Leu	11,48	11,6	0,99	Leu	11,37	11,6	0,98	Leu	7,32	7,25	1,01				
Tyr	6,67	7,25	0,92	Tyr	2,78	2,9	0,96	Tyr	2,67	2,9	0,92				
Phe	4,39	4,35	1,01	Phe	4,44	4,35	1,02	Phe	4,35	4,35	1,00				
Lys	7,25	7,25	1,00	Lys	7,18	7,25	0,99	Lys	7,25	7,25	1,00				
Arg	11,83	11,6	1,02	Arg	11,72	11,6	1,01	Arg	11,48	11,6	0,99				
Pro	15,96	15,95	1,00	Pro	16,27	15,95	1,02	Pro	16,11	15,95	1,01				
				Glu	4,39	4,35	1,01	Glu	4,39	4,35	1,01				

Tableau 10 : Analyse d'acides aminés des 3 premiers mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211 (1, 2, 3). Ce tableau récapitule le nombre de nanomoles calculées (calc.) et théoriques (théo.) pour chaque acide aminé (A.A.). Le taux correspond au rapport calc./théo. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

A.A	calc.	théo.	taux	A.A	calc.	théo.	taux	A.A.	calc.	théo	taux
		4				5				6	
Asp	9,22	8,7	1,06	Asp	4,39	4,35	1,01	Asp	4,30	4,35	0,99
Thr	6,22	7,25	0,86	Thr	6,09	7,25	0,84	Thr	6,45	7,25	0,89
Ser	3,91	4,35	0,90								
Ala	12,06	11,6	1,04	Ala	11,6	11,6	1,00	Ala	15,94	15,95	1,00
Val	2,78	2,9	0,96	Val	2,81	2,9	0,97	Val	2,78	2,9	0,96
Ile	2,79	2,9	0,96	Ile	2,84	2,9	0,98	Ile	2,75	2,9	0,95
Leu	11,48	11,6	0,99	Leu	18,47	15,95	0,98	Leu	19,49	20,3	0,96
Tyr	2,55	2,9	0,88	Tyr	6,45	7,25	0,89	Tyr	6,67	7,25	0,92
Phe	4,39	4,35	1,01	Phe	4,39	4,35	1,01	Phe	4,31	4,35	0,99
Lys	11,72	11,6	1,01	Lys	11,48	11,6	0,99	Lys	11,6	11,6	1,00
Arg	11,83	11,6	1,02	Arg	11,72	11,6	1,01	Arg	7,18	7,25	0,99
Pro	16,27	15,95	1,02	Pro	15,95	15,95	1,00	Pro	11,71	11,6	1,01
Glu	4,57	4,35	1,05	Glu	4,35	4,35	1,00	Glu	4,30	4,35	0,99

Tableau 11 : Analyse d'acides aminés de 3 mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211 (4, 5, 6). Ce tableau récapitule le nombre de nanomoles calculées (calc.) et théoriques (théo.) pour chaque acide aminé (A.A.). Le taux correspond au rapport calc./théo. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

A.A	calc.	théo.	taux	A.A	calc.	théo.	taux	A.A.	calc.	théo	taux
		7				8				9	
Asp	4,44	4,35	1,02	Asp	8,52	8,7	0,98	Asp	8,79	8,7	1,01
Thr	6,45	7,25	0,89	Thr	5,94	7,25	0,82	Thr	2,58	2,9	0,89
Ser	10,2	11,6	0,88	Ser	10,7	13,05	0,82	Ser	11,22	13,05	0,86
Ala	16,27	15,95	1,02	Ala	11,72	11,6	1,01	Ala	7,25	7,25	1,00
Val	2,9	2,9	1,00	Val	2,81	2,9	0,97	Val	2,76	2,9	0,95
Ile	2,87	2,9	0,99	Ile	2,82	2,9	0,97	Ile	2,78	2,9	0,96
Leu	19,89	20,3	0,98	Leu	15,63	15,95	0,98	Leu	16,43	15,95	1,03
Tyr	6,89	7,25	0,95	Tyr	6,46	7,25	0,89	Tyr	7,04	7,25	0,97
Phe	4,44	4,35	1,02	Phe	4,44	4,35	1,02	Phe	4,35	4,35	1,00
Lys	11,95	11,6	1,03	Lys	11,83	11,6	1,02	Lys	11,72	11,6	1,01
Arg	2,96	2,9	1,02	Arg	2,92	2,9	1,01	Arg	7,39	7,25	1,02
Pro	7,32	7,25	1,01	Pro	7,17	7,25	0,99	Pro	11,71	11,6	1,01
Glu	4,48	4,35	1,03	Glu	4,39	4,35	1,01	Glu	4,39	4,35	1,01

Tableau 12 : Analyse d'acides aminés de 3 mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211 (7, 8, 9). Ce tableau récapitule le nombre de nanomoles calculées (calc.) et théoriques (théo.) pour chaque acide aminé (A.A.). Le taux correspond au rapport calc./théo. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

A.A	calc.	théo.	taux	A.A	calc.	théo.	taux
		10				11	
Asp	8,79	8,7	1,01	Asp	9,05	8,7	1,04
Thr	2,58	2,9	0,89	Thr	2,64	2,9	0,91
Ser	11,48	13,05	0,88	Ser	11,35	13,05	0,87
Ala	7,25	7,25	1,00	Ala	11,95	11,6	1,03
Val	2,78	2,9	0,96	Val	2,87	2,9	0,99
Ile	2,77	2,9	0,96	Ile	2,84	2,9	0,98
Leu	15,15	15,95	0,95	Leu	19,89	20,3	0,98
Tyr	6,88	7,25	0,95	Tyr	2,81	2,9	0,97
Phe	4,31	4,35	0,99				
Lys	7,25	7,25	1,00	Lys	7,18	7,25	0,99
Arg	11,37	11,6	0,98	Arg	11,83	11,6	1,02
Pro	11,48	11,6	0,99	Pro	11,72	11,6	1,01
Glu	4,39	4,35	1,01	Glu	4,48	4,35	1,03

Tableau 13 : Analyse d'acides aminés de 2 derniers mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211 (10, 11). Ce tableau récapitule le nombre de nanomoles calculées (calc.) et théoriques (théo.) pour chaque acide aminé (A.A.). Le taux correspond au rapport calc./théo. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

Les résultats obtenus nous confirment le bon déroulement des synthèses.

C - ETUDES IMMUNOLOGIQUES

I - INTRODUCTION

Notre objectif est d'augmenter la sensibilité de la réponse lymphocytaire T. L'évolution de cette réponse est suivie par des tests de prolifération cellulaire : la réponse des lymphocytes T à la stimulation de l'antigène est la conséquence de la reconnaissance du peptide lié aux molécules de CMH par le récepteur des lymphocytes T. Cette réponse est mise en évidence par incorporation de précurseurs marqués (thymidine tritiée) de la synthèse d'ADN, dont la radioactivité émise (rayonnement β) est mesurée. Une réponse supérieure à 2 fois celle du bruit de fond indique que les lymphocytes T ont proliféré sous l'action de l'antigène de stimulation et confirme la sensibilité des cellules T à l'immunogène utilisé.

Notre projet est d'utiliser les mélanges combinatoires comme immunogènes afin d'augmenter la capacité de réponse d'individus faiblement répondeurs à un épitope peptidique en permettant son association à un plus grand nombre de molécules du CMH. Dans un premier temps, nous avons décidé de travailler avec des souris non syngéniques (souris dont l'haplotype n'est pas connu) appelées OF1. Les difficultés rencontrées avec ces animaux nous ont amené à travailler par la suite avec des souris syngéniques, dont il a fallu déterminer une souche mauvaise répondeuse.

II - MATERIEL ET METHODES

1 - Matériel utilisé

a - Réactifs

Acide sulfurique : Prolabo - Acide citrique : Aldrich - Adjuvant de Freund : Difco, Détroit - Anti-IgG de souris : Diagnostic Pasteur - β -mercaptoéthanol : Merck - Sodium hydrogénocarbonate : Aldrich - Disodium carbonate : Aldrich - Chlorure

de sodium : Merck - Déoxythymidine tritiée : Amersham - Eau oxygénée : Prolabo - Glutamine : Merck - Hépes : Sigma - Milieu HBSS : Gibco - Milieu nutritif (RPMI) : Gibco - Orthophénylènediamine (OPD) : Sigma - Pénicilline : Specia - Sodium dihydrogénophosphate : Aldrich - Disodium hydrogénophosphate : Aldrich - Plaques de microtitration pour culture cellulaire : Falcon - Plaques de microtitration pour ELISA : Nunc, Danemark - Pyruvate de sodium : Gibco - Sérum de veau fœtal : Eurobio, France - Streptomycine : Specia - Tamis de type Bultex : Tripette et Renaud- Tris : Prolabo - Tween20 : Sigma - Ultroser : BioSeptra.

b - Animaux

Les souris non syngéniques (OF1), et syngéniques, Balb/c (H-2d), CBA (H-2k), C57Bl/6 (H-2b), proviennent de chez Iffa Credo (L'Arbresle, France). Les souris sont âgées d'environ 6 semaines au début des expériences.

2 - Protocole d'immunisation

Les souris sont immunisées par 3 injections sous-cutanées, avec 50µg des différentes constructions peptidiques solubilisés dans 100µl d'eau distillée en présence de 100µl d'adjuvant de Freund (adjuvant complet (CFA) à la première injection et adjuvant incomplet (IFA) par la suite). Les immunisations sont réalisées à la base de la queue à 15 jours d'intervalle.

3 - Prélèvement des sérums

Le sang est prélevé par des saignées en rétro-orbitale. Les tubes le contenant sont mis pendant 2 à 3 heures à 4°C, pour permettre aux globules rouges de coaguler et former un précipité. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 trs/mn pendant 30 minutes. Les surnageants (sérums) sont récupérés, et conservés à -20°C.

4 - Test ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay)

Les tests sont réalisés sur des plaques de microtitration de 96 puits. Ces plaques sont recouvertes avec 100µl/puits de peptide 190-211 (10µg/ml) dans du tampon carbonate/bicarbonate (0,05M/pH 9,6) et sont mises pendant une nuit à 4°C, puis lavées 3 fois avec du tampon phosphate (PBS) (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 1M pH 7,2, NaCl, 0,14M). La saturation se fait ensuite avec 200µl/puits d'Ultrosor à 2% dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Les dilutions des sérums se font en série directement sur la plaque dans la solution PBS-ultrosor 2% avec un volume final de 100µl/puits. L'incubation dure 2 heures à 37°C. Les puits ne contenant pas de sérum servent de contrôle négatif. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois avec du PBS contenant du tween20 à 1%. Le conjugué (anti-IgG de souris marquée à la peroxydase), dilué au 1/5000, est incubé pendant 2 heures à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois avec du tampon PBS-Tween20 1%. La fixation du conjugué est révélée par addition de 200µl/puits d'orthophénylène diamine (1 pastille dans 25ml de tampon citrate 0,1M pH 4,2 contenant 20µl de H₂O₂ ajoutés extemporanément). La révélation a lieu pendant 30mn dans le noir à température ambiante, puis la coloration est arrêtée en ajoutant 50µl de H₂SO₄ (4N). La densité optique est lue à 492nm avec un lecteur de plaques MR600(Dynatech).

5 - Tests de prolifération cellulaire

a - Stimulation *in vitro* des splénocytes

Les rates et les ganglions drainants (inguinaux et périaortiques) des souris immunisées sont récupérés 8 jours après la dernière immunisation et dilacérés stérilement sur un tamis de type Bultex. Les manipulations se font sous une hotte à flux laminaire. Les globules rouges des rates sont lysés par un passage de 10 minutes dans une solution de Tris/NH₄Cl (170mM/155mM, pH 7,2), les cellules sont lavées 3 fois par centrifugations successives (2000tr/mn pendant 10

minutes) dans du milieu HBSS et déposées dans des plaques de microtitration à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules dans 200 μ l de milieu nutritif contenant de 0,5 à 40 μ g/ml des différents antigènes. Les puits ne contenant pas d'antigène servent de contrôle négatif. Le milieu nutritif est du RPMI additionné de glutamine (2mM), de pyruvate de sodium (1mM), de β -mercaptoéthanol ($5 \cdot 10^{-5}$ M), de pénicilline (100 UI/ml), de streptomycine (100 μ g/ml), de Hépes (2mM) et de sérum de veau foetal (10%) décomplémenté par passage à 56°C pendant 30 minutes. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 90% d'humidité et 5% de CO₂.

b - Quantification de la prolifération cellulaire

La prolifération des cellules est quantifiée en ajoutant dans chaque puits, le quatrième jour de culture, 18,5kBq de déoxythymidine tritiée. Après 18 heures d'incubation, le contenu nucléique des cellules est récupéré sur des filtres en fibre de verre grâce à un collecteur de cellules (Titertek Harvester, Skatron, Norvège). Les filtres sont lavés pour éliminer la radioactivité résiduelle. Les rondelles de papier filtre sont déposées dans des tubes à scintillation avec 3ml de liquide scintillant. La quantité de thymidine incorporée est déterminée par un compteur à scintillation liquide (Beckman Instruments, Irving, C.A.). Les résultats sont obtenus en coups par minute.

III - RESULTATS

Les souris sont immunisées par voie sous-cutanée, ce qui permet le développement de la réponse immunitaire dans la rate et les ganglions drainants. Les cellules issues de ces organes sont cultivées en présence et en absence d'antigène. Les immunogènes utilisés sont soit le lipopeptide (190-211 ou 115-131) soit l'un des différents mélanges combinatoires.

1 - Cytotoxicité des lipopeptides pour les cellules en culture

Les cellules spléniques issues de souris immunisées sont mises en culture en présence ou en absence (témoin négatif) d'antigènes. Lorsque l'antigène est sous forme lipidique (lipopeptide ou mélanges combinatoires), nous observons une mort cellulaire. Les lipopeptides sont cytotoxiques pour les cellules en culture. La restimulation des cellules primées par un antigène sera réalisée avec le peptide correspondant (190-211 ou 115-131).

2 - Etudes avec des souris non syngéniques

a - Utilisation des mélanges combinatoires dérivés du peptide 115-131

Les expérimentations ont été réalisées avec 7 lots de 5 souris OF1. Les animaux sont immunisés par 3 injections sous-cutanées avec 50 µg de lipopeptide 115-131 ou d'un des 6 mélanges combinatoires. Les cellules spléniques issues de ces souris sont mises en culture et restimulées avec le peptide 115-131. Nous savons que ce peptide est un mauvais immunogène, et nous espérons grâce à l'utilisation des mélanges combinatoires de peptides ne variant que par leur partie agrétopique, pouvoir augmenter la sensibilité de la réponse lymphocytaire T. La réponse cellulaire de chaque souris doit être analysée de façon individuelle. Les résultats obtenus sont représentés figure 50.

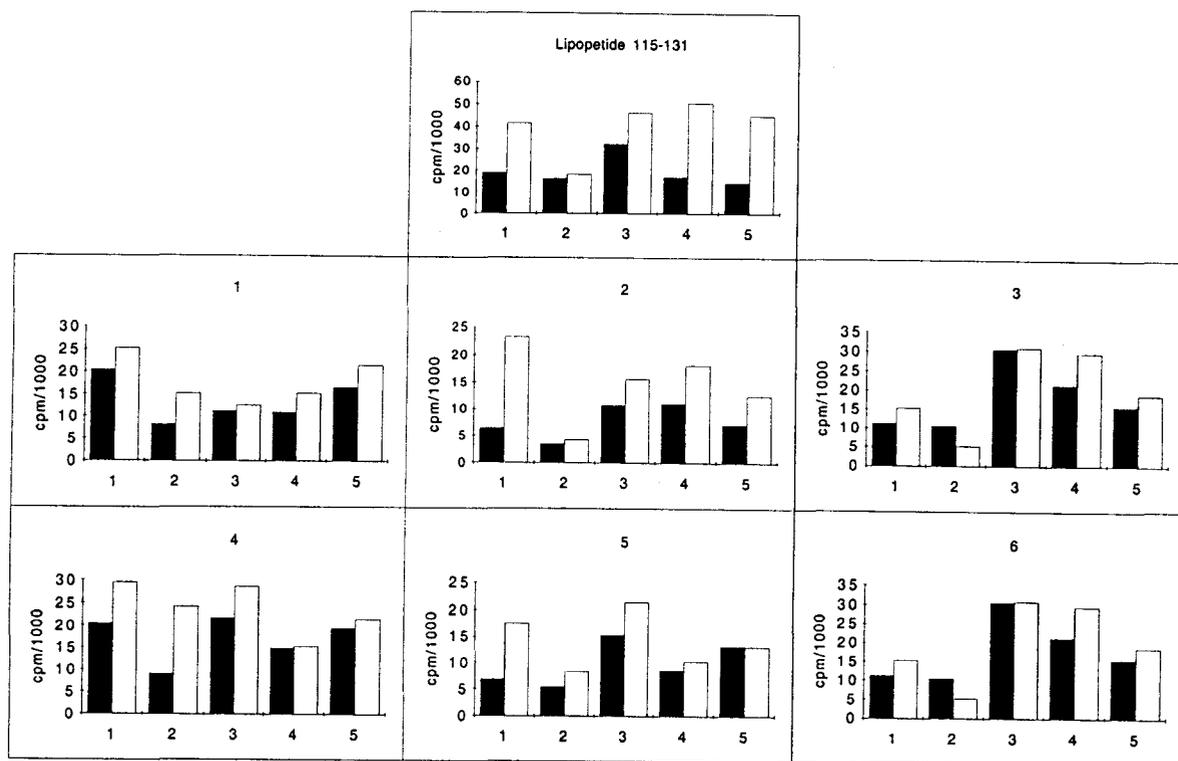


Figure 50 : Prolifération de cellules issues de souris immunisées avec 50µg de lipopeptide 115-131 ou d'un des 6 mélanges combinatoires (1 à 6 (figure48)) et restimulées avec 20µg de peptide 115-131 (barres blanches). La réponse individuelle des 5 souris de chaque lot est exprimée en cpm. Les témoins négatifs (barres noires) correspondent à des cellules cultivées en absence d'antigène.

Un nombre de cpm supérieur à 2 fois celui du bruit de fond indique que les lymphocytes T ont proliféré sous l'action de l'antigène de stimulation et confirme la sensibilité des cellules T à l'immunogène utilisé. Les résultats obtenus nous indiquent que nos mélanges de peptides ne varient que par leur partie agrétopique obtenus par synthèse combinatoire, n'augmentent pas la capacité de réponse d'individus faiblement répondeurs à la séquence initiale du peptide 115-131.

b - Utilisation des mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211

Les expérimentations ont été réalisées avec 12 lots de 5 souris OF1. Les animaux sont immunisés par 3 injections sous-cutanées avec 50 µg de lipopeptide 190-211 ou d'un des 11 mélanges combinatoires. Les cellules spléniques issues de ces souris sont mises en culture et restimulées avec le peptide 190-211. Les résultats obtenus sont représentés figure 51.

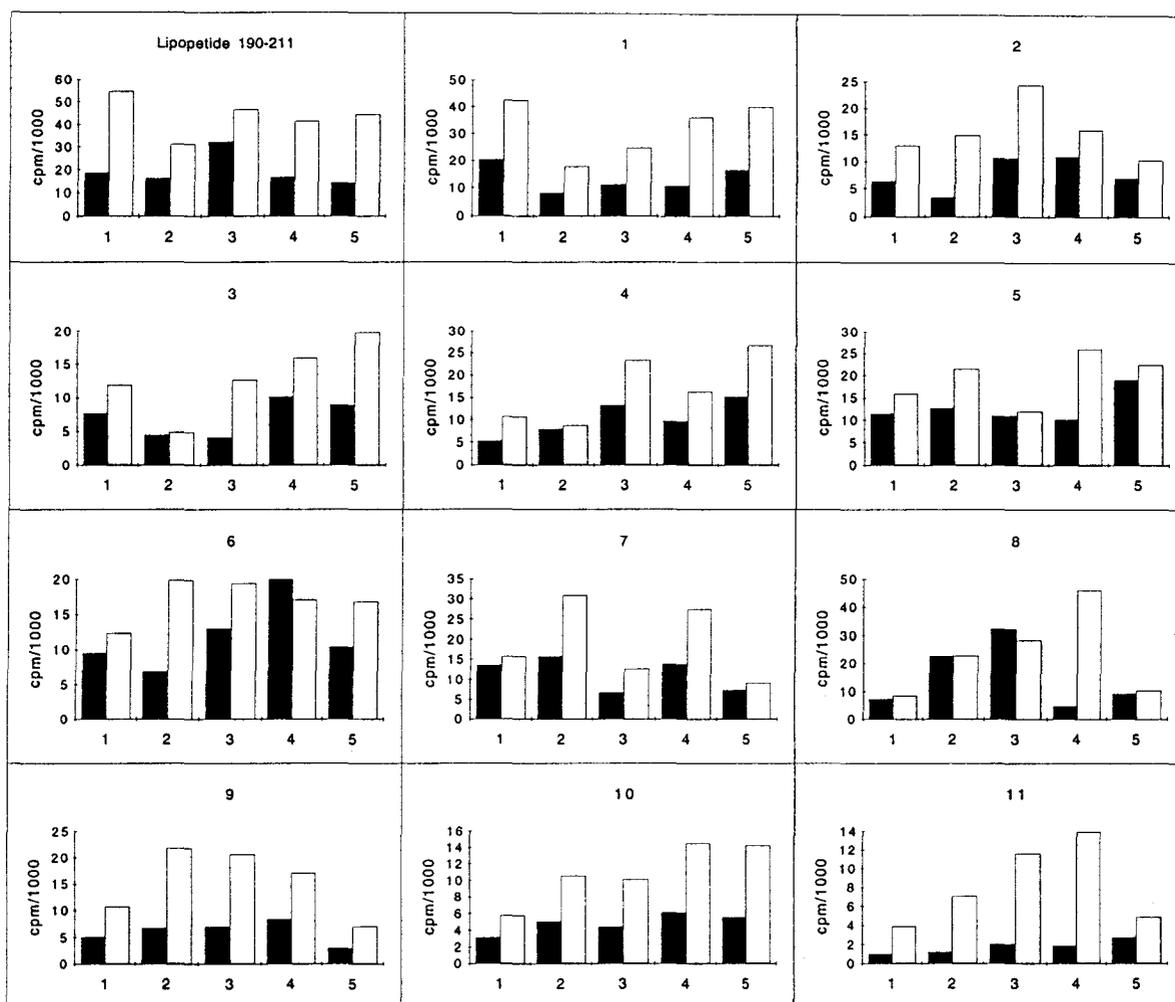


Figure 51 : Prolifération de cellules issues de souris immunisées avec 50µg de lipopeptide 190-211 ou d'un des 11 mélanges combinatoires (1 à 11 (figure19)) et restimulées par 20µg de peptide 190-211 (barres blanches). La réponse individuelle des 5 souris de chaque lot est exprimée en cpm. Les témoins négatifs (barres noires) correspondent à des cellules cultivées en absence d'antigène.

Ces résultats nous montrent que des cellules sensibilisées par un immunogène combinatoire sont capables de reconnaître la séquence initiale du peptide. Nous constatons que certains mélanges augmentent la capacité de réponse d'individus faiblement répondeurs à la séquence initiale du peptide 190-211. Pour plus de clarté, ces résultats sont résumés figure 52.

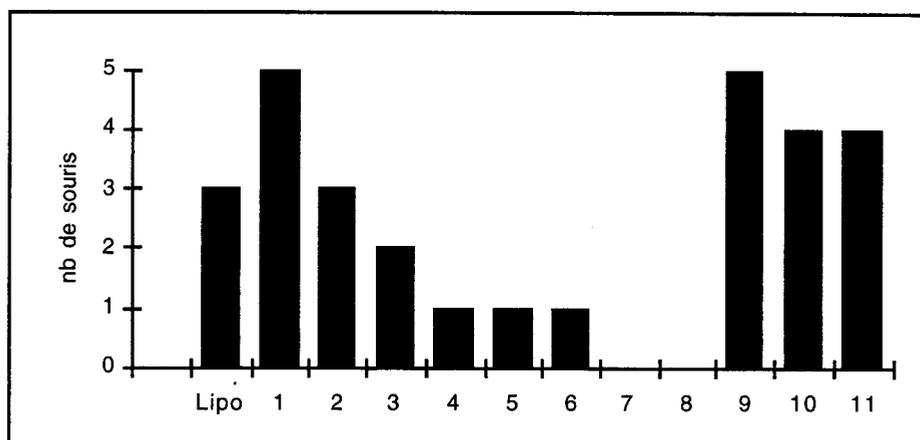


Figure 52 : Nombre de souris bonnes répondeuses à la restimulation avec 20 µg de peptide 190-211 en fonction de chaque immunogène utilisé (lipopeptide 190-211 (lipo) ou un des 11 mélanges combinatoires (numérotés de 1 à 11 de la partie N vers la partie C-terminale) (figure 49)).

Ces résultats nous indiquent que les cellules primées par les mélanges combinatoires obtenus par dégénérescence des parties amino (mélanges 1 et 2) et carboxy-terminale (mélanges 9, 10, 11) du peptide 190-211 et restimulées avec la séquence initiale du peptide, prolifèrent de façon significative. L'utilisation de ces mélanges comme immunogènes permet d'augmenter le nombre de cellules capables de présenter le peptide 190-211 aux molécules de CMH.

D'après ces résultats, le peptide 190-211 contiendrait deux épitopes T situés à ses extrémités amino et carboxy-terminale. Ces expériences ont été réalisées sur un petit nombre de souris (5 par lot), ce qui n'est pas représentatif d'une population. Nous avons recommencé la même expérimentation en travaillant avec 12 lots de 10 souris OF1. Les résultats obtenus sont récapitulés figure 53.

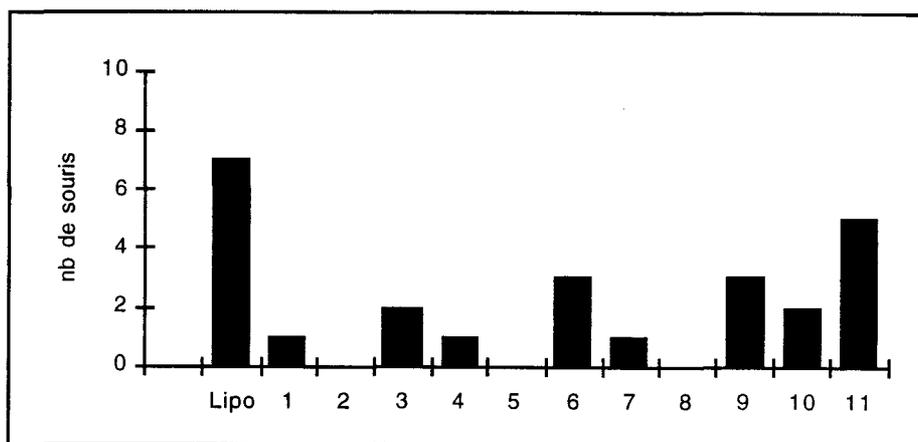


Figure 53 : Nombre de souris bonnes répondeuses à la restimulation avec 20 µg de peptide 190-211 en fonction de chaque immunogène utilisé (lipopeptide 190-211 (lipo) ou un des 11 mélanges combinatoires (numérotés de 1 à 11 de la partie N vers la partie C-terminale)).

Ces résultats ne corrèlent pas avec ceux précédemment observés (figure 52). Les résultats obtenus à partir de souris non syngéniques ne sont pas généralisables et donc difficiles à extrapoler à une population.

3 - Etudes avec des souris syngéniques : utilisation des mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211

La finalité des mélanges combinatoires de peptides ne variant que par leur partie agrétopique, est de rendre des individus mauvais répondeurs vis à vis de la séquence initiale du peptide bons répondeurs. Notre objectif est d'utiliser ces mélanges comme immunogènes pour augmenter la sensibilité de la réponse lymphocytaire T. La souche de souris syngéniques (haplotype bien défini) que nous utiliserons, sera une souche mauvaise répondeuse vis à vis de la séquence initiale du peptide 190-211.

a - Choix d'une souche mauvaise répondeuse

Trois souches de souris syngéniques sont à notre disposition : Balb/c (H-2K^d), C57Bl/6 (H-2K^b) et CBA (H-2K^k). Chaque lot de 3 souris est immunisé avec 50 µg de lipopeptide 190-211.

α - Etude de la réponse cellulaire

Les cellules de rates et de ganglions drainants sont testées séparément et restimulées avec le peptide 190-211. Les résultats obtenus avec les cellules spléniques d'une part, et les cellules ganglionnaires d'autre part, sont représentés figures 54 et 55 respectivement.

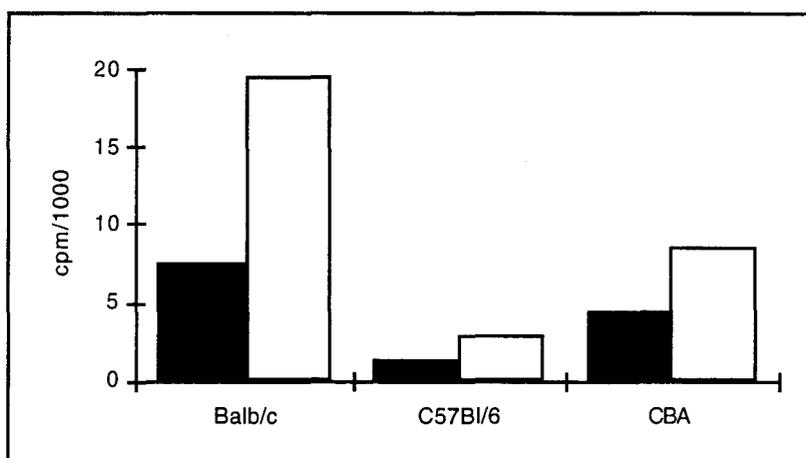


Figure 54 : Prolifération (cpm) de cellules spléniques issues de souris (Balb/c, C57Bl/6 et CBA) immunisées avec 50 μ g de lipopeptide 190-211 et restimulées par 20 μ g de peptide 190-211 (barres blanches). Les témoins négatifs (barres noires) correspondent à des cellules cultivées en absence d'antigène.

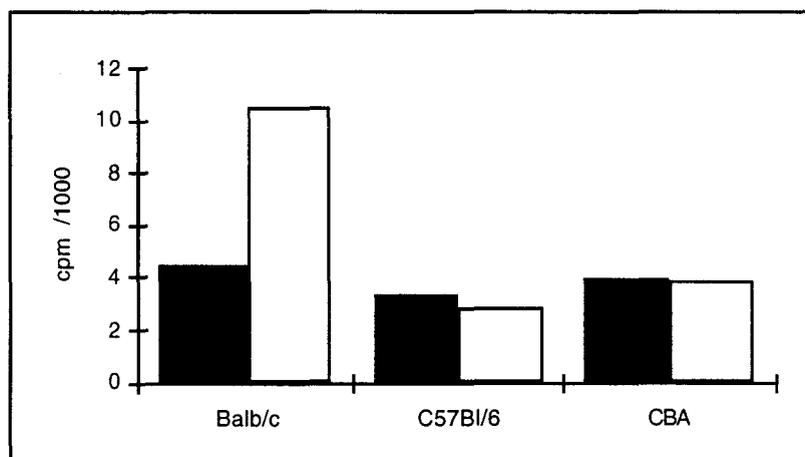


Figure 55 : Prolifération (cpm) de cellules ganglionnaires issues de souris (Balb/c, C57Bl/6 et CBA) immunisées avec 50 μ g de lipopeptide 190-211 et restimulées par 20 μ g de peptide 190-211 (barres blanches). Les témoins négatifs (barres noires) correspondent à des cellules cultivées en absence d'antigène.

Les résultats obtenus avec les cellules spléniques et ganglionnaires sont comparables, et nous montrent que les souris Balb/c sont de bonnes répondeuses vis à vis du peptide 190-211, et que les CBA et les C57Bl/6 en sont de mauvaises.

β - Etude de la réponse humorale

Pour nous aider dans le choix de la souche à utiliser, nous avons complété notre démarche par une étude de la réponse humorale. Nous avons recherché des anticorps (IgG) dirigés contre le peptide 190-211 dans des sérums de souris immunisées par 3 injections de 50 μ g de lipopeptide 190-211. Pour chaque souche, les sérums sont réunis et testés vis à vis du peptide 190-211 en ELISA. Les résultats sont représentés figure 56.

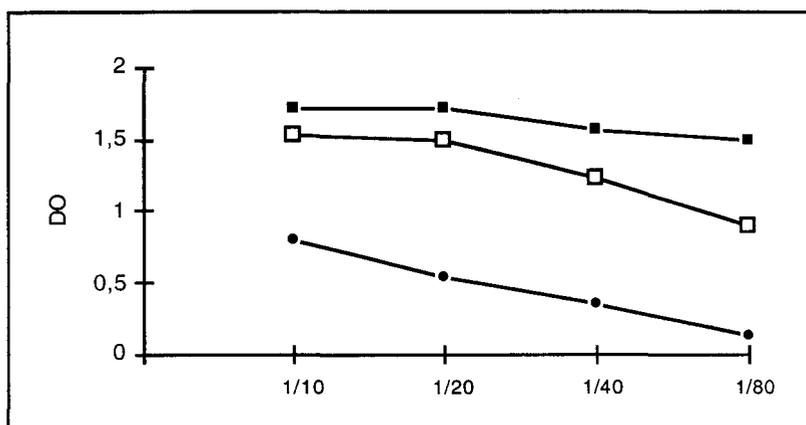


Figure 56 : Réponse humorale (IgG) obtenue avec des sérums de souris (C57Bl/6 : carrés noirs, Balb/c : carrés blancs et CBA : ronds noirs) immunisées par 3 injections de 50 μ g de lipopeptide 190-211. Les sérums sont prélevés 60 jours après la première immunisation et testés en ELISA. L'antigène en phase solide est le peptide 190-211. Les sérums sont dilués du 1/10 au 1/80.

Les anticorps anti-peptide 190-211 sont nombreux dans les sérums de souris Balb/c et C57Bl/6, et peu représentés dans les sérums de souris CBA.

Les souris Balb/c sont de bonnes répondeuses vis à vis du peptide 190-211 (réponses cellulaire et humorale). Les C57Bl/6 donnent une réponse moyenne (bonne réponse humorale, mais pas de réponse cellulaire).

Les souris CBA sont quant à elles de mauvaises répondeuses vis à vis du peptide 190-211, que ce soit en réponse cellulaire ou humorale. Cette souche est donc la candidate idéale pour la suite de notre étude dont l'objectif est d'amplifier

la réponse d'individus faiblement répondeurs vis à vis du peptide d'origine (190-211), au moyen des mélanges combinatoires de peptides ne différant que par leur partie agrétopique.

b - Résultats obtenus avec des souris CBA

Pour éviter de sacrifier un trop grand nombre d'animaux, nous avons décidé d'injecter plusieurs mélanges combinatoires en même temps :

le mélange A contient les mélanges combinatoires 1, 2, 3, 4 et 5

le mélange B contient les mélanges combinatoires 4, 5, 6, 7 et 8

le mélange C contient les mélanges combinatoires 7, 8, 9, 10 et 11.

Les souris (CBA) sont immunisées par 3 injections sous-cutanées du lipopeptide 190-211 ou de l'un des 3 mélanges (A, B, C).

α - Etude de la réponse cellulaire

Les cellules spléniques et ganglionnaires primées avec le lipopeptide 190-211 ou l'un des 3 mélanges (A, B, C) sont mises en culture en présence du peptide 190-211. Les résultats obtenus avec les cellules spléniques sont représentés figure 57.

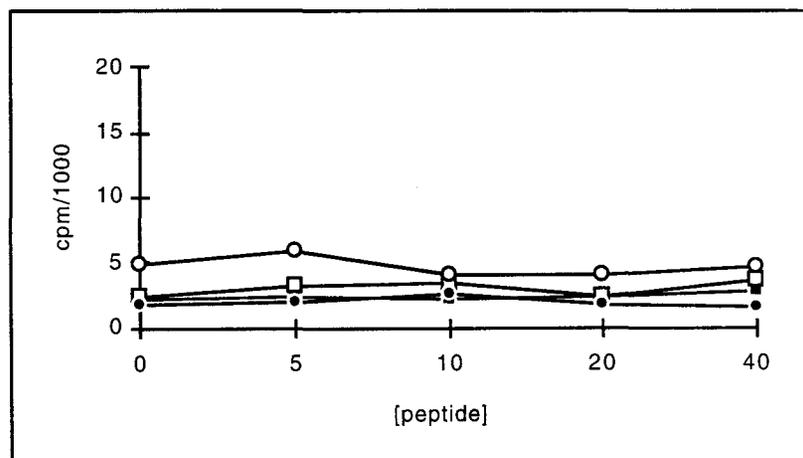


Figure 57 : Prolifération (cpm) de cellules spléniques issues de souris CBA immunisées avec 50µg de lipopeptide 190-211 (ronds blancs), ou d'un des mélanges A (carrés noirs), B (carrés blancs), C (ronds noirs) et restimulées avec le peptide 190-211 ([peptide] en µg/ml).

Ces résultats nous montrent que les cellules spléniques de souris immunisées avec le lipopeptide 190-211 ou l'un des mélanges A, B, C, et restimulées avec le peptide 190-211 ne prolifèrent pas de façon significative. Les résultats obtenus avec les cellules ganglionnaires sont illustrés figure 58.

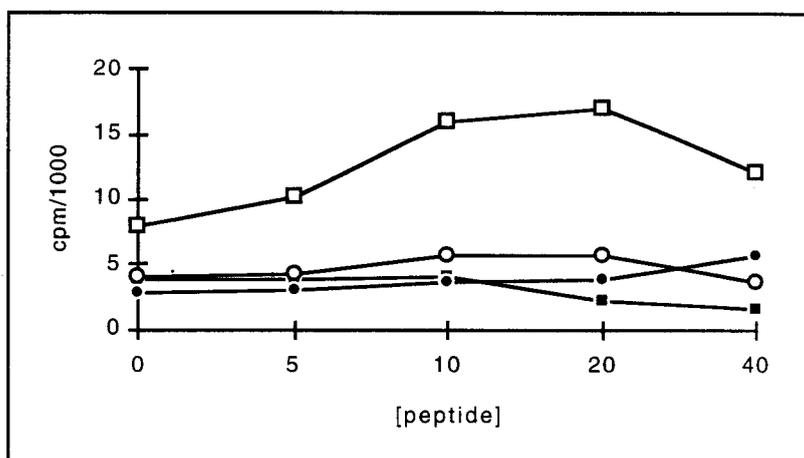


Figure 58 : Prolifération (cpm) de cellules ganglionnaires issues de souris CBA immunisées avec 50µg de lipopeptide 190-211 (ronds blancs), ou d'un des mélanges A (carrés noirs), B (carrés blancs), C (ronds noirs) et restimulées avec le peptide 190-211 (µg/ml).

Ces résultats nous montrent que seules les cellules ganglionnaires sensibilisées par le mélange B et restimulées par le peptide 190-211, prolifèrent de façon significative. La capacité de réponse d'individus faiblement répondeurs à la séquence initiale du peptide 190-211 a été augmentée par l'utilisation du mélange B comme immunogène.

β - Etude de la réponse humorale

Les sérums de souris immunisées par 3 injections sous-cutanée de lipopeptide 190-211 ou de l'un des mélanges (A, B, C) sont testés en ELISA pour rechercher les anticorps (IgG) dirigés contre le peptide 190-211. Les résultats sont représentés figure 59.

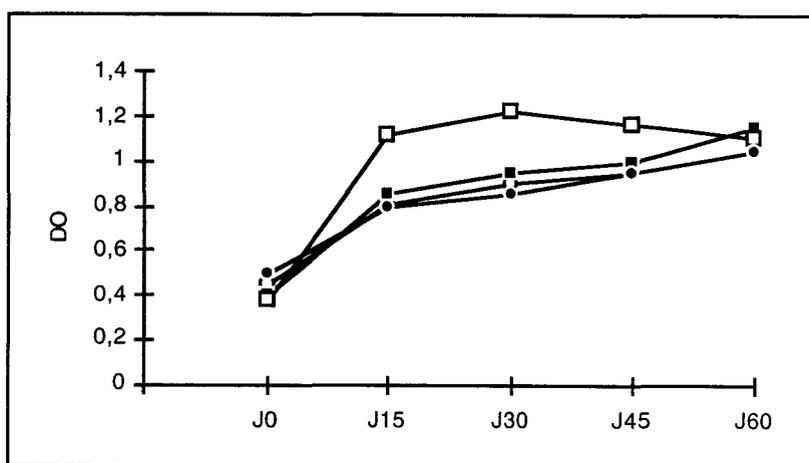


Figure 59 : Résultats des ELISA (recherche d'IgG) avec des sérums de CBA immunisés par 3 injections de lipopeptide 190-211 (ronds blancs), ou de l'un des mélanges A (carrés noirs), B (carrés blancs), ou C (ronds noirs). La DO est donnée en fonction des jours après la première immunisation (J0). Les sérums sont dilués au 1/10. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211.

L'immunisation avec le mélange B induit une production d'anticorps plus élevée que ne le font le lipopeptide 190-211 ou les mélanges A et C. Un, ou plusieurs, des mélanges combinatoires contenu dans le mélange permet l'amplification de la réponse immunitaire (cellulaire et humorale) vis à vis du peptide 190-211.

c - Etude du mélange B

Nous venons de voir que le mélange B, contenant les mélanges combinatoires 4 (ENLUUUSPRLAKUUUNRPATPFK), 5 (ENLLUUUPRLAKYUUURPATPFK), 6 (ENLLAUUURLAKYLUUUPATPFK), 7 (ENLLASUUULAKYLSUUUATPFK), et 8 (ENLLASSUUUAKYLSNUUUTPFK), permet d'augmenter la sensibilité de la réponse immunitaire vis à vis du peptide 190-211. Nous devons maintenant déterminer quels sont le, ou les mélanges combinatoires impliqués dans l'amplification de la fixation des peptides aux molécules de CMH. Pour cela, nous avons immunisé des souris CBA avec chacun des mélanges combinatoires contenus dans le mélange B. Les cellules spléniques et ganglionnaires sont restimulées avec le peptide 190-211. Les cellules spléniques sensibilisées avec les mélanges combinatoires, ne montrent pas de prolifération significative quand elles sont

restimulées avec le peptide 190-211. Les résultats obtenus avec les cellules ganglionnaires sont illustrés figure 60.

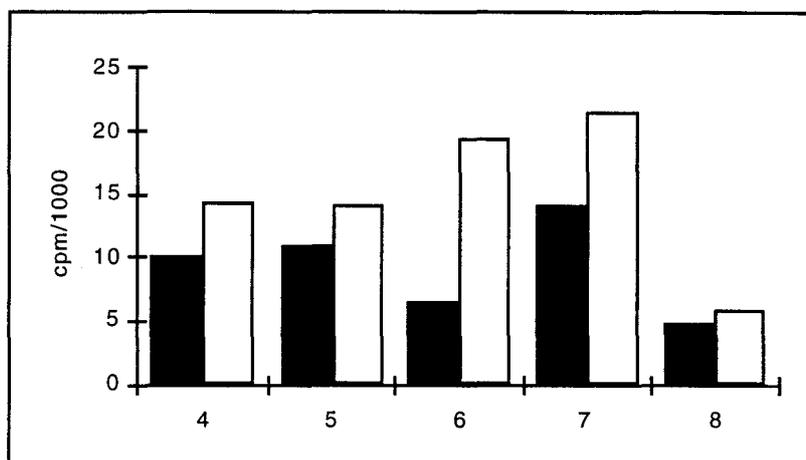


Figure 60 : Prolifération (cpm) de cellules ganglionnaires issues de souris CBA immunisées avec 50µg d'un des mélanges combinatoires 4, 5, 6, 7 et 8, et restimulées avec 20µg de peptide 190-211 (barres blanches). Les témoins négatifs (barres noires) correspondent à des cellules cultivées en absence d'antigène.

Les résultats obtenus nous montrent que seules les cellules ganglionnaires primées avec le mélange 6 et restimulées avec le peptide 190-211, prolifèrent de façon significative. Le mélange combinatoire (ENLLAUUURLAKYLUUUPATPFK) de peptides ne variant que par leur partie agrétopique, permet d'augmenter la capacité de réponse d'individus faiblement répondeurs à la séquence initiale du peptide 190-211.

D - DISCUSSION

Dans le but d'augmenter la capacité de réponse d'individus faiblement répondeurs à la séquence initiale d'un peptide, nous avons utilisé comme immunogènes des mélanges de peptides ne variant que par leur partie agrétopique, obtenus par synthèse combinatoire.

Nos premiers travaux ont été réalisés avec des souris non syngéniques (OF1). L'immunisation de ces souris avec les 6 mélanges combinatoires dérivés de la séquence initiale du peptide 115-131, n'augmente pas la sensibilité de la réponse lymphocytaire T (figure 50). En revanche, les mélanges combinatoires dérivés des extrémités amino (mélanges 1 et 2) et carboxy-terminales (mélanges 9, 10 et 11) du peptide 190-211, permettent d'augmenter le nombre de cellules capables de présenter le peptide 190-211 aux molécules de CMH (figure 52). D'après ces résultats, le peptide 190-211 contiendrait 2 épitopes T. Pour vérifier l'existence de ces 2 épitopes, nous avons synthétisé les peptides 190-200 et 201-211, que nous avons utilisés pour restimuler des cellules primées avec le lipopeptide 190-211 ou avec un des mélanges combinatoires (résultats non montrés). Aucune prolifération significative n'a été observée, que l'antigène soit le peptide 190-200 ou le peptide 201-211. Ces expériences ayant été réalisées sur un petit nombre de souris (5 par lot), ce qui n'est pas représentatif d'une population, nous avons recommencé les mêmes expérimentations avec des lots de 10 souris. Les résultats que nous avons alors obtenus ne corrèlent pas avec les premiers. Les résultats obtenus avec des souris non syngéniques n'étant pas généralisables, nous avons décidé de travailler par la suite avec des souris syngéniques.

Notre choix de la souche de souris à utiliser s'est porté sur des souris CBA qui sont de mauvaises répondeuses vis à vis du peptide 190-211, que ce soit en

réponse cellulaire (figure 55) ou humorale (figure 56). Cette souche s'est avérée être la candidate idéale pour tester nos mélanges combinatoires dont la finalité est de rendre des individus faiblement répondeurs vis à vis de la séquence initiale du peptide 190-211 bons répondeurs. Pour éviter de sacrifier un trop grand nombre d'animaux, les mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211 sont utilisés en mélange. Les 3 mélanges obtenus, A (mélanges 1 à 5), B (mélanges 4 à 8) et C (mélanges 7 à 11) sont utilisés comme immunogènes. L'étude de la réponse cellulaire (figure 58) nous montre que seules les cellules sensibilisées avec le mélange B et restimulées avec le peptide 190-211, prolifèrent de façon significative. Le mélange B permet l'amplification de la réponse cellulaire vis à vis du peptide 190-211. L'étude de la réponse humorale (figure 59), nous amène à la même conclusion. Chacun des mélanges combinatoires contenus dans le mélange B a été étudié individuellement. Les résultats indiquent (figure 60) que seules les cellules primées avec le mélange combinatoire 6, et restimulées avec le peptide 190-211 prolifèrent de façon significative. Ce mélange combinatoire (ENLLAUUURLAKYLYLUUUPATPFK) de peptides ne variant que par leur partie agrétopique, permet d'amplifier la réponse lymphocytaire T vis à vis de la séquence initiale du peptide 190-211.

E - CONCLUSION

Les cellules sensibilisées par un mélange de peptides ne varient que par leur partie agrétopique, obtenus par synthèse combinatoire, sont restimulables par la séquence initiale du peptide. Un tel mélange permet d'augmenter la capacité de réponse d'individus faiblement répondeurs vis à vis du peptide d'origine, en permettant son association à un plus grand nombre de variants du CMH.

Dès que les résultats obtenus avec les souris CBA auront été confirmés, une expérimentation sur un grand nombre de souris non syngéniques devra être réalisée, en prenant comme immunogène le mélange de peptides (ENLLAUUURLAKYLUUUPATPFK) et réaliser ainsi une étude statistique. La généralisation des résultats obtenus avec ces souris pourraient permettre une extrapolation à la population humaine.

Outre son intérêt en recherche fondamentale, la notion de mélanges combinatoires utilisés comme immunogènes a un intérêt en vaccinologie. Le succès de la première pourrait permettre l'étude de la seconde chez l'homme.

UTILISATION DE PEPTIDES MODIFIES EN VACCINATION PAR VOIE ORALE

A - INTRODUCTION	145
B - MATERIEL ET METHODES	147
1 - Réactifs utilisés en synthèse peptidique.....	147
2 - Matériel utilisé en immunologie.....	147
a - Réactifs.....	147
b - Animaux.....	148
3 - Synthèse peptidique.....	148
4 - Broyage des peptidyl-résines.....	148
5 - Immunisations.....	148
a - Immunisation par voie orale.....	148
α - Immunisation par intubation.....	148
β - Ingestion dans du lait.....	149
b - Immunisation sous-cutanée.....	149
c - Immunisation intra-péritonéale.....	149
6 - Infestations.....	149
7 - Prélèvements des sérums.....	150
8 - Prélèvements des liquides intestinaux.....	150
9 - Tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	151
C - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE	152
I - STRATEGIE ET CONCEPTION DES PEPTIDES	152
1 - Stratégie.....	152
2 - Synthèse peptidique.....	154
II - RESULTATS	155
1 - Résultats obtenus avec le lipopeptide 190-211 modifié sur son extrémité amino-terminale.....	155
a - CLHP en phase inverse préparative.....	155
b - CLHP en phase inverse analytique.....	156
c - Spectrométrie de masse.....	157
d - Analyse d'acides aminés.....	157
2 - Résultats obtenus avec les peptidyl-résines.....	158
D - ETUDES IMMUNOLOGIQUES	159
I - TESTS DE PROTECTION	159
1 - Résultats obtenus par immunisation intrapéritonéale.....	160
2 - Résultats obtenus par immunisation sous-cutanée.....	160

II - GAVAGES PAR INTUBATION : DOSE 1	160
1 - Résultats obtenus avec le peptide 190-211 libre.....	161
2 - Résultats obtenus avec le lipopeptide libre.....	162
3 - Résultats obtenus avec la peptidyl-résine.....	163
4 - Résultats obtenus avec la lipopeptidyl-résine	164
5 - Récapitulatif des résultats obtenus avec la dose 1.....	165
III - GAVAGES PAR INTUBATION : DOSE 2	166
1 - Résultats obtenus avec le peptide 190-211 libre.....	166
2 - Résultats obtenus avec le lipopeptide libre.....	167
3 - Résultats obtenus avec la peptidyl-résine.....	168
4 - Résultats obtenus avec la lipopeptidyl-résine	169
5 - Récapitulatif des résultats obtenus avec la dose 2.....	170
IV - GAVAGES DANS DU LAIT	171
1 - Résultats obtenus avec la peptidyl-résine 190-211	171
2 - Résultats obtenus avec la lipopeptidyl-résine	172
E - DISCUSSION	174
F - CONCLUSION	177

UTILISATION DE PEPTIDES MODIFIES EN VACCINATION PAR VOIE ORALE

A - INTRODUCTION

Actuellement, la plupart des vaccins sont injectés par voie intradermique ou sous-cutanée. La possibilité d'administrer des vaccins par voie orale est un concept qui s'est considérablement développé ces dernières années (Gilligan, C.A. and Li Wan Po, A. 1991 - Manganaro, M. et coll. 1994). Les efforts réalisés pour approfondir la connaissance du système immunitaire muqueux ont fait évoluer les recherches dans ce sens (McGhee, J.R. et coll. 1992 - Staats, H.F. et coll. 1994).

La principale caractéristique de la réponse immunitaire muqueuse est la production d'IgA sécrétoires (Mestecky, J. et McGhee, J.R. 1987), retrouvées au niveau des différentes sécrétions muqueuses sous forme dimérique. Les antigènes circulants sont véhiculés de la lumière intestinale jusqu'aux différents follicules lymphoïdes par des cellules spécialisées, appelées cellules M (Neutra, M.R. and Kraehenbuhl, J.P. 1994). Les conditions de prise en charge et de transport des antigènes par ces cellules ne sont pas encore bien connues. Les follicules lymphoïdes sont soit libres, soit associés entre eux pour former les plaques de Peyer qui sont le siège de la réponse immune muqueuse. Cette réponse est déclenchée par l'arrivée de l'antigène et conduit à une libération massive d'IgA sécrétoires dans la lumière intestinale, entraînant la protection des muqueuses qui sont la porte d'entrée dans l'organisme de nombreux agents pathogènes.

Pour une bonne protection, il est souvent nécessaire de stimuler l'immunité locale. *Schistosoma mansoni* provoque une bilharziose intestinale et hépatosplénique. Il est donc intéressant de réaliser une immunisation par voie orale chez l'animal à l'aide de peptides synthétiques pour induire une protection au niveau des muqueuses. Il faut pour cela que le peptide choisi comme immunogène soit capable de déclencher une réponse immunitaire satisfaisante. Pancré, V. et coll. (1994) ont montré que parmi 8 peptides issus de la protéine Sm28GST, seul le peptide 190-211 correspondant à l'extrémité carboxylique de la protéine, est capable de reproduire en partie l'effet de protection obtenu avec la protéine entière. L'immunisation de souris par ce peptide acylé sur sa fonction amino-terminale par un acide α -amino-hexadécanoïque, permet une réponse cellulaire protectrice efficace et durable. Xu, C.B. et coll. (1993) ont démontré que l'immunisation de souris avec le peptide 190-211 entraîne la production d'anticorps responsables de la diminution de la charge parasitaire et de la fécondité des vers. Grzych, J.M. et coll. (1993) ont montré que les anticorps d'isotype IgA de patients infestés par *Schistosoma mansoni* réduisaient la charge parasitaire en limitant à la fois la ponte des œufs des vers adultes et en diminuant la viabilité des œufs. Le peptide que nous avons choisi comme modèle est le peptide 190-211.

B - MATERIEL ET METHODES

1 - Réactifs utilisés en synthèse peptidique

Acétonitrile : Scharlau - Acide acétique : Merck - Acide chlorhydrique : Merck - Acide fluorhydrique (HF) : Setic Labo - Acide palmitique : Merck - Acide trifluoroacétique (TFA) : Jansen Chemica - Anhydride acétique : Jansen Chemica - tBOC-acides aminés : Novabiochem - Hexafluorophosphate de benzotriazoloxyltrisdiméthylaminophosphonium (BOP) : Richelieu Biotechnologies - p-crésol : Aldrich - Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) : Jansen Chemica - Dichlorométhane (DCM) : Lambert et Rivière - Diisopropyléthylamine (DIEA) : Aldrich - Diméthylsulfoxyde : Jansen Chemica - Hydroxybenzotriazole (HOBT) : Jansen Chemica - N-méthylpyrrolidone (NMP) : Aldrich - Phénol : Aldrich - Pipéridine : Aldrich - Résine aminométhyle : Novabiochem - Résine MBHA : Applied Biosystem - p-thiocrésol : Aldrich.

2 - Matériel utilisé en immunologie

a - Réactifs

Acide sulfurique : Prolabo - Acide citrique : Aldrich - Acide éthylène-diaminetétraacétique sel disodique (EDTA) : Prolabo - Adjuvant de Freund : Difco, Détroit - Hydroxyde d'aluminium (ALUN) : Boehringer - Anti-IgA de souris : Sigma - Disodium carbonate : Aldrich - Disodium sulfate : Merck - Bovine Serum Albumine (BSA) : Sigma - Sodium hydrogénécarbonate : Aldrich - Chlorure de sodium : Merck - Chlorure de potassium : Prolabo - Eau oxygénée : Prolabo - Ethanol : Carlo Erba - Lait concentré sucré : Nestlé - Milieu de Hank's : Gibco - Orthophénylènediamine (OPD) : Sigma - Disodium hydrogénéphosphate : Aldrich - Sodium dihydrogénéphosphate : Aldrich - Pilocarpine : Sigma - Plaques de microtitration : Nunc, Danemark - Fluorure de paraméthylsulfonyl (PMSF) : Boehringer - Polyéthylène glycol : Sigma - Tween20 : Sigma - Soybean trypsin inhibitor (STI) : Merck.

b - Animaux

Les souris Balb/c proviennent de chez Iffa Credo (L'Arbresle, France). Les souris sont âgées d'environ 6 semaines au début des expériences.

3 - Synthèse peptidique

Les techniques de synthèse, déprotection, purification et caractérisation ont été décrites dans le premier chapitre.

4 - Broyage des peptidyl-résines

Les peptides et lipopeptides fixés sur le polymère inerte, sont mis dans un tube cylindrique avec deux billes en acier. Le système est posé sur un agitateur rotatif qui est mis en mouvement pendant 72 heures. La majorité des peptidyl-résines ainsi broyées ont alors une taille comprise entre 5 et 10 μm .

5 - Immunisations

a - Immunisation par voie orale

α - Immunisation par intubation

Les souris sont mises à jeun 12 heures avant l'immunisation et reçoivent les peptides par intubation aux jours J1, J10, J16, J22, et J32 selon le protocole proposé par Lange, S. et Holmgren, J. (1978). Pour les peptides libres, la quantité administrée est de 100 ou 200 μg /souris dans 100 μl d'une solution constituée de tampon phosphate (NaCl : 0,14M, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 1M, pH 7,2) et de NaHCO₃ (10%, pH8,5), 1/1, v/v. Pour les peptidyl-résines, la quantité administrée est de 1 ou 2 mg/souris, correspondant à environ 100 ou 200 μg de peptide libre.

UTILISATION DE PEPTIDES MODIFIES EN VACCINATION PAR VOIE ORALE

A - INTRODUCTION

Actuellement, la plupart des vaccins sont injectés par voie intradermique ou sous-cutanée. La possibilité d'administrer des vaccins par voie orale est un concept qui s'est considérablement développé ces dernières années (Gilligan, C.A. and Li Wan Po, A. 1991 - Manganaro, M. et coll. 1994). Les efforts réalisés pour approfondir la connaissance du système immunitaire muqueux ont fait évoluer les recherches dans ce sens (McGhee, J.R. et coll. 1992 - Staats, H.F. et coll. 1994).

La principale caractéristique de la réponse immunitaire muqueuse est la production d'IgA sécrétoires (Mestecky, J. et McGhee, J.R. 1987), retrouvées au niveau des différentes sécrétions muqueuses sous forme dimérique. Les antigènes circulants sont véhiculés de la lumière intestinale jusqu'aux différents follicules lymphoïdes par des cellules spécialisées, appelées cellules M (Neutra, M.R. and Kraehenbuhl, J.P. 1994). Les conditions de prise en charge et de transport des antigènes par ces cellules ne sont pas encore bien connues. Les follicules lymphoïdes sont soit libres, soit associés entre eux pour former les plaques de Peyer qui sont le siège de la réponse immune muqueuse. Cette réponse est déclenchée par l'arrivée de l'antigène et conduit à une libération massive d'IgA sécrétoires dans la lumière intestinale, entraînant la protection des muqueuses qui sont la porte d'entrée dans l'organisme de nombreux agents pathogènes.

Pour une bonne protection, il est souvent nécessaire de stimuler l'immunité locale. *Schistosoma mansoni* provoque une bilharziose intestinale et hépatosplénique. Il est donc intéressant de réaliser une immunisation par voie orale chez l'animal à l'aide de peptides synthétiques pour induire une protection au niveau des muqueuses. Il faut pour cela que le peptide choisi comme immunogène soit capable de déclencher une réponse immunitaire satisfaisante. Pancré, V. et coll. (1994) ont montré que parmi 8 peptides issus de la protéine Sm28GST, seul le peptide 190-211 correspondant à l'extrémité carboxylique de la protéine, est capable de reproduire en partie l'effet de protection obtenu avec la protéine entière. L'immunisation de souris par ce peptide acylé sur sa fonction amino-terminale par un acide α -amino-hexadécanoïque, permet une réponse cellulaire protectrice efficace et durable. Xu, C.B. et coll. (1993) ont démontré que l'immunisation de souris avec le peptide 190-211 entraîne la production d'anticorps responsables de la diminution de la charge parasitaire et de la fécondité des vers. Grzych, J.M. et coll. (1993) ont montré que les anticorps d'isotype IgA de patients infestés par *Schistosoma mansoni* réduisaient la charge parasitaire en limitant à la fois la ponte des œufs des vers adultes et en diminuant la viabilité des œufs. Le peptide que nous avons choisi comme modèle est le peptide 190-211.

B - MATERIEL ET METHODES

1 - Réactifs utilisés en synthèse peptidique

Acétonitrile : Scharlau - Acide acétique : Merck - Acide chlorhydrique : Merck - Acide fluorhydrique (HF) : Setic Labo - Acide palmitique : Merck - Acide trifluoroacétique (TFA) : Jansen Chemica - Anhydride acétique : Jansen Chemica - tBOC-acides aminés : Novabiochem - Hexafluorophosphate de benzotriazoloxyltrisdiméthylaminophosphonium (BOP) : Richelieu Biotechnologies - p-crésol : Aldrich - Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) : Jansen Chemica - Dichlorométhane (DCM) : Lambert et Rivière - Diisopropyléthylamine (DIEA) : Aldrich - Diméthylsulfoxyde : Jansen Chemica - Hydroxybenzotriazole (HOBt) : Jansen Chemica - N-méthylpyrrolidone (NMP) : Aldrich - Phénol : Aldrich - Pipéridine : Aldrich - Résine aminométhyle : Novabiochem - Résine MBHA : Applied Biosystem - p-thiocrésol : Aldrich.

2 - Matériel utilisé en immunologie

a - Réactifs

Acide sulfurique : Prolabo - Acide citrique : Aldrich - Acide éthylène-diaminetétraacétique sel disodique (EDTA) : Prolabo - Adjuvant de Freund : Difco, Détroit - Hydroxyde d'aluminium (ALUN) : Boehringer - Anti-IgA de souris : Sigma - Disodium carbonate : Aldrich - Disodium sulfate : Merck - Bovine Serum Albumine (BSA) : Sigma - Sodium hydrogénécarbonate : Aldrich - Chlorure de sodium : Merck - Chlorure de potassium : Prolabo - Eau oxygénée : Prolabo - Ethanol : Carlo Erba - Lait concentré sucré : Nestlé - Milieu de Hank's : Gibco - Orthophénylènediamine (OPD) : Sigma - Disodium hydrogénéphosphate : Aldrich - Sodium dihydrogénéphosphate : Aldrich - Pilocarpine : Sigma - Plaques de microtitration : Nunc, Danemark - Fluorure de paraméthylsulfonyl (PMSF) : Boehringer - Polyéthylène glycol : Sigma - Tween20 : Sigma - Soybean trypsin inhibitor (STI) : Merck.

b - Animaux

Les souris Balb/c proviennent de chez Iffa Credo (L'Arbresle, France). Les souris sont âgées d'environ 6 semaines au début des expériences.

3 - Synthèse peptidique

Les techniques de synthèse, déprotection, purification et caractérisation ont été décrites dans le premier chapitre.

4 - Broyage des peptidyl-résines

Les peptides et lipopeptides fixés sur le polymère inerte, sont mis dans un tube cylindrique avec deux billes en acier. Le système est posé sur un agitateur rotatif qui est mis en mouvement pendant 72 heures. La majorité des peptidyl-résines ainsi broyées ont alors une taille comprise entre 5 et 10 μm .

5 - Immunisations

a - Immunisation par voie orale

α - Immunisation par intubation

Les souris sont mises à jeun 12 heures avant l'immunisation et reçoivent les peptides par intubation aux jours J1, J10, J16, J22, et J32 selon le protocole proposé par Lange, S. et Holmgren, J. (1978). Pour les peptides libres, la quantité administrée est de 100 ou 200 μg /souris dans 100 μl d'une solution constituée de tampon phosphate (NaCl : 0,14M, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 1M, pH 7,2) et de NaHCO₃ (10%, pH8,5), 1/1, v/v. Pour les peptidyl-résines, la quantité administrée est de 1 ou 2 mg/souris, correspondant à environ 100 ou 200 μg de peptide libre.

β - Ingestion dans du lait

Les souris (Balb/c) sont mises à jeun 12 heures avant l'immunisation. Les peptidyl-résines (dose 1 = 2mg, dose 2 = 5mg) sont mélangées à du lait concentré dans des boîtes de Pétri. Les souris sont isolées dans des cages individuelles avec une boîte de Pétri contenant l'immunogène pendant environ 8 heures. Cinq immunisations sont réalisées à J1, J10, J16, J22, et J32.

b - Immunisation sous-cutanée

Les souris sont immunisées par 4 injections de peptide 190-211 ou d'une de ces formes lipidiques (100µg à la première immunisation, 50µg par la suite), solubilisées dans 100µl d'eau distillée en présence de 100µl d'adjuvant de Freund incomplet (IFA). Les immunisations sont réalisées à la base de la queue par injection sous-cutanée à 7 jours d'intervalle.

c - Immunisation intra-péritonéale

Les souris sont immunisées par 3 injections de peptide 190-211 ou d'une de ces formes lipidiques solubilisés (50µg à la première immunisation, 25µg par la suite) dans 175µl d'eau distillée en présence de 25µl d'hydroxyde d'aluminium (ALUN) à la première immunisation, dans 187,5µl d'eau distillée en présence de 12,5µl d'ALUN par la suite. L'émulsion est mise en agitation pendant 1h30 pour que l'ALUN chélate la totalité des peptides. Les immunisations sont réalisées par injection intrapéritonéales à 15 jours d'intervalle.

6 - Infestations

Les souris sont infestées 24 heures après la dernière immunisation. Elles sont anesthésiées avec un mélange d'Imalgène (125 mg/kg) et de Valium (6,2mg/kg) par injection intra-péritonéale. La technique

d'infestation que nous utilisons a été décrite par Smithers, S.R. (1965). Le ventre des animaux est rasé et ceux-ci sont placés dans une gouttière. Un anneau est déposé et scotché sur leur ventre. Cet anneau va permettre d'accueillir 0,5ml d'eau d'aquarium contenant 50 cercaires. Le temps d'exposition des cercaires sur la peau dure 30 minutes.

Les cercaires proviennent d'une souche Porto-Ricaine de *Schistosoma manoni* en élevage à l'institut. L'hôte intermédiaire est le mollusque *Biomphalaria glabatra* et l'hôte définitif est le hamster doré.

7 - Prélèvements des sérums

Les saignées sont réalisées par des prélèvements en rétro-orbitale. Les tubes contenant le sang sont mis pendant 2 à 3 heures à 4°C, pour permettre aux globules rouges de coaguler et former un précipité. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 trs/mn pendant 30 minutes. Les surnageants (sérums) sont récupérés et conservés à -20°C.

8 - Prélèvements des liquides intestinaux

Quatre jours après la dernière immunisation par voie orale, (J36), les sécrétions intestinales sont récupérées selon la méthode de Elson et coll. (1984). Chaque souris subit quatre lavages gastriques à 15mn d'intervalle par intubation de 0,5ml d'une solution saline (NaCl 25mM, Na₂SO₄ 40mM, KCl 10mM, NaHCO₃ 20mM, polyéthylène glycol 48,5mM). Trente minutes après le dernier lavage, les souris reçoivent par injection intrapéritonéale 100µl de pilocarpine (1mg/ml dans du NaCl 0,9%), et sont placées sur une grille dans un cylindre en plastique. Le traitement induit la diarrhée et les sécrétions sont récupérées avec 1ml d'une solution d'inhibiteurs de protéases (0,1mg/ml de soybean trypsin inhibitor dans de l'EDTA 50mM). Après avoir ajouté 10µl de fluorure de phenylmethylsulfonyl (PMSF) (100mM dans l'éthanol) dans

chaque tube, ces derniers sont centrifugés pendant 30mn à 5000tr/mn. Le surnageant est récupéré, et 50µl/ml de sérum albumine bovine (BSA, 70mg/ml) y sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite aliquotés en fractions de 200µl et conservés à -20°C.

9 - Tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Les tests sont réalisés sur des plaques de microtitration de 96 puits recouvertes avec 100µl/puits de peptide 190-211 (10µg/ml) dans du tampon carbonate/bicarbonate (0,05M/pH 9,6) et mises pendant une nuit à 4°C, puis lavées 3 fois avec du tampon phosphate (PBS) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1M pH 7,2, NaCl, 0,14M). La saturation se fait ensuite avec 200µl/puits d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) à 2% dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Les dilutions des sérums ou des liquides intestinaux se font en série dans la solution PBS-BSA 2% avec un volume final de 100µl/puits. L'incubation dure 2 heures à 37°C. Les puits ne contenant ni sérums, ni liquides servent de contrôle négatif. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois avec du PBS contenant du tween20 à 1%. Le conjugué (anti-IgA de souris marquées à la peroxydase), dilué au 1/2000 est incubé pendant 2 heures à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois au tampon PBS-Tween20 1%. La fixation du conjugué est révélée par addition de 200µl/puits d'orthophénylène diamine (1 pastille dans 25ml de tampon citrate 0,1M pH 4,2 contenant 20µl d'eau oxygénée ajoutés extemporanément). La révélation a lieu pendant 30mn dans le noir à température ambiante, puis la coloration est arrêtée en ajoutant 50µl de H_2SO_4 (4N). La densité optique est lue à 492nm avec un lecteur de plaques MR600 (Dynatech).

C - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

I - STRATÉGIE ET CONCEPTION DES PEPTIDES

1 - Stratégie

Les vaccins administrés par voie orale doivent remplir toutes les conditions des vaccins injectables mais doivent en plus, résister à l'acidité gastrique, à l'environnement intestinal qui contient des enzymes digestives, et au mucus dont le rôle est d'agglutiner les particules. Les résultats obtenus jusque maintenant ont été dans l'ensemble décevants. Que les antigènes soient administrés par voie systémique ou orale, il s'est avéré difficile de stimuler une importante réponse immune muqueuse de type IgA. Les antigènes présents dans les vaccins sont des particules ou des protéines qui ne sont pratiquement pas libérées dans les sites de l'immunité spécifique.

Dans la majorité des cas, les peptides utilisés comme immunogènes par voie orale sont couplés à une molécule porteuse. Cependant les risques de réactions croisées entre les anticorps dirigés contre le porteur et les protéines de l'hôte ne sont pas négligeables. Les travaux de Mitchison (Mitchison et coll., 1971) ont montré que le rôle du porteur est de stimuler les lymphocytes T qui aident à la réponse anticorps par les cellules B. Une stimulation des lymphocytes T par un peptide permettrait d'éviter l'emploi d'un porteur. Pancré V. et coll., (1994) ont montré que le peptide 190-211 couplé à son extrémité amino-terminale à un acide α -amino-hexadécanoïque, permet une réponse cellulaire protectrice chez les souris Balb/c lorsqu'elles sont immunisées par voie intrapéritonéale en présence d'hydroxyde d'aluminium (ALUN). Nous avons dans un premier temps, testé le rôle protecteur du peptide 190-211 et des ses analogues acylés par un acide palmitique en position

amino ou carboxy-terminale (figure 61 a, b, c) injectés par voie intrapéritonéale en présence d'hydroxyde d'aluminium ou par voie sous-cutanée en présence d'adjuvant de Freund incomplet. Nous avons utilisé l'ALUN pour nous caler sur les premiers résultats obtenus, mais cet adjuvant inhibe l'immunogénicité des lipopeptides. En revanche les adjuvants huileux (adjuvant de Freund) permettent d'augmenter leur immunogénicité au niveau de la réponse cellulaire comme au niveau de la réponse humorale.

Une autre méthode pour présenter les peptides de synthèse au système immunitaire muqueux est de les protéger de la biodégradation. La technique la plus utilisée est la micro-encapsulation. La taille des particules semble être un élément important à considérer. Eldrige, J.H. et coll. (1990), ont clairement mis en évidence que seules les particules dont le diamètre est compris entre 5 et 10 μ m restent localisées dans les plaques de Peyer. Les cellules M captent spécifiquement les particules de taille inférieure à 10 μ m. Les particules dont le diamètre est inférieur à 5 μ m quittent rapidement les plaques de Peyer par un passage lymphatique prioritaire. Nous avons entrepris d'utiliser comme immunogène le peptide 190-211 couplé par son extrémité carboxy-terminale sur un polymère inerte. Ce polymère est la résine sur laquelle est réalisée la synthèse peptidique en phase solide : il s'agit d'un copolymère de styrène-1% divinylbenzène. La taille des particules est comprise entre 200 et 400 Mesh, soit 40 à 80 μ m. Nous avons choisi une résine fonctionnalisée par des groupements aminométhyles, pour former avec le peptide une liaison résistante à l'acidolyse, et plus particulièrement au traitement par l'acide fluorhydrique. Un bras espaceur constitué de 7 acides aminés (G₂R₅) est inséré entre le peptide et la résine pour éviter une trop grande rigidité de la structure, permettant ainsi au peptide de se retrouver dans la conformation qu'il adopte quand il est libre (figure 61 d, e). Les peptides couplés à la résine aminométhyle sont utilisés comme immunogènes dans les immunisations

par voie orale pour stimuler une immunité locale. Ils doivent donc au préalable être broyés pour que leur diamètre soit compris entre 5 et 10 μm .

- (a) Ac-ENLLSSPRLAKYLSNRPATPF-CONH₂
- (b) Ac-ENLLSSPRLAKYLSNRPATPFK-Palm
- (c) Palm-KENLLSSPRLAKYLSNRPATPF-CONH₂
- (d) Ac-ENLLSSPRLAKYLSNRPATPF-GGRRRRR-CONH-Résine
- (e) Palm-KENLLSSPRLAKYLSNRPATPF-GGRRRRR-CONH-Résine

Figure 61 : Séquences des peptides 190-211 (a), lipopeptide 190-211 modifié en Ct (b), lipopeptide 190-211 modifié en Nt (c), peptidyl-résine (d) et lipopeptidyl-résine (e).

2 - Synthèse peptidique

Nous avons vu en détail dans le premier chapitre les stratégies de synthèse, déprotection, purification et caractérisation des peptides et lipopeptides 190-211.

La synthèse peptidique en phase solide (Merrifield, 1963) est réalisée par un synthétiseur Applied Biosystem de type 430A, selon la stratégie Boc/TFA, en double couplage, avec une activation par la DCC et l'HOBt (König et Geiger, 1970). La résine utilisée pour la synthèse des peptides libres est une para-méthylbenzhydrylamine (charge = 0,77meq/g) qui libère après traitement par l'acide fluorhydrique le peptide sous forme carboxamide. La synthèse des peptides couplés au polymère inerte se déroule sur une résine aminométhyle (charge = 0,77meq/g) qui forme avec le peptide une liaison amide qui résiste au traitement par l'acide fluorhydrique.

Les chaînes latérales sont protégées par les groupements classiques : Arg (Tos), Glu (OChx), Lys (2-ClZ), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Tyr (BrZ), excepté la

dernière lysine du peptide 190-211 modifié par un acide palmitique à son extrémité amino-terminale, qui est protégée par un groupement Fmoc. Le couplage de l'acide palmitique sur la fonction ϵNH_2 de la $\alpha\text{N}(\text{Acétyl})\text{-}\epsilon\text{N}(\text{Fmoc})\text{-lysine}$ est réalisé après β -élimination à la pipéridine du groupement Fmoc, par couplage au BOP et à l'HOBt (Castro et coll., 1975), avant traitement à l'acide fluorhydrique. Le clivage du peptide de la résine (pour les peptides libres) et la déprotection des chaînes latérales sont réalisés par action de l'acide fluorhydrique selon la méthode du 'high' HF.

Les peptides libres sont purifiés par CLHP en phase inverse préparative, puis caractérisés par CLHP en phase inverse analytique, spectrométrie de masse et analyse d'acide aminés. La purification des peptidyl-résines est impossible, et la seule caractérisation envisageable est l'analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale. Cette analyse nous a permis de quantifier la teneur en peptide des peptidyl-résines.

II - RESULTATS

Nous ne parlerons pas dans ce chapitre des résultats obtenus avec le peptide 190-211 et le peptide 190-211 palmitoylé à son extrémité carboxy-terminale qui ont été détaillés dans le premier chapitre.

1 - Résultats obtenus avec le lipopeptide 190-211 modifié sur son extrémité amino-terminale

a - CLHP en phase inverse préparative

Le lipopeptide 190-211 a été purifié par chromatographie liquide haute pression préparative, le chromatogramme obtenu est représenté figure 62. Le peptide 190-211 modifié par une ϵN -palmitoyl-lysine à son extrémité NH_2 est élué entre 76 et 80% de solvant B.

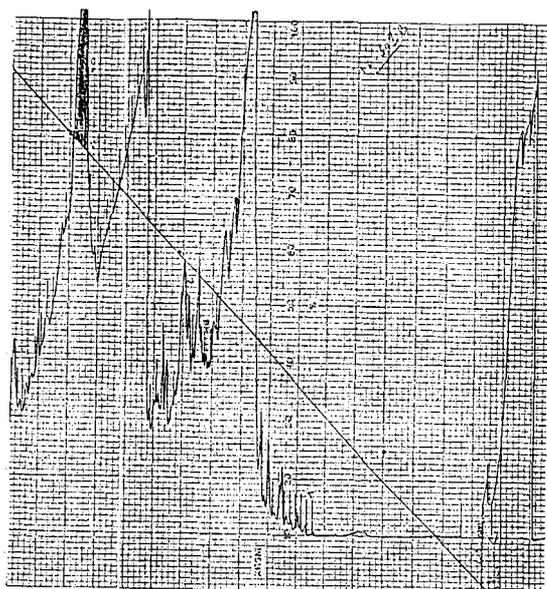


Figure 62 : Profil du chromatogramme obtenu par CHLP en phase inverse préparative du lipopeptide 190-211. (colonne : C4, débit : 1,5ml/mn, solvant A : eau/TFA 0,05%, solvant B : eau/acétonitrile/TFA 0,05% (20/80, v/v), λ : 235nm, gradient : 0 à 100% de solvant B en 100mn).

b - CLHP en phase inverse analytique

L'homogénéité et la pureté du lipopeptide ont été vérifiées par chromatographie liquide haute pression en phase inverse analytique. Le chromatogramme obtenu est représenté figure 63. Le peptide 190-211 modifié par une ϵ N-palmitoyl-lysine à son extrémité NH_2 est élué au bout 22,99 minutes.

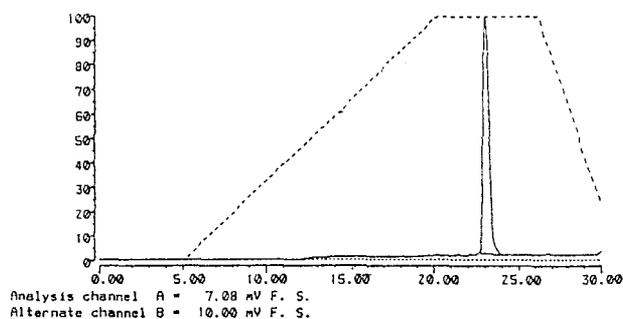


Figure 63 : Profil du chromatogramme obtenu par CHLP en phase inverse analytique du lipopeptide 190-211. (colonne : C4, débit : 0,7ml/mn, solvant A : eau/TFA 0,05%, solvant B : eau/acétonitrile/TFA 0,05% (20/80, v/v), λ : 215nm).

c - Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse nous permet de vérifier que le peptide obtenu correspond à celui que nous attendions. Le spectre de masse du lipopeptide 190-211 est représenté figure 64. La masse obtenue est $M/Z = 2812,2$ pour une masse attendue de 2812,36.

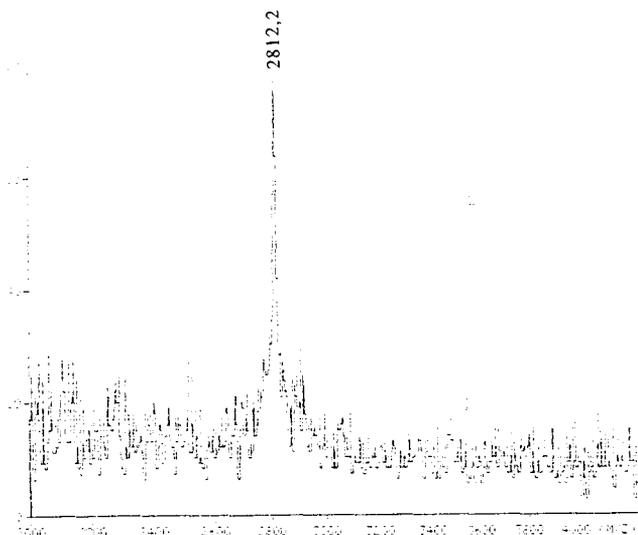


Figure 64 : Spectre de masse du lipopeptide 190-211.

d - Analyse d'acides aminés

L'analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale, nous a permis de vérifier la composition en acides aminés du lipopeptide 190-211. Les résultats sont illustrés dans le tableau 14.

A.A	nmol.	calc.	théo	taux
Asp	1,73	2,04	2	1,02
Thr	0,77	0,91	1	0,91
Tyr	0,79	0,93	1	0,93
Ser	2,27	2,67	3	0,89
Glu	0,86	1,01	1	1,01
Ala	2,63	3,07	3	1,02
Phe	0,87	1,01	1	1,01
Leu	3,33	3,92	4	0,98
Lys	1,74	2,05	2	1,02
Arg	1,75	2,06	2	1,03
Pro	2,58	3,04	3	1,01
Palm	0,84	0,99	1	0,99

Tableau 14 : Analyse d'acides aminés du lipopeptide 190-211. Ce tableau récapitule le nombre de nanomoles calculées (calc.) et théoriques (théo.) pour chaque acide aminé (A.A.). Le taux correspond au rapport calc./théo. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

2 - Résultats obtenus avec les peptidyl-résines

La seule caractérisation possible des mélanges de peptides obtenus par synthèse combinatoire est l'analyse d'acide aminé après hydrolyse acide totale. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 15.

(Peptidyl-résine)					(Lipopeptidyl-résine)				
A.A	nmol	calc	théo	taux	A.A	nmol	calc	théo	taux
Asp	1,75	1,98	2	0,99	Asp	2,57	2,08	2	1,04
Thr	0,82	0,93	1	0,93	Thr	1,12	0,91	1	0,91
Glu	0,92	1,04	1	1,04	Glu	1,26	1,02	1	1,02
Ser	2,29	2,61	3	0,87	Ser	3,15	2,55	3	0,85
Ala	2,64	2,99	3	1,00	Ala	3,92	3,18	3	1,06
Gly	1,79	2,02	2	1,01	Gly	2,54	2,06	2	1,03
Leu	3,47	3,92	4	0,98	Leu	4,84	3,92	4	0,98
Tyr	0,83	0,94	1	0,94	Tyr	1,19	0,96	1	0,96
Phe	0,89	1,01	1	1,01	Phe	1,27	1,03	1	1,03
Lys	0,87	0,99	1	0,99	Lys	2,49	2,02	2	1,01
Arg	6,18	6,99	7	1,00	Arg	8,81	7,14	7	1,02
Pro	2,49	3,04	3	1,01	Pro	3,78	3,06	3	1,02
					Palm	1,23	1	1	1

Tableau 15 : Analyse d'acides aminés de la peptidyl-résine (à gauche) et de la lipopeptidyl-résine (à droite). Ce tableau récapitule le nombre de nanomoles calculées (calc.) et théoriques (théo.) pour chaque acide aminé (A.A.). Le taux correspond au rapport calc./théo. En théorie, ce rapport doit être égal à 1.

Ces résultats nous indiquent le bon déroulement des synthèses.

D - RESULTATS DES ETUDES IMMUNOLOGIQUES

Les objectifs de ce travail ont été :

- de vérifier que l'utilisation du peptide 190-211 sous forme lipidique comme immunogène permet une protection des souris (Balb/c) lors d'infestations par *Schistosoma mansoni*.

- de tenter de réaliser une immunisation par voie orale chez les souris à l'aide des différents analogues du peptide 190-211 (figure 61) pour induire une immunité au niveau des muqueuses.

I - TESTS DE PROTECTION

Afin de vérifier que le peptide 190-211 sous forme lipidique utilisé comme immunogène permet une protection lors d'infestation, nous avons immunisé par 3 injections intrapéritonéales 3 lots de 5 souris (balb/c) avec le peptide 190-211, ou les lipopeptides 190-211 modifiés à l'extrémité amino ou carboxy-terminale du peptide. La même expérimentation a été réalisée en immunisant les souris par 4 injections sous-cutanées. Les animaux sont infestés par *Schistosoma mansoni* 24 heures après la dernière immunisation. Des souris infestées qui n'ont pas été immunisées nous servent de contrôle.

1 - Résultats obtenus par immunisation intrapéritonéale

L'utilisation de l'hydroxyde d'aluminium a provoqué des abcès aux niveaux splénique et hépatique. Aucune conclusion n'a pu être dégagée de cette expérimentation.

2 - Résultats obtenus par immunisation sous-cutanée

Les souris témoins sont mortes 60 à 90 jours après l'infestation, les souris immunisées par le peptide 190-211 entre 75 et 90 jours. Quatre souris sur les cinq sensibilisées par le lipopeptide (forme carboxy-terminale) sont mortes entre 90 et 120 jours. La dernière est toujours vivante 150 jours après l'infestation. Deux souris sur les cinq immunisées par le peptide 190-211 acylé par un acide palmitique sur sa fonction amino-terminale, sont mortes 120 jours après l'infestation, les 3 autres sont encore en vie au bout de 150 jours.

Nous avons récupéré les foies et les rates de ces souris. Nous voyons à l'œil nu que ces organes sont hypertrophiés quand les souris n'ont pas été immunisées par une des formes lipidiques du peptide 190-211. Nous pouvons aussi constater la présence de granulomes beaucoup plus nombreux. Ces résultats nous amènent à conclure que les lipopeptides induisent une protection contre l'infestation par *Schistosoma mansoni*.

II - GAVAGES PAR INTUBATION : DOSE 1

Le peptide 190-211 et ses différents analogues ont été utilisés comme immunogènes par voie orale pour induire une immunité locale. Les doses administrées sont de 100 μ g pour les peptides libres et de 1mg pour les peptidyl-résines, correspondant à environ 100 μ g de peptide libre. Les animaux ont été immunisés selon la méthode de Lange, S. et Holmgren, J. (1978), et les liquides intestinaux récupérés selon le protocole décrit par Elson et coll. (1984).

1 - Résultats obtenus avec le peptide 190-211 libre

Les liquides intestinaux des souris immunisées avec 100 μ g de peptide 190-211 ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA. Les résultats obtenus sont représentés figure 62.

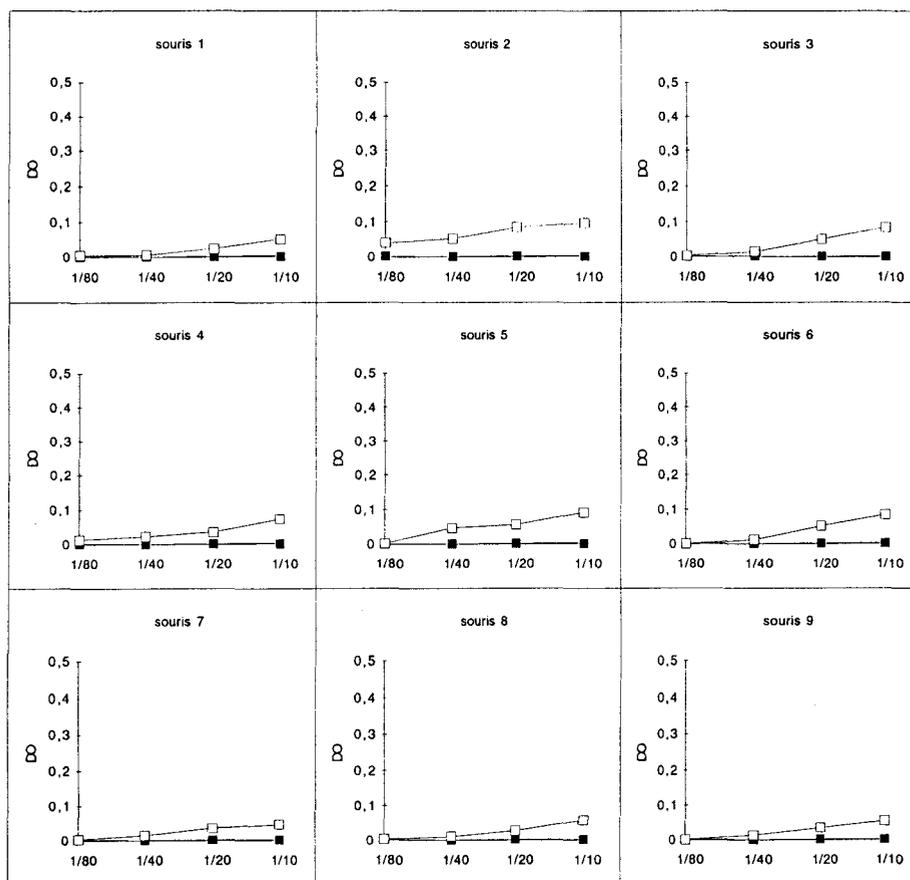


Figure 62 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par intubation avec 100 μ g de peptide 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

Ces résultats nous indiquent que l'immunisation par voie orale avec 100µg de peptide 190-211 n'induit pas de production d'anticorps d'isotype IgA au niveau des muqueuses.

2 - Résultats obtenus avec le lipopeptide libre

Les liquides intestinaux des souris immunisées avec 100µg de lipopeptide 190-211 ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211. Les résultats obtenus sont illustrés figure 63.

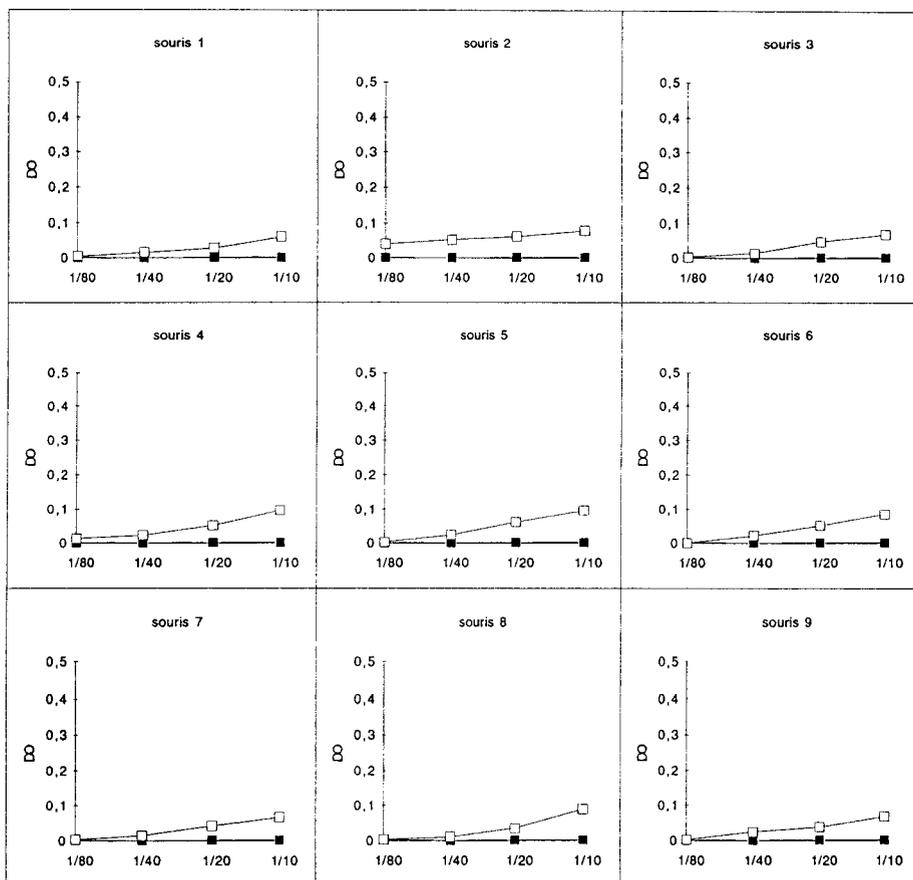


Figure 63 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par intubation avec 100µg de lipopeptide 190-211 modifié à son extrémité amino-terminale (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

Les résultats sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus lors de l'immunisation par voie orale avec le peptide 190-211. L'administration de 100µg de lipopeptide 190-211 n'induit pas de production significative d'anticorps d'isotype IgA anti-190-211.

3 - Résultats obtenus avec la peptidyl-résine

Les liquides intestinaux des souris immunisées avec 1mg de peptidyl-résine 190-211 (soit environ 100µg de peptide) ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211. Les résultats obtenus sont représentés figure 64.

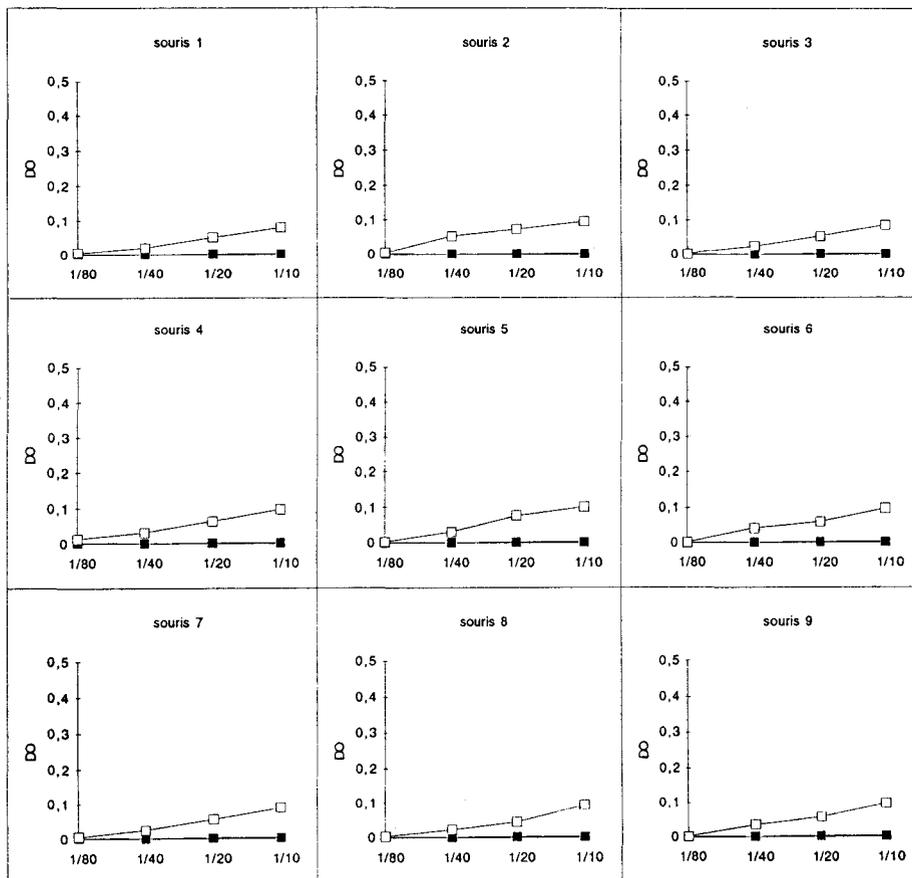


Figure 64 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par intubation avec 1mg de peptidyl-résine 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

L'utilisation de la peptidyl-résine, administrée par dose de 1mg, en tant qu'immunogène n'améliore pas l'intensité de la réponse obtenue. Aucune production d'anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211 n'est détectée.

4 - Résultats obtenus avec la lipopeptidyl-résine

Les liquides intestinaux des souris immunisées avec 1mg de lipopeptidyl-résine 190-211 (soit environ 100µg de peptide) ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211. Les résultats obtenus sont représentés figure 65.

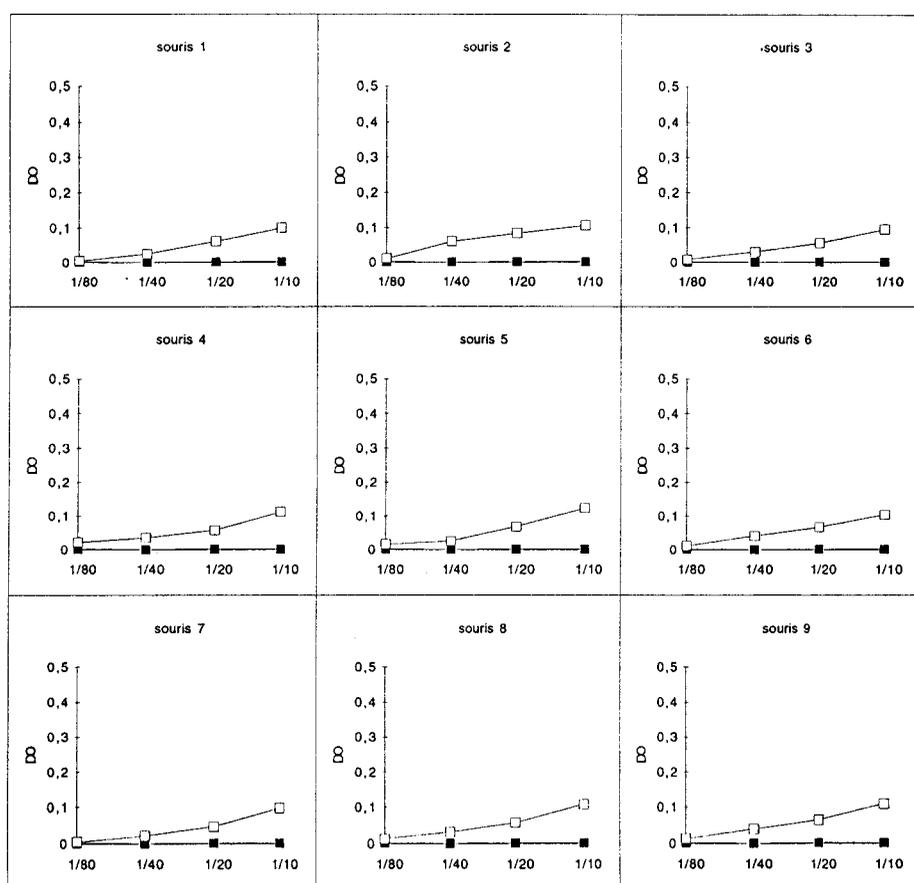


Figure 65 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par intubation avec 1mg de lipopeptidyl-résine 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

L'immunisation des souris avec 1mg de lipopeptidyl-résine n'améliore pas de façon significative la réponse humorale obtenue vis à vis du peptide 190-211.

5 - Récapitulatif des résultats obtenus avec la dose 1

Les résultats obtenus avec le peptide 190-211 et ses différents analogues utilisés en tant qu'immunogènes dans des immunisations par voie orale ont été rassemblés figure 66.

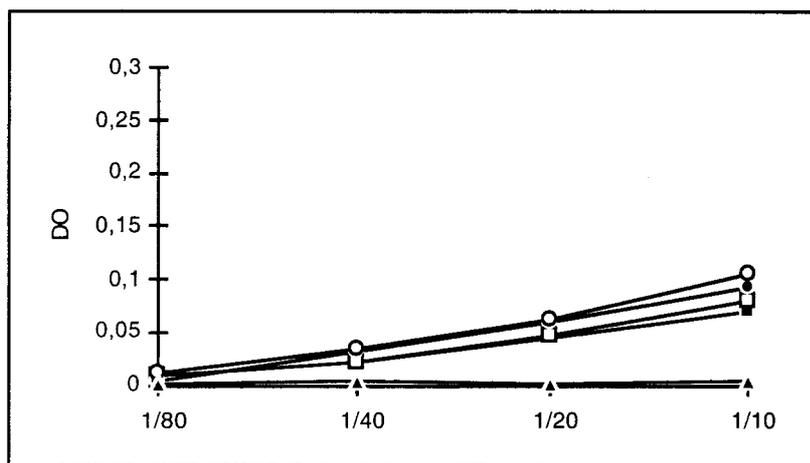


Figure 66 : Comparaison des résultats obtenus avec des tests ELISA lors de la recherche d'anticorps d'isotype IgA dans les liquides intestinaux de souris immunisées par voie orale avec 100µg de peptide 190-211 (carrés noirs), 100µg de lipopeptide 190-211 (carrés blancs), 1mg de peptidyl-résine 190-211 (ronds noirs) ou 1mg de lipopeptidyl-résine 190-211 (ronds blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (triangles noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

Ces résultats nous indiquent que la présence d'anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211 dans les liquides intestinaux de souris immunisées par voie orale avec le peptide 190-211 ou un de ses analogues, administrés à une dose d'environ 100µg, n'est pas significative.

II - GAVAGES PAR INTUBATION : DOSE 2

Nous avons recommencé la même expérimentation que précédemment, en doublant les doses administrées. Les souris ont été immunisées avec 200 μ g pour les peptides libres et 2mg pour les peptidyl-résines, correspondant à environ 200 μ g de peptide libre. Les animaux ont été immunisés selon la méthode de Lange, S. et Holmgren, J. (1978), et les liquides intestinaux récupérés selon le protocole de Elson et coll. (1984).

1 - Résultats obtenus avec le peptide 190-211 libre

Les liquides intestinaux de souris immunisées avec 200 μ g de peptide 190-211 ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211. Les résultats obtenus sont représentés figure 67.

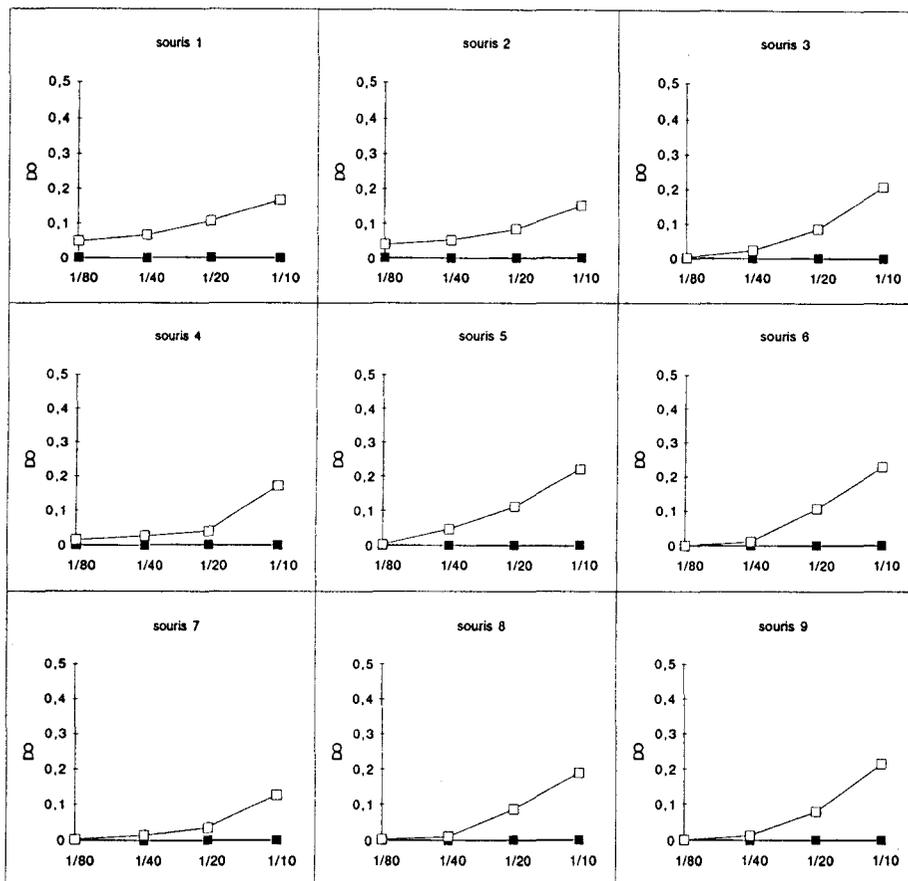


Figure 67 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par intubation avec 200 μ g de peptide 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

Ces résultats nous indiquent que l'immunisation par voie orale avec 200µg de peptide 190-211 n'induit pas de production d'anticorps d'isotype IgA au niveau des muqueuses.

2 - Résultats obtenus avec le lipopeptide libre

Les liquides intestinaux des souris immunisées avec 200µg de lipopeptide 190-211 ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211. Les résultats sont illustrés figure 68.

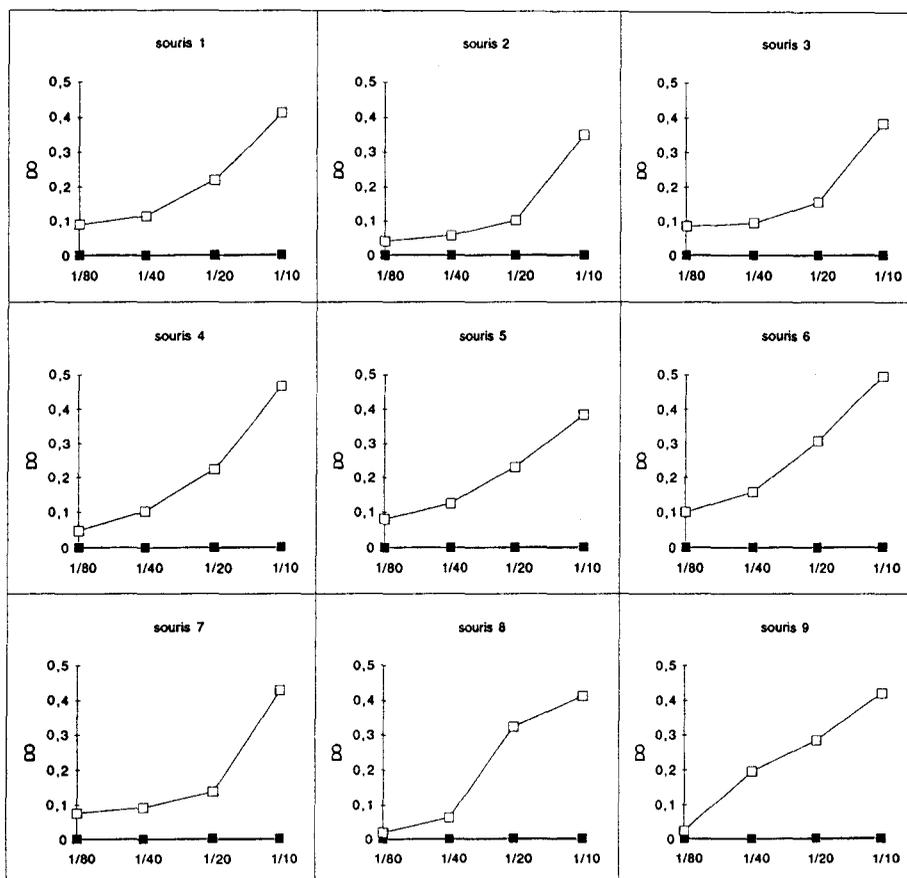


Figure 68 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par intubation avec 200µg de lipopeptide 190-211 acylé sur sa fonction amino-terminale (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

Ces résultats nous indiquent que l'immunisation par voie orale avec 200µg de lipopeptide 190-211 induit une faible production d'anticorps d'isotype IgA au niveau des muqueuses.

3 - Résultats obtenus avec la peptidyl-résine

Les liquides intestinaux des souris immunisées avec 2mg de peptidyl-résine 190-211 (soit environ 200µg de peptide) ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211. Les résultats obtenus sont représentés figure 69.

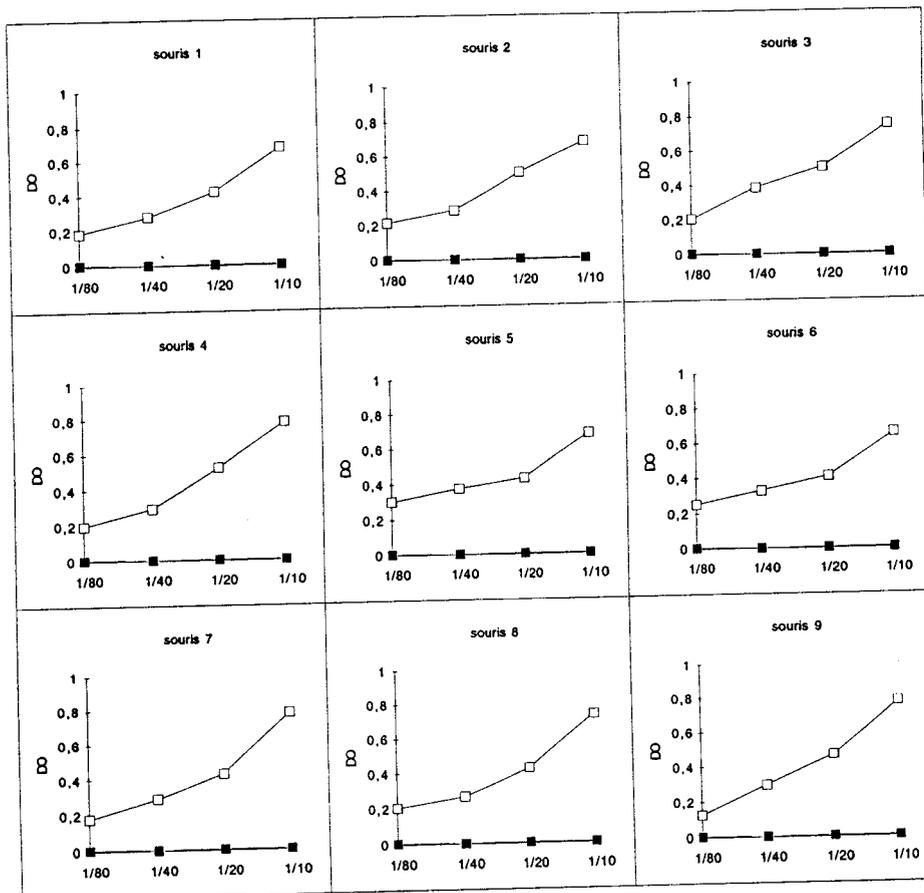


Figure 69 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par intubation avec 2mg de peptidyl-résine 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

L'utilisation de la peptidyl-résine, en tant qu'immunogène, administrée à une dose de 2mg, améliore l'intensité de la réponse obtenue. Une production d'anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211 est détectée de façon significative.

4 - Résultats obtenus avec la lipopeptidyl-résine

Les liquides intestinaux des souris immunisées avec 2mg de lipopeptidyl-résine 190-211 (soit environ 200µg de peptide) ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211. Les résultats obtenus sont représentés figure 70.

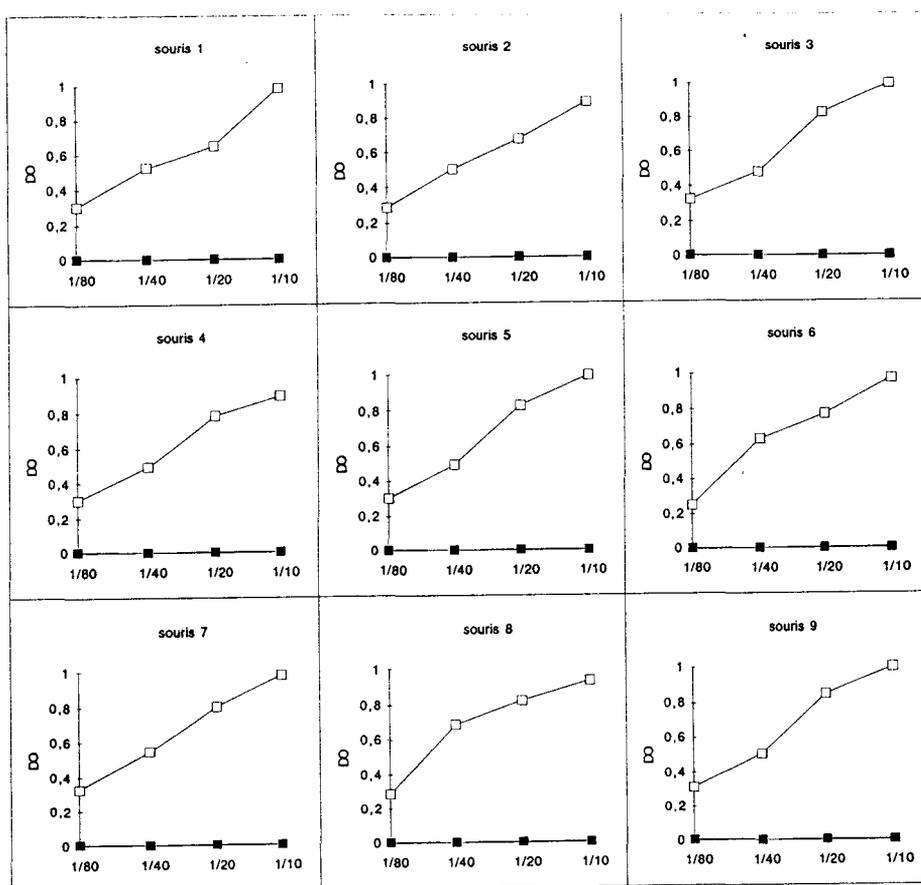


Figure 70 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par intubation avec 2mg de lipopeptidyl-résine 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

Ces résultats nous indiquent la présence d'anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211 dans les liquides intestinaux de souris immunisées par voie orale avec 2mg de lipopeptidyl-résine 190-211.

5 - Récapitulatif des résultats obtenus avec la dose 2

Les résultats obtenus avec le peptide 190-211 et ses différents analogues utilisés en tant qu'immunogènes dans des immunisations par voie orale ont été rassemblés figure 71.

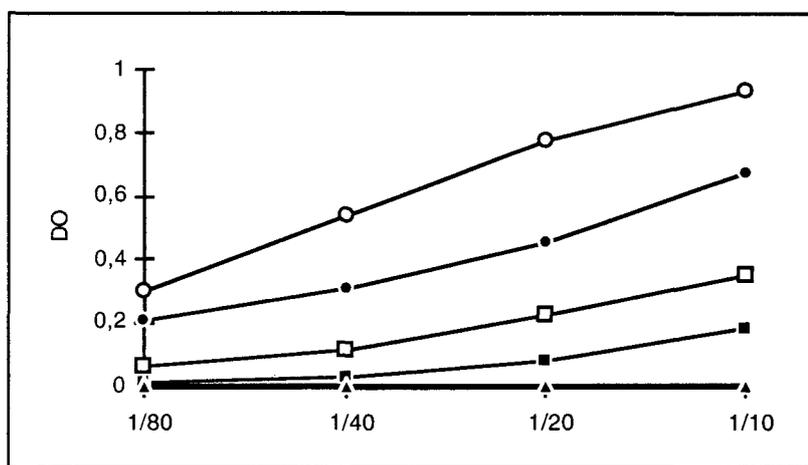


Figure 71 : Comparaison des résultats obtenus avec des tests ELISA lors de la recherche d'anticorps d'isotype IgA dans les liquides intestinaux de souris immunisées par voie orale avec 200µg de peptide 190-211 (carrés noirs), 200µg de lipopeptide 190-211 (carrés blancs), 2mg de peptidyl-résine 190-211 (ronds noirs) ou 2mg de lipopeptidyl-résine 190-211 (ronds blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (triangles noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

L'immunisation par voie orale avec 2mg de peptidyl-résine ou de lipopeptidyl-résine 190-211, entraîne une production d'anticorps d'isotype IgA au niveau des muqueuses. L'intensité de la réponse humorale vis à vis du peptide 190-211 est nettement augmentée lorsque les souris sont sensibilisées avec le peptide 190-211 ancré à un polymère inerte à son extrémité carboxylique et acylé avec un acide palmitique à son extrémité amino-terminale. Ce peptide synthétique modifié, induit une immunité locale lorsqu'il est administré par voie orale.

III - GAVAGES DANS DU LAIT

La peptidyl-résine et la lipopeptidyl-résine 190-211 ont été utilisées comme immunogènes par voie orale pour induire une immunité locale. Les doses administrées sont de 2 (dose 1) ou 5 mg (dose 2) et sont mélangées à du lait concentré dans des boîtes de Pétri. Les souris sont isolées dans des cages individuelles avec une boîte de Pétri contenant l'immunogène.

1 - Résultats obtenus avec la peptidyl-résine 190-211

Les liquides intestinaux des souris immunisées avec la peptidyl-résine 190-211 ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211. Les résultats obtenus avec des doses de 2 mg ou 5mg sont représentés respectivement figures 72 et 73.

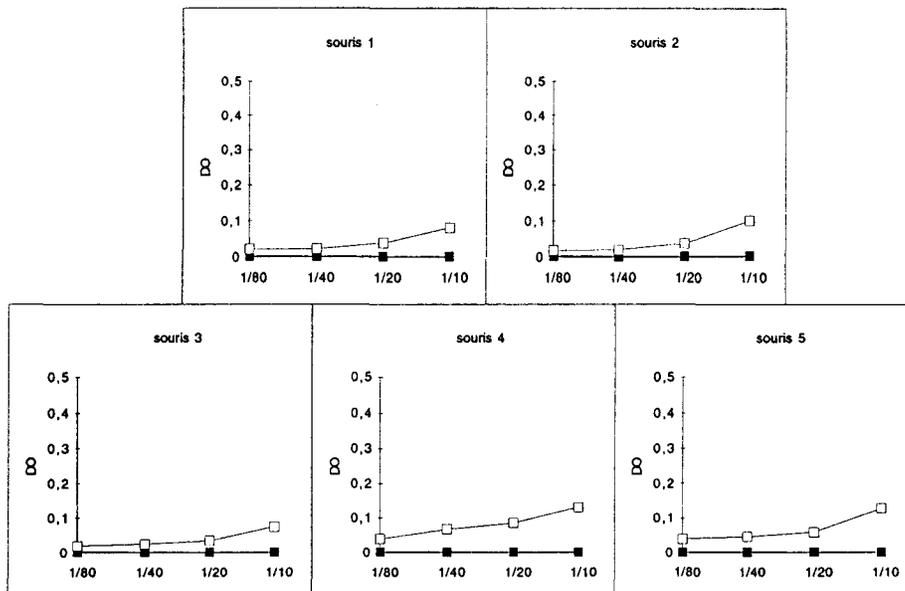


Figure 72 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par ingestion dans du lait avec 2mg de peptidyl-résine 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

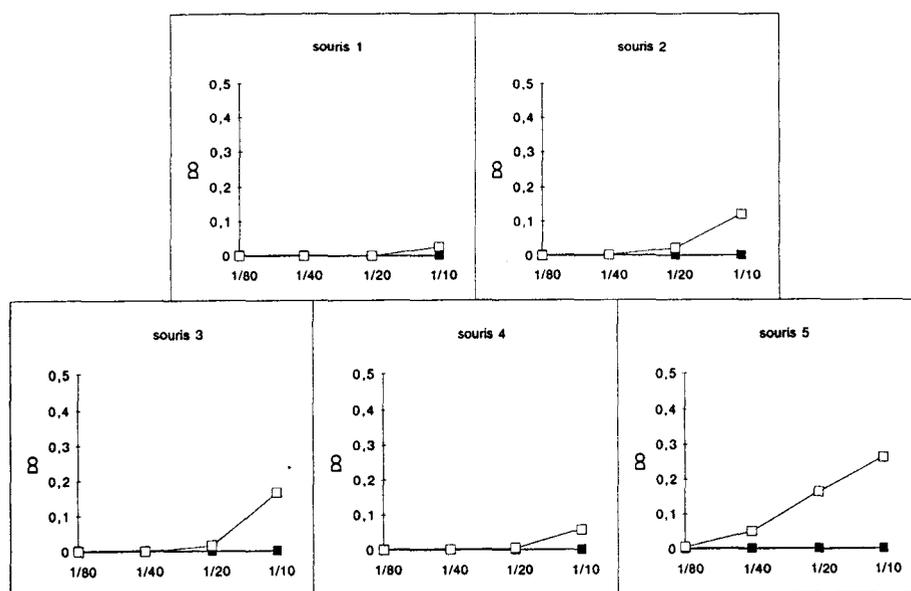


Figure 73 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par ingestion dans du lait avec 5mg de peptidyl-résine 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

Les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants, que ce soit avec des doses de 2 ou 5mg. Il n'y a pas de production d'anticorps dirigés contre le peptide 190-211. Les résultats obtenus ne sont pas reproductibles et dépendent de la quantité de lait que les souris ont ingérée.

2 - Résultats obtenus avec la lipopeptidyl-résine

Les liquides intestinaux des souris immunisées avec la lipopeptidyl-résine 190-211 ont été testés par ELISA pour rechercher des anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211. Les résultats obtenus avec des doses de 2 ou 5mg sont représentés respectivement figures 74 et 75.

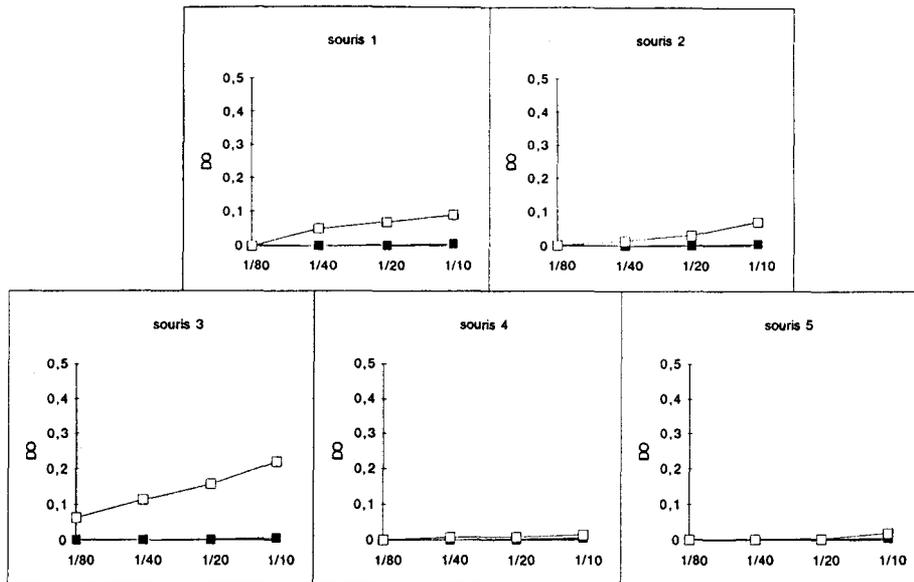


Figure 74 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par ingestion dans du lait avec 2mg de lipopeptidyl-résine 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

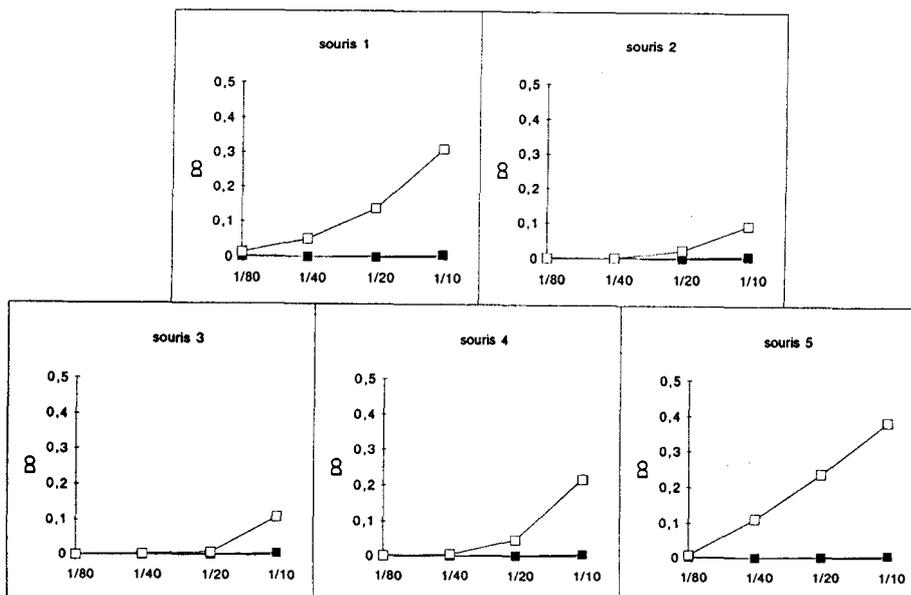


Figure 75 : Résultats des tests ELISA (recherche d'IgA) obtenus avec les liquides intestinaux de souris immunisées par ingestion dans du lait avec 5mg de lipopeptidyl-résine 190-211 (carrés blancs). Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211. Le témoin (carrés noirs) correspond à des puits sans liquides intestinaux.

Les résultats obtenus ne sont pas reproductibles d'une souris à l'autre et sont fortement tributaires de la quantité de lait, et donc de peptide, que les souris ont ingérée. Que la dose de peptide soit de 2 ou 5mg, aucune conclusion ne peut être dégagée. L'immunisation orale de souris par ingestion de lait est une méthode aléatoire qui ne s'avère pas satisfaisante.

E - DISCUSSION

Pour induire une protection au niveau des muqueuses lors d'une immunisation orale chez l'animal à l'aide de peptides synthétiques, il faut que le peptide choisi comme immunogène soit capable de déclencher une réponse immunitaire satisfaisante. Les différentes études réalisées avec le peptide 190-211 ont montré que celui-ci induisait à la fois une réponse cellulaire et humorale (Pancré, V. et coll., 1994 - Xu, C.B. et coll., 1993 - Grzych, J.M. et coll., 1993). C'est donc ce peptide que nous avons choisi comme modèle pour stimuler une immunité locale.

Dans un premier temps, nous avons tenté de vérifier que l'utilisation du peptide 190-211 sous forme lipidique comme immunogène permet une protection des souris lors d'infestations par *Schistosoma mansoni*. Nous avons immunisé par 3 injections intrapéritonéales 3 lots de 5 souris (balb/c) avec le peptide 190-211, ou les lipopeptides 190-211 modifiés à l'extrémité amino ou carboxy-terminale du peptide en présence d'hydroxyde d'alumine. L'utilisation de cet adjuvant a provoqué des abcès aux niveaux splénique et hépatique. Aucune conclusion n'a pu être dégagée de cette expérience. La même expérimentation a été réalisée en immunisant les souris par 4 injections sous-cutanées en présence d'adjuvant de Freund incomplet. Le

tableau ci-dessous indiquent le nombre de souris mortes en fonction des jours après l'infestation et de l'immunogène utilisé.

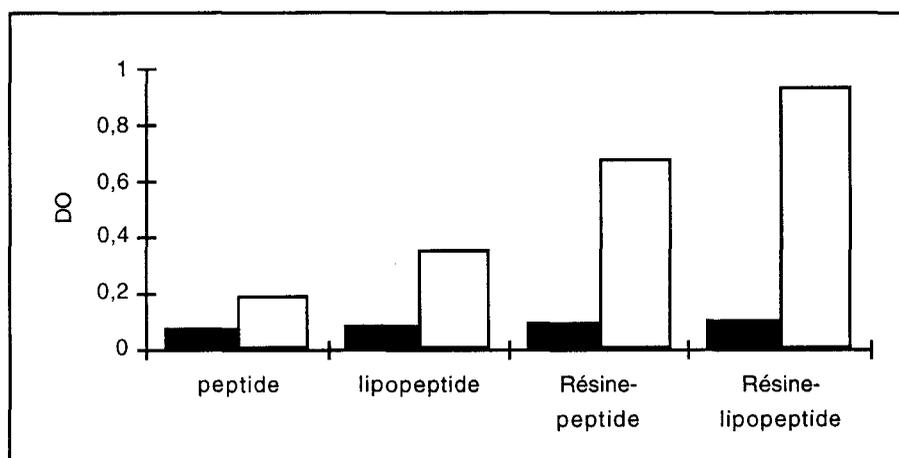
	Jours après l'infestation			
	60-75	75-90	90-120	120-150
Témoins	2/5	3/5		
Peptide 190-211		5/5		
Lipopetide 190-211 (Ct)		1/5	3/5	
Lipopetide 190-211 (Nt)				2/5

L'observation des foies et des rates de ces souris nous permet de constater que ces organes sont hypertrophiés quand les souris n'ont pas été immunisées par une des formes lipidiques du peptide 190-211, ainsi que la présence de granulomes beaucoup plus nombreux. Ces résultats nous amènent à conclure que les lipopeptides, et plus particulièrement le peptide modifié en position amino-terminale par une $\alpha\text{N}(\text{Acétyl})-\varepsilon\text{N}(\text{palmitoyl})$ -lysine, induisent une protection contre l'infestation par *Schistosoma mansoni*.

Nous avons ensuite essayé de réaliser une immunisation par voie orale chez les souris à l'aide des différents analogues du peptide 190-211 pour induire une immunité au niveau des muqueuses. Les vaccins administrés par voie orale doivent résister à l'acidité gastrique et à l'environnement intestinal qui contient des enzymes digestives. Pour tenter de protéger le peptide de la dégradation, nous avons couplé à son extrémité carboxy-terminale un polymère inerte (résine aminométhyle). Un bras espaceur constitué de 7 acides aminés (G₂R₅) est inséré entre le peptide et la résine pour permettre au peptide de se retrouver dans la conformation qu'il adopte quand il est libre. A l'extrémité amino-terminale, nous avons modifié le peptide avec une $\alpha\text{N}(\text{Acétyl})-\varepsilon\text{N}(\text{palmitoyl})$ -lysine pour augmenter son immunogénicité.

Eldrige, J.H. et coll. (1990), ont clairement mis en évidence que seules les particules dont le diamètre est compris entre 5 et 10 μ m restent localisées dans les plaques de Peyer. Nous avons broyé ces peptidyl-résines, pour que leur diamètre soit compris entre 5 et 10 μ m. La méthode d'immunisation par ingestion des peptides dans du lait, s'est avérée inefficace. La quantité administrée dépend de ce que chaque souris a ingéré. Chaque dose n'a été que rarement prise dans sa totalité. Les résultats sont aléatoires et ne peuvent être extrapolés.

Nous avons utilisé la méthode d'immunisation par voie orale décrite par Lange, S. et Holmgren, J. (1978). Les résultats que nous avons obtenus sont récapitulés dans la figure ci-dessous.



Comparaison des résultats obtenus avec des tests ELISA lors de la recherche d'anticorps d'isotype IgA dans les liquides intestinaux de souris immunisées par voie orale avec 100 μ g (barres noires) ou 200 μ g (barres blanches) de peptide. Les liquides intestinaux sont dilués du 1/10 au 1/80. L'antigène en phase solide utilisé est le peptide 190-211.

Ces résultats nous indiquent que la présence d'anticorps d'isotype IgA anti-peptide 190-211 dans les liquides intestinaux de souris immunisées par voie orale avec le peptide 190-211 ou un de ses analogues, administrés à une dose d'environ 100 μ g, n'est pas significative. En revanche, l'immunisation orale avec 2mg de peptidyl-résine ou de lipopeptidyl-résine 190-211, entraîne

une production d'anticorps anti-peptide 190-211 d'isotype IgA au niveau intestinal. La plus grande immunogénicité du peptide 190-211 au niveau des muqueuses est obtenu quand le peptide 190-211 est ancré à son extrémité carboxylique à un polymère inerte et acylé à son extrémité amino-terminale avec un acide palmitique. Ce peptide synthétique modifié, est capable d'induire une production d'IgA sécrétoires sans porteur ni adjuvant lorsqu'il est administré par voie orale. Il faut cependant noter qu'aucun anticorps sérique, que ce soit des IgG ou des IgA, anti-peptide 190-211, n'a été détecté dans les sérums de souris immunisées oralement.

F - CONCLUSION

Nous avons montré qu'une protection au niveau des muqueuses peut être obtenue par immunisation orale à l'aide de peptides synthétiques. Les formes peptidyl-résines administrées oralement sans porteur ni adjuvant, induisent dans l'intestin de souris la production d'IgA sécrétoires qui reconnaissent le peptide 190-211. Nous savons que le peptide 190-211 modifié avec une α N(Acétyle)- ϵ N(palmitoyl)-lysine à son extrémité amino-terminale permet une protection efficace et durable lors d'infestations par *Schistosoma mansoni*. Il serait intéressant d'immuniser les souris oralement avec la lipopeptidyl-résine 190-211 et de vérifier que ce peptide induit une protection contre la schistosomiase.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le but de notre travail était d'étudier différentes modifications d'un antigène peptidique unique, et leurs activités biologiques, soit en tant qu'outil d'aide au sérodiagnostic, soit comme modèle de vaccin synthétique. Nous avons choisi comme modèle un peptide de 22 résidus (190-211) correspondant à l'extrémité carboxy-terminale de l'antigène invariable Sm28GST issu du parasite *Schistosoma mansoni*.

Nous avons utilisé en tant qu'antigènes en phase solide dans des tests sérodiagnostics, des mélanges de peptides obtenus par synthèse combinatoire. Ces peptides dérivés de la séquence initiale d'un peptide sont obtenus en remplaçant un acide aminé unique par un mélange de 2 ou 3 acides aminés couplés simultanément. De tels mélanges contiennent en plus de la séquence initiale, une population de séquences étroitement proches les unes des autres capable de détecter plus efficacement des populations d'anticorps hétéroclites. A partir du peptide 115-131, nous avons synthétisé 2 mixotopes contenant $11 \cdot 10^5$ et $9 \cdot 10^7$ peptides, et à partir du peptide 190-211, 2 mixotopes contenant $13 \cdot 10^6$ et $9 \cdot 10^9$ peptides. Nous avons montré que ces mélanges combinatoires utilisés comme antigènes en phase solide dans les tests ELISA, sont reconnus par les anticorps de sérums d'animaux ou d'individus infestés par *Schistosoma mansoni*. Plus particulièrement le mixotope contenant $9 \cdot 10^9$ peptides dérivé du peptide 190-211 a permis de révéler la présence d'anticorps anti-Sm28GST dans des sérums d'individus infestés qui n'avaient pas été détectés avec le peptide d'origine ni avec le mélange de $13 \cdot 10^6$ peptides. Le mélange combinatoire de $9 \cdot 10^9$ peptides permet un recrutement plus large de la population d'anticorps dirigés contre la Sm28GST, grâce à des séquences dérivées

proches de la séquence initiale, sans augmentation du bruit de fond. Les tests de Western blot nous ont montré que la population d'anticorps recrutée est dirigée spécifiquement contre la protéine Sm28GST. L'utilisation de tels mélanges en tant qu'antigène permet d'augmenter la sensibilité des tests sérodiagnostics. Ce principe pourrait être appliqué à d'autres antigènes, qu'ils soient variables ou invariables.

Nous avons utilisé en tant qu'immunogènes des mélanges de peptides obtenus par synthèse combinatoire. Ces peptides dérivés de la séquence initiale d'un peptide sont obtenus en remplaçant chaque acide aminé susceptible d'être impliqué dans une liaison agrétopique par un mélange de 9 acides aminés couplés simultanément. Chaque synthèse aboutit à un mélange de $5,3 \cdot 10^5$ peptides qui ne diffèrent de la séquence initiale que sur 6 positions sur 17 pour le peptide 115-131 et 6 sur 22 pour le peptide 190-211. Notre objectif était de pouvoir augmenter la capacité d'individus faiblement répondeurs à la séquence initiale d'un peptide en permettant son association à un plus grand nombre de variants du CMH. Chaque individu immunisé par un tel mélange pourrait trouver le ou les peptides qui se lierait à son CMH, en étant capable d'induire une réponse spécifique de l'antigène initial. Nous avons montré que les cellules de souris CBA sensibilisées par un mélange combinatoire est restimulable par le peptide d'origine. L'utilisation comme immunogène en stratégie vaccinale du mélange 6 dérivé du peptide 190-211 permet d'amplifier la réponse lymphocytaire T vis à vis de la séquence initiale du peptide. Une étude statistique sur des souris non syngéniques pour confirmer ces résultats permettrait une extrapolation à la population humaine.

Dans la dernière partie de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'immunisation par voie orale. *Schistosoma mansoni* provoque une bilharziose intestinale, et pour une bonne protection il est souvent nécessaire de stimuler une immunité locale. Il nous est donc paru intéressant de réaliser une immunisation orale pour induire une protection au niveau des muqueuses. Nous avons choisi comme modèle le peptide 190-211 qui permet de déclencher une réponse immunitaire satisfaisante chez les souris Balb/c. Nous avons d'abord montré que ce peptide modifié à son extrémité amino-terminale par une $\alpha\text{N}(\text{Ac})\text{-}\epsilon\text{N}(\text{palm})\text{-lysine}$ induit une protection efficace et durable contre l'infestation par *Schistosoma mansoni*. Pour être présentés au système immunitaire, les peptides de synthèse doivent être protégés de la biodégradation. Nous avons entrepris d'utiliser comme immunogène le peptide 190-211 couplé par sa fonction carboxy-terminale sur un polymère inerte et à son extrémité amino-terminale par une $\alpha\text{N}(\text{Ac})\text{-}\epsilon\text{N}(\text{palm})\text{-lysine}$. Ce peptide modifié, administré par voie orale, est capable d'induire une production d'IgA sécrétoires sans porteur ni adjuvant. Cependant, aucun anticorps sérique anti-peptide 190-211 n'a été détecté dans les sérums de souris immunisées oralement. Il serait intéressant de vérifier que la vaccination orale de souris avec ce peptide modifié permet d'induire une protection contre la schistosomiase.

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

Abréviations utilisées pour les acides aminés

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		

Abréviations utilisées en synthèse peptidique :

tBOC	: tertio-butyloxycarbonyle
BOP	: Hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxytrisdiméthylaminophosphonium
BrZ ou ClZ	: 2-Bromo(ou chloro)-benzyloxycarbonyle
Bzl	: Benzyle
CLHP	: Chromatographie liquide haute pression
DCC	: Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	: Dichlorométhane
DCU	: Dicyclohexylurée
DIEA	: Diisopropyléthylamine
DMF	: Diméthylformamide
DNP	: 2,4-Dinitrophényle
DTT	: Dithiothréitol
Fmoc	: Fluorényl-9-méthoxycarbonyle
HAT	: Hydrolyse acide totale
HF	: Acide fluorhydrique
HOBt	: Hydroxybenzotriazole

MBHA	:	Méthylbenzhydramine
NMP	:	N-méthylpyrrolidone
OChx	:	Ester de cyclohexyle
PAM	:	Phénylacidométhyle
SDS	:	Sodium Dodécyl Sulfate
TFA	:	Acide trifluoroacétique
Tos	:	Tosyl (para-toluènesulfonyle)

Abréviations utilisées en immunologie :

ADCC	:	Mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps
β 2m	:	β 2-microglobuline
BSA	:	Bovine serum albumine
CFA	:	Adjuvant de Freund complet
CMH	:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	:	Cellule présentatrice de l'antigène
DO	:	Densité optique
EDTA	:	Acide éthylènediamine tétraacétique
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
HLA	:	Human leucocyte antigen
IFA	:	Adjuvant de Freund incomplet
Ig	:	Immunoglobuline
Ii	:	Chaîne invariante
LMP	:	Low molecular mass polypeptide
PBS	:	Phosphate Buffer Salin (Tampon phosphate)
PMSF	:	Fluorure de paraméthylsulfonyle
RE	:	Réticulum endoplasmique
Sm28GST	:	Schistosoma mansoni 28KDa Glutathion-S-Trasférase
SWAP	:	Soluble Worm Adult Protein (Antigènes solubles totaux de schistosomes adultes)
TAP	:	Transporter associated with antigen processing
TcR	:	Récepteur des cellules T

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alzari, P.M., Lascombe, M.B. and Poljak, R.J. 1988.** Three dimensional structure of antibodies. *Annual Review of Immunology*. Vol. 6, 555-580.
- Amit, A.G., Mariuzza, R.A., Phillips, S.E.V. and Poljak, R.J. 1986.** The three dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2,8Å resolution. *Science*. Vol. 233, 747-753.
- Anderson, M.S. and Miller, J. 1992.** Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89, 2282-2286.
- Androlewicz, M.J., Ortmann, B., Van Endert, P.M., Spies, T. and Cresswell, P. 1994.** Characteristics of peptide and major histocompatibility complex class I/β2-microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 91, 12716-12720.
- Arnon, R. 1986.** Synthetic peptides as the basis for future vaccines. *TIBS*. Vol. 11, 521-524.
- Atassi, M.Z. 1975.** Antigenic structure of myoglobin : the complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins. *Immunochemistry*. Vol. 12, 423-438.
- Atassi, Z. and Young, C.R. 1985.** Discovery and implications of the immunogenicity of free small synthetic peptides : powerful tools for manipulating the immune system and for production of antibodies and T cells of preselected submolecular specificities. *Critical Reviews in Immunology*. Vol. 5, Issue 4, 387-409.
- Audibert, F., Jolivet, M., Chedid, L., Alouf, J.E., Boquet, P., Rivaille, P. and Siffert, O. 1981.** Active antitoxic immunization by a diphtheria toxin synthetic oligopeptide. *Nature*, Vol. 289, 593-594.
- Auriault, C., Balloul, J.M., Pierce, R.J., Damonville, M., Sondermeijer, P. and Capron, A. 1987.** Helper T cells induced by a purified 28-kilodalton antigen of *Schistosoma mansoni* protect rats against infection. *Infection and Immunity*. Vol. 55, No. 5, 1163-1169.

Auriault, C., Gras-Masse, H., Wolowczuk, I., Pierce, R.J., Balloul, J-M., Neyrinck, J-L., Drobecq, H., Tartar, A. and Capron, A. 1988. Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *The Journal of Immunology*. Vol. 141. No. 5. 1687-1694.

Auriault, C., Gras-Masse, H., Pierce, R.J., Butterworth, A.E., Wolowczuk, I., Capron, M., Ouma, J.H., Balloul, J.M., Khalife, J., Neyrinck, J.L., Tartar, A., Koech, D. and Capron, A. 1990. Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 Glutathione-S-Transferase and to synthetic peptides. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.28. 1918-1924.

Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Boulanger, D., Capron, A. and Tartar, A. 1991. Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28 GST). *Peptide Research*. Vol. 4, No. 1, 6-11.

Balloul, J-M., Grzych, J-M., Pierce, R.J. and Capron, A. 1987^a. A purified 28.000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *The Journal of Immunology*. Vol. 138, No. 10, 3448-3453.

Balloul, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvallo, D., Lecocq, J.P. and Capron, A. 1987^b. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*, Vol. 326, 149-153.

Beachey, E.H., Seyer, J.M., Dale, J.B., Simpson, W.A. and Kang, A.H. 1981. Type-specific protective immunity evoked by synthetic peptide of *Streptococcus pyogenes* M protein. *Nature*, Vol. 292, 457-459.

Bénaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *The EMBO Journal*. Vol. 14, No. 1, 37-49.

Benjamin, E.D.C., Berzofsky, J.A., East, I.J., Gurd, F.R.N., Hannum, C., Leach, S.L., Margoliash, E., Michael, J.G., Miller, A., Prager, E.M., Reichlin, M., Sercarz, E.E., Smith-Gill, S.J., Todd, P.E. and Wilson, A.C. 1984. The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Annual Review of Immunology* Vol. 2, 67-101.

Bertolino, P., Forquet, F., Pont, S., Koch, N., Gerlier, D. and Rabourdin-Combe, C. 1991. Correlation between invariant chain expression level and capability to present antigen to MHC class II-restricted T cells. *International Immunology*. Vol. 3, No. 5, 435-443.

Berzofsky, J.A. 1985. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science*. Vol. 226, 932-940.

Bjorkman, P.J. and Parham, P. **1990**. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 59, 253-288.

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. **1987**. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, Vol. 329. 512-518.

Borges, E., Wiesmüller, K.H., Jung, G. and Walden, P. **1994**. Efficacy of synthetic vaccines in the induction of cytotoxic T lymphocytes. Comparison of the costimulating support provided by helper T cells and lipoamino acid. *Journal of Immunological Methods*. Vol. 173, 253-263.

Boulanger, D. **1991**. Schistosomiasis humaines africaines : Evaluation chez l'animal du pouvoir vaccinal d'une glutathion-S-tranférase exprimée par le schistosome. *Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé*. Université de Lille I. Mai 1991.

Boulanger, D., Reid, G.D.F., Sturrock, R.F., Wolowczuk, I., Balloul, J.M., Grezel, D., Pierce, R.J., Otieno, M.F., Guerret, S., Grimaud, J.A., Butterworth, A.E. and Capron, A. **1991**. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*. Vol. 13, 473-490.

Bouvier, M. and Wiley, D.C. **1994**. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*. Vol. 265, 398-402.

Braciale, T.J. **1992**. Antigen processing for presentation by MHC class I molecules. *Current opinion in immunology*. Vol.4, 59-62.

Brown, J.H., Jardetsky, S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. **1993**. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. Vol 364, 33-39.

Brown, J.H., Jardetzky, T., Saper, M.A., Samraoui, B., Bjorkman, P.J. and Wiley, D.C. **1988**. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature*. Vol. 332, 845-850.

Butterworth, A., Dunne, D., Fulford, A., Capron, M., Khalife, J., Capron, A., Koech, D., Ouma, J. and Sturrock, R. **1988**. Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. *Biochimie*, Vol. 70, 1053-1063.

Butterworth, A.E., Vadas, M.A., Martz, E. and Sher, A. **1979**. Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni*, but fail to induce damage. *The Journal of Immunology*. Vol. 122, No. 4, 1314-1321.

Buus, S., Sette, A., Colon, S.M., Miles, C. and Grey, H.M. 1987. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science*, Vol. 235, 1353-1358.

Campbell, R.D. and Trowsdale, J. 1993. Map of the human MHC. *Immunology Today*. Vol. 14, No. 7, 349-352.

Capron, A., Capron, M., Dessaint, J-P. 1980^b. ADCC as primary mechanism of defence against metazoan parasites. In "*Immunology 80. Progress in Immunology*", Vol. 44, Fougereau, M. and Dousset, J. Eds Academic press, New York, 782.

Capron, A., Dessaint, J-P., Capron, M., Joseph, M. and Pestel, J. 1980^a. Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 29, No. 5, 849-857.

Capron, M., Capron, A., Abdel-Hafez, S.K., Bazin, H., Joseph, M. and Phillips, S.M. 1983. Immunologic response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. Antibody-dependant mechanisms of resistance. *The Journal of Immunology*. Vol. 131, No. 3, 1475-1480.

Carreno, B.M., Winter, C.C., Taurog, J.D., Hansen, T.H. and Biddison, W.E. 1993. Residues in pockets B and F of HLA-B27 are critical in the presentation of an influenza A virus nucleoprotein peptide and influence the stability of peptide-MHC complexes. *International Immunology*. Vol. 5, No. 4, 353-360.

Castello-Branco, L.R.R., Griffin, G.E., Poulton, T.A., Dougan, G. and Lewis, D.J.M. 1994. Characterization of the circulating T-cell response after oral immunization of human volunteers with cholera toxin B subunit. *Vaccine*. Vol.12, No.1, 65-72.

Castro, B., Domoy, J.R., Evin, G. and Selve, C. 1975. *Tetrahedron Letters*. Vol. 14, 1219-1223.

Cerundolo, V., Elliott, T., Elvin, J., Bastin, J., Rammensee, H.G. and Townsend, A. 1991. The binding affinity and dissociation rates of peptides for class I major histocompatibility complex molecules. *European Journal of Immunology*. Vol. 21, 2069-2075.

Chen, Y., Southwood, S., Cox, A.L., Sakaguchi, K., Henderson, R.A., Appella, E., Hunt, D.F., Sette, A. and Engelhard, V.H. 1994. Naturally processed peptides longer than nine amino acid residues bind to the class I MHC molecule HLA-A2.1 with high affinity and in different conformations. *Journal of Immunology*. Vol. 152, 2874-2881.

Chernin, E. and Dunavan, C.A. 1962. The influence of host-parasite dispersion upon the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect *Australorbis glabratus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. II, 455-471.

Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A.A, Lane, W.S. and Strominger, J.L. 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 178, 27-47.

Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A.A. and Strominger, J.L. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature*, Vol. 358, 764-768.

Chothia, C. 1976. The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 105, 1-14.

Chou, P.Y. and Fasman, G.D. 1974. Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, Vol. 13, No. 2, 222-244.

Colbert, R.A., Rowland-Jones, S.L., McMichael, A.J. and Frelinger, J.A. 1994. Differences in peptide presentation between B27 subtypes: the importance of the P1 side chain in maintaining high affinity peptide binding to B*2703. *Immunity*, Vol. 1, 121-130.

Corr, M., Boyd, L.F., Frankel, S.R., Kozlowski, S., Padlan, E.A. and Margulies, D.H. 1992. Endogenous peptides of a soluble major histocompatibility complex class I molecule, H-2L^d_S: sequence motif, quantitative binding, and molecular modeling of the complex. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 176, 1681-1692.

Corr, M., Boyd, L.F., Padlan, E.A. and Margulies, D.H. 1993. H-2D^d exploits a four residue peptide binding motif. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 178, 1877-1892.

Cox, J.H., Yewdell, J.W., Eisenlohr, L.C., Johnson, P.R. and Bennink, J.R. 1990. Antigen presentation requires transport of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum. *Science*. Vol. 247, 715-718.

Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annual Review of Immunology*. Vol. 12, 259-293.

Czerkinsky, C., Russel, M.W., Lycke, N., Lindblad, M. and Holmgren, J. 1989. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infection and immunity*. Vol.57, 1072-1077.

Darcy, F., Maes, P., Gras-Masse, H., Auriault, C., Bossus, M., Deslee, D., Godard, I., Cesbron, M.F., Tartar, A. and Capron, A. 1992. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *The Journal of Immunology*. Vol. 149, No. 11, 3636-3641.

Degen, E., Cohen-Doyle, M.F. and Williams, D.B. 1992. Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both β 2-microglobulin and peptide. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 175, 1653-1661.

DeLisi, C. and Berzofsky, J.A. 1985. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 82, 7048-7052.

Dessein, A., Rihet, P., Demeure, C., Couissinier, C., Bacellar, O., Carvalho, E.M., Kohlstaedt, S., Dessein, H., Souza, A., Prata, A., Goudot, V., Bourgois, A. et Abel, L. 1992. Facteurs génétiques et immunologiques déterminant la résistance à la bilharziose en région d'endémie. *Médecine/Sciences*. Vol. 8, 108-118.

Dessein, A., Samuelson, J.C., Butterworth, A.E., Hogan, M., Sherry, B.A., Vadas, M.A. and David, J.R. 1981. Immune evasion by *Schistosoma mansoni*: loss of susceptibility to antibody or complement-dependent eosinophil attack by schistosomula cultured in medium free of macromolecules. *Parasitology*, Vol. 82, 357-374.

DiBrino, M., Parker, K.C., Shiloach, J., Knierman, M., Lukszo, J., Turner, R.V., Biddison, W.E. and Coligan, J.E. 1993. Endogenous peptides bound to HLA-A3 possess a specific combination of anchor residues that permit identification of potential antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 90, 1508-1512.

Dunne, D.W., Butterworth, A.E., Fulford, A.J., Kariuki, H.C., Langley, J.G., Ouma, J.H., Capron, A., Pierce, R.J. and Sturrock, R.F. 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis : association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *European Journal of Immunology*. Vol. 22, 1483-1494.

Eisenberg, D., Weiss, R.M. and Terwilliger, T.C. 1982. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, Vol. 299, 371-374.

Elliott, T. 1991. How do peptides associate with MHC class I molecules? *Immunology Today*. Vol. 12, No. 11. 386-388.

Elson, C.O., Ealding, W. and Lefkowitz, J. 1984. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. *Journal of Immunological Methods*. Vol. 67, 101-108.

Engelhard, V.H. 1994. Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 6, 13-23.

Estaquier, J., Wolowczuk, I., Boutillon, C., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Bossus, M., Tartar, A., Capron, A. and Auriault, C. 1993. Expected properties of synthetic peptide vaccines: Experimental approach with peptides derived from parasite (Sm28GST) and virus (nef) proteins. *Adv. in Allergy and Immunol.* Vol.2, 11-26

Fahnestock, M.L., Johnson, J.L., Feldman, R.M.R., Tsomides, T.J., Mayer, J., Narhi, L.O. and Bjorkman, P.J. **1994.** Effects of peptide length and composition on binding to an empty class I MHC heterodimer. *Biochemistry*. Vol. 33, 8149-8158.

Falk, K., Rötzschke, O., Deres, K., Metzger, J., Jung, G. and Rammensee, H-G. **1991^b.** Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T Cell epitope forecast. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 174, 425-434.

Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H-G. **1991^a.** Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. Vol. 351. 290-296.

Fraga, S. **1982.** Theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Canadian Journal of Chemistry*. Vol. 60, 2606-2610.

Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A. and Wilson, I.A. **1992.** Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. *Science*. Vol. 257, 919-926.

Friedrich, U., Scheidtmann, K-H. and Walter, G. **1986.** Induction and characterization of antisera against terminal and internal peptides of SV40 large T antigen. *Immunology Letters*, Vol. 12, 207-215.

Fruci, D., Rovero, P., Falasca, G., Chersi, A., Sorrentino, R., Butler, R., Tanigaki, N. and Tosi, R. **1993.** Anchor residue motifs of HLA class-I-binding peptides analyzed by the direct binding of synthetic peptides to HLA class I α chains. *Human Immunology* . Vol. 38, 187-192.

Garrett, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. **1989.** Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature*. Vol. 342, 692-696.

Gavioli, R., Zhang, Q.J., Marastoni, M., Guerrini, R., Reali, E., Tomatis, R., Masucci, M.G. and Traniello, S. **1995.** Effect of anchor residue modifications on the stability of HLA-A11/peptide complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 206, No. 1, 8-14.

Geluk, A., Van Meijgaarden, K.E., Southwood, S., Oseroff, C., Drijfhout, J.W., De Vries, R.R.P., Ottenhoff, T.H.M. and Sette, A. **1994.** HLA-DR3 molecules can bind peptides carrying two alternative specific submotifs. *Journal of Immunology*. Vol. 152, 5742-5748.

Germain, R.N. **1993.** Seeing double: The detection of "dimers of dimers" in MHC class II crystals suggest how T-cell receptor signalling complexes may be organized and stabilized by multiple, low-affinity interactions. *Current Biology* , Vol. 3, No. 9, 586-589.

Germain, R.N. and Hendrix, L.R. 1991. MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature*. Vol. 353, 134-139.

Germain, R.N. and Margulies, D.H. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annual Review of Immunology*. Vol. 11, 403-450.

Geysen, H.M., Mason, T.J. and Rodda, S.J. 1988. Cognitive features of continuous antigenic determinants. *Journal of Molecular Recognition*, Vol. 1, No. 1, 32-41.

Gill, R.F., Abastado, J.P. and Wei, W.Z. 1994. Systematic identification of H-2 K^d binding peptides and induction of peptide specific CTL. *Journal of Immunological Methods*. Vol. 176, 245-253.

Gilligan, C.A. and Li Wan Po, A. 1991. Oral vaccines : Design and delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 75, 1-24.

Glynne, R., Powis, S.H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L.A. and Trowsdale, J. 1991. A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature*. Vol. 353, 357-360.

Goldberg, A.L. and Rock, K.L. 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*. Vol. 357, 375-379.

Gopalakrishnan, B. and Roques, B.P. 1992. Do antigenic peptides have a unique sense of direction inside the MHC binding groove? *Federation of European Biochemical Societies*. Vol. 303, Nos. 2-3, 224-228.

Gorga, J.C. 1992. Structural analysis of class II major histocompatibility complex proteins. *Critical Reviews in Immunology*. Vol. 11, No.5, 305-335.

Grezel, D. 1992. Participation des IgA spécifiques de l'antigène protecteur Sm28GST aux mécanismes de défense contre le schistosome au cours d'infestations expérimentales. *Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé*. Université de Lille I. Septembre 1992.

Grezel, D., Capron, M., Grzych, J.M., Fontaine, J., Lecocq, J.P. and Capron, A. 1993. Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *European Journal of Immunology*. Vol. 23, 454-460.

Grzych, J-M., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. 1982. *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *The Journal of immunology*. Vol. 129, No. 6, 2739-2743.

Grzych, J-M., Capron, M., Dissous, C. and Capron, A. 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *The Journal of Immunology*. Vol. 133, No. 2, 998-1004.

- Grzych, J-M., Grezel, D., Xu, C.B., Neyrinck, J-L., Capron, M., Ouma J.H., Butterworth, A.E. and Capron, A. 1993.** IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*. Vol. 150, No. 2, 527-535.
- Grzych, J.M., Capron, M., Lambert, P.H., Dissous, C., Torres, S. and Capron, A. 1985.** An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature*, Vol. 316, 74-76.
- Guillet, J-G., Lai, M-Z., Briner, T.J., Smith, J.A. and Geffer, M.L. 1986.** Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens. *Nature*, Vol. 324, 260-262.
- Guo, H-C., Jardetzky, T.S., Garrett, T.P.J., Lane, W.S., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. 1992.** Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature*. Vol. 360, 364-366.
- Hagan, P., Blumenthal, U.J., Dunn, D., Simpson, A.J.G. and Wilkins, H.A. 1991.** Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, Vol. 349, 243-245.
- Hammer, J., Bono, E., Gallazzi, F., Belunis, C., Nagy, Z. and Sinigaglia, F. 1994.** Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 180, 2353-2358.
- Hammer, J., Valsasnini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B. and Sinigaglia, F. 1993.** Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR binding peptides. *Cell*, Vol. 74, 197-203.
- Hämmerling, G.J. and Moreno, J. 1990.** The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunology Today*. Vol. 11, No. 10, 337-340.
- Henderson, R.A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. 1992.** HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science*. Vol. 255, 1264-1266.
- Hill, A.V.S., Elvin, J., Willis, A.C., Aidoo, M., Allsopp, E.M., Gotch, F.M., Ming Gao, X., Takiguchi, M., Greenwood, B.M., Townsend, A.R.M., McMichael, A.J. and Whittle, H.C. 1992.** Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature*. Vol. 360, 434-439.
- Hilleman, M.R. 1985.** Newer directions in vaccine development and utilization. *The Journal of Infectious Diseases*. Vol. 151, No. 3, 407-419.

Hobohm, U. and Meyerhams, A. 1993. A pattern search method for putative anchor residues in T cell epitopes. *European Journal of Immunology*. Vol. 23, 1271-1276.

Holy, J.M., O'Leary, K.A., Oaks, J.A. and Tracy, J.W. 1989. Immunocytochemical localization of the major glutathione S-transferases in adult *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*. Vol. 75, No. 2, 181-190.

Hopp, T.P. and Woods, K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 78, No. 6, 3824-3828.

Hoyne, G.F., Callow, M.G, Kuo, M.C and Thomas, W.R. 1993. Presentation of peptides and proteins by intestinal epithelial cells. *Immunology* Vol. 80, 204-208.

Huczko, E.L., Bodnar, W.M., Benjamin, D., Sakaguchi, K., Zhu, N.Z., Shabanowitz, J., Henderson, R.A., Appella, E., Hunt, D.F. and Engelhard, V.H. 1993. Characteristics of endogenous peptides eluted from the class I MHC molecule HLA-B7 determined by mass spectrometry and computer modeling. *The Journal of Immunology*. Vol. 151, No. 5, 2572-2587.

Hunt, D.F., Henderson, R.A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A.L., Appella, E. and Engelhard, V.H. 1992^b. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science*. Vol. 255, 1261-1263.

Hunt, D.F., Michel, H., Dickinson, T.A., Shabanowitz, J., Cox, A.L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H.M. and Sette, A. 1992^a. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d. *Science*. Vol. 256, 1817-1820.

Jackson, M.R., Cohen-Doyle, M.F., Peterson, P.A. and Williams, D.B. 1994. Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science*. Vol. 263, 384-387.

Jardetzky, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R. and Wiley, D.C. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*. Vol. 353, 326-329.

Kagan, I.G 1958. Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. *Rice Institute Pamphlet*. Vol. 45, 151-182.

Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., and Cook, P.I. 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, Vol. 34, No. 2, 595-598.

Kaiser, E.T. and Kezdy, F.J. 1984. Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones. *Science*, Vol. 223, 249-255.

Kleijmeer, M.J., Kelly, A., Geuze, H.J., Slot, J.W., Townsend, A. and Trowsdale, J. 1992. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and *cis*-Golgi. *Nature*. Vol. 357, 342-344.

Kloetzel, K. and Da Silva, J.R. 1967. Schistosomiasis mansoni acquired in adulthood: behavior of egg counts and the intradermal test. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 16, No. 2, 167-169.

König, W. und Geiger, R. 1970. Eine neue methode zur synthese von peptiden: aktivierung der carboxylgruppe mit dicyclohexylcarbodiimide unter zusatz von 1-hydroxybenzotriazolen. *Chem. Berichte*. Vol. 103, 2024-2033.

Koppelman, B., Zimmerman, D.L., Walter, P. and Brodsky, F.M. 1992. Evidence for peptide transport across microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89, 3908-3912.

Kovacsovics-Bankowski, M. and Rock, K.L. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*. Vol. 267, 243-267.

Kozlowski, S., Takeshita, T., Boehncke, W.H., Takahashi, H., Boyd, L.F., Germain, R.N., Berzofsky, J.A., Margulies, D.H. 1991. Excess β_2 microglobulin promoting functional peptide association with purified soluble class I MHC molecules. *Nature*. Vol. 349, 74-77.

Kropshofer, H., Max, H., Müller, C.A., Hesse, F., Stevanovic, S., Jung, G. and Kalbacher, H. 1992. Self-peptide released from class II HLA-DR1 exhibits a hydrophobic two-residue contact motif. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 175, 1799-1803.

Kubo, R.T., Sette, A., Grey, H.M., Appella, E., Sakaguchi, K., Zhu, N-Z., Arnott, D., Sherman, N., Shabanowitz, J., Michel, H., Bodnar, W.M., Davis, T.A. and Hunt, D.F. 1994. Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *Journal of Immunology*, Vol. 152, 3913-3924.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*. Vol. 227, 680-685.

Lamb, C.A. and Cresswell, P. 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *The Journal of Immunology*. Vol. 148, No. 11, 3478-3482.

Landsperger, W., Stirewalt, M.A. and Dresden, M.H. 1982. Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry Journal*. Vol. 201, 137-144.

- Lange, S.** and Holmgren, J. **1978.** Protective antitoxic cholera immunity in mice: influence of route and number of immunizations and mode of action of protective antibodies. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica ; Section C*, Vol. 86, 145-152.
- Latron, F., Pazmany, L., Morrison, J., Moots, R., Saper, M.A., McMichael, A. and Strominger, J.L. 1992.** A critical role for conserved residues in the cleft of HLA-A2 in presentation of a nonapeptide to T cells. *Science*. Vol. 257, 964-967.
- Lawson, J.R.** and Wilson, R.A. **1980.** The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilization. *Parasitology*. Vol. 81, 337-348.
- Lerner, R.A. 1982.** Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature*, Vol. 299, 592-596.
- Levitt, M. 1976.** A simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 104, 59-107.
- Lewis, S.A.** and Strand, M. **1991.** Characterization of proteins and immunogens released by adult *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*. Vol. 77, No. 2, 263-271.
- Loker, E.S. 1983.** A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitology*. Vol. 87, 343-369.
- Loss, G.E.** and Sant, A.J. **1993.** Invariant chain retains MHC class II molecules in the endocytic pathway. *The Journal of Immunology*. Vol. 150, No. 8, 3187-3197.
- Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S.L., Quaranta, V. and Peterson, P.A. 1990.** Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature*. Vol. 348, 600-605.
- Lycke, N.** and Holmgren, J. **1986.** Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology*. Vol. 59, 301-308.
- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. 1991.** The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature*. Vol. 353, 321-325.
- Maddison, S.E., Norman, L., Geiger, S.J. and Kagan, I.G. 1970.** *Schistosoma mansoni* infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected, reexposed, and antigen-sensitized animals. *The Journal of Parasitology*. Vol. 56, No. 6, 1058-1065.

- Malcherek, G.,** Gnau, V., Jung, G., Rammensee, H.G. and Melms, A. **1995.** Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 181, 527-536.
- Manganaro, M.,** Ogra, P.L., Ernst, P.B., **1994.** Oral immunization: Turning fantasy into reality. *Int. Arch. Allergy Immunology*. Vol. 103, 223-2333.
- Martinez, C.K.** and Monaco, J.J. **1991.** Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature*. Vol. 353, 664-667.
- Martinez-A, C.,** Pereira, P., Toribio, M.L., Marcos, M.A.R., Bandeira, A. De la Hera, A., Marquez, C., Cazenave, P-A. and Coutinho, A. **1988.** The participation of B cells and antibodies in the selection and maintenance of T cell repertoires. *Immunological Reviews*, No. 101. 191-215.
- Matsumura, M.,** Fremont, D.H., Peterson, P.A. and Wilson, I.A. **1992.** Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*. Vol. 257, 927-934.
- Mazanec, M.B.,** Nedrud, J.G., Kaetzel, C.S. and Lamm, M.E. **1993.** A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunology Today*. Vol. 14, No. 9, 430-434.
- Mc Ghee, J.R.,** Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M. and Kiyono, H. **1992.** The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*, Vol. 10, No. 2, 75-88.
- McDonald, R.A.,** Hosking, C.S. and Jones, C.L. **1988.** The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *Journal of Immunological Methods*. Vol. 106, 191-194.
- McLaren, D.J.** **1980.** *Schistosoma mansoni*: the parasite surface in relation to host immunity. *Research Studies Press. John Wiley & sons Ltd - Chichester.*
- Merrifield, R.B.** **1963.** Solid Phase Peptide Syntheses. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of American Chemistry Society*. Vol. 85, 2149-2154.
- Mestecky, J.** and McGhee, J.R., **1987.** Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Advances in Immunology*. Vol. 40, 153-245.
- Missale, G.,** Redeker, A., Person, J., Fowler, P., Guilhot, S., Schlicht, H.J., Ferrari, C. and Chisari, F.V. **1993.** HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 177, 751-762.

- Mitchison, N.A. 1971.** The carrier effect in the secondary response to hapten protein conjugate. II. Cellular cooperation. *European Journal of Immunology*. Vol. 1, 18-26.
- Momburg, F., Neefjes, J.J., and Hämmerling, G.J. 1994.** Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 6, 32-37.
- Morrison, J., Elvin, J., Latron, F., Gotch, F., Moots, R., Strominger, J.L. and McMichael, A. 1992.** Identification of the nonamer peptide from influenza A matrix protein and the role of pockets of HLA-A2 in its recognition by cytotoxic T lymphocytes. *European Journal of Immunology*. Vol. 22, 903-907.
- Morrissey, J.H., 1981.** Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*. Vol. 117, 307.
- Morton, P.A., Zacheis, M.L., Giacometto, K.S., Manning, J.A. and Schwartz, B.D. 1995.** Delivery of nascent MHC class II-invariant chain complexes to lysosomal compartments and proteolysis of invariant chain by cysteine proteases precedes peptide binding in B-lymphoblastoid cells. *The Journal of Immunology*. Vol. 154, 137-150.
- Nayersina, R., Fowler, P., Guilhot, S., Missale, G., Cerny, A., Schlicht, H.J., Vitiello, A., Chesnut, R., Person, J.L., Redeker, A.G. and Chisari, F.V. 1993.** HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *The Journal of Immunology*. Vol. 150, No. 10, 4659-4671.
- Neefjes, J.J., Dierx, J. and Ploegh, H.L. 1993.** The effect of anchor residue modifications on the stability of major histocompatibility complex class I-peptide interactions. *European Journal of Immunology* . Vol. 23, 840-845.
- Nelson, C.A., Roof, R.W., McCourt, D.W. and Unanue, E.R. 1992.** Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-A^k. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89, 7380-7383.
- Neutra, M.R. and Kraehenbuhl, J.P. 1994.** Mucosal immunization via M cells for production of protective secretory IgA antibodies. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 50, 10-13.
- Newcomb, J.R. and Cresswell, P. 1993.** Characterization of endogenous peptides bound to purified HLA-DR molecules and their absence from invariant chain-associated $\alpha\beta$ dimers. *The Journal of Immunology*. Vol. 150, No. 2, 499-507.

Nijman, H.W., Houbiers, J.G.A., Vierboom, M.P.M., Van der Burg, S.H., Drijfhout, J.W., D'Amaro, J., Kenemans, P., Melief, C.J.M. and Kast, W.M. 1993. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *European Journal of Immunology* . Vol. 23, 1215-1219.

Nöbner, E. and Parham, P. 1995. Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 181, 327-337.

Nojima, H. and Sato, A. 1982. *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* : Emergence of schistosome cercariae from snails with darkness and illumination. *Experimental Parasitology*, Vol. 53, 189-198.

Novotny, J., Handschumacher, M., Haber, E., Bruccoleri, R.E., Carlson, W.B., Fanning, J.A., Smith, J.A. and Rose, G.D. 1986. Antigenic determinants in proteins coincide with surface regions accessible to large probes (antibody domains). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 83, 226-230.

Ogasawara, K., Naruse, H., Itoh, Y., Gotohda, T., Arikawa, J., Kida, H., Good, R.A. and Onoé, K. 1992. A strategy for making synthetic peptide vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89, 8995-8999.

Ortmann, B., Androlewicz, M.J. and Cresswell, P. 1994. MHC class I/ β 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*. Vol. 368, 864-867.

Pancré, V., Wolowczuk, I., Bossus, M., Gras-Masse, H., Guerret, S., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. 1994. Evaluation of the effect of Sm28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis: interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide. *Molecular Immunology*. Vol. 31, No. 16, 1247-1256.

Parham, P. 1992. Deconstructing the MHC. *Nature*. Vol. 360, 300-301.

Parker, K.C., Biddison, W.E. and Coligan, J.E. 1994. Pocket mutations of HLA-B27 show that anchor residues act cumulatively to stabilize peptide binding. *Biochemistry*. Vol. 33, 7736-7743.

Pérarnau, B., Siegrist, C.A., Gillet, A., Vincent, C., Kimura, S. and Lemonnier, F.A. 1990. β 2-Microglobulin restriction of antigen presentation. *Nature*. Vol. 346, 751-754.

Phillips, S.M., Bentley, A.G., Linette, G., Doughty, B. and Capron, M. 1983. The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. In vivo studies of resistance. *The Journal of Immunology*. Vol. 131, No. 3, 1466-1474.

Pitchford, R.J., Meyling, A.H., Meyling, J. and Du Toit, J.F. 1969. Cercarial shedding patterns of various schistosome species under outdoor conditions in the Transvaal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Vol. 63, No. 3, 359-371.

Powis, S.H., Mockridge, I., Kelly, A., Kerr, L.A., Glynne, R., Gileadi, U., Beck, S. and Trowsdale, J. 1992. Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89, 1463-1469.

Prah, S.K. and James, C. 1977. The influence of physical factors on the survival and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* I. Effect of temperature and ultra-violet light. *Journal of Helminthology*. Vol. 51, 73-85.

Pullen, G.R., Fitzgerald, M.G. and Hosking, C.S. 1986. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *Journal of Immunological Methods*. Vol. 86, 83-87.

Rammensee, H-G., Falk, K. and Rötzschke, O. 1993^a. MHC molecules as peptide receptors. *Current Opinion in Immunology* , 5:35-44.

Rammensee, H.G., Falk, K. and Rötzschke, O. 1993^b. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annual Review of Immunology*. Vol. 11, 213-244.

Reddehase, M.J., Rothbard, J.B. and Koszinowski, U.H. 1989. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature*. Vol. 337, 651-653.

Renom, G. 1992. Approche de la région isotypique spécifique de l'antigène protecteur Sm28GST de *Schistosoma mansoni* : importance de la réponse IgA chez l'homme. *Mémoire de DEA de Sciences de la Vie et de la Santé*. Université de Lille I. Septembre 1992.

Rihet P., Demeure, C.E., Bourgois, A., Prata, A. and Dessein, A.J. 1991. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *European Journal of Immunology* . Vol. 21, 2679-2686.

Rihet, P., Demeure, C.E., Dessein, A.J. and Bourgois, A. 1992. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S.mansoni* endemic area. *European Journal of Immunology* . Vol. 22, 2063-2070.

Robertson, M. 1991. Proteasomes in the pathway. *Nature*. Vol. 353, 300-301.

Robinson, J.H., Case, M.C. and Brooks, C.G. 1992. Palmitic acid conjugation of a protein antigen enhances major histocompatibility complex class II-restricted presentation to T cells. *Immunology*. Vol.76 ,593-598.

Roche, P.A. and Cresswell, P. 1991. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 88, 3150-3154.

Roche, P.A., Marks, M.S. and Cresswell, P. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature*. Vol. 354, 392-394.

Rock, K.L., Gamble, S. and Rothstein, L. 1990. Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science*, Vol. 249, 918-921.

Rock, K.L., Gamble, S., Rothstein, L., Gramm, C. and Benacerraf, B. 1991. Dissociation of β 2-microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell*. Vol. 65, 611-620.

Romagnoli, P., Layet, C., Yewdell, J., Bakke, O. and Germain, R.N. 1993. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 177, 583-596.

Romero, P., Corradin, G., Luescher, I.F. and Maryanski, L. 1991. H-2K^d-restricted antigenic peptides share a simple binding motif. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 174, 603-612.

Rothbard, J.B. 1986. Peptides and the cellular immune response. *Annales de l'Institut Pasteur/Virologie* Vol. 137, 518-528.

Rothbard, J.B. 1994. One size fits all. *Current Biology*. Vol. 4, No. 7, 653-655.

Rothbard, J.B. and Geftter, M.L. 1991. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Annual Review of Immunology*. Vol. 9, 527-565.

Rothbard, J.B. and Taylor, W.R. 1988. A sequence pattern common to T cell epitopes. *The EMBO Journal*, Vol. 7, No. 1, 93-100.

Rothbard, J.B., Lechler, R.I., Howland, K., Bal, V., Eckels, D.D., Sekaly, R., Long, E.O., Taylor, W.R. and Lamb, J.R. 1988. Structural model of HLA-DR1 restricted T cell antigen recognition. *Cell*, Vol. 52, 515-523.

Rötzschke, O. and Falk, K. 1991^a. Naturally-occurring peptide antigens derived from the MHC class-I-restricted processing pathway. *Immunology Today*. Vol. 12, No. 12, 447-455.



Rötzschke, O. and Falk, K. 1994. Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 6, 45-51.

Rötzschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G. and Rammensee, H.G. 1990. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*. Vol. 348, 252-254.

Rouaix, F., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Diesis, E., Ridel, P.R., Estaquier, J., Capron, A., Tartar, A. and Auriault, C. 1994^b. Effect of lipopeptidic formulation on macrophage activation and peptide presentation to T cells. *Vaccine*. Vol. 12, No. 13, 1209-1214.

Rouaix, F., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Ridel, P.R., Diesis, E., Marguerite, M., Estaquier, J., Capron, A., Tartar, A. and Auriault, C. 1994^a. Improvement of the T-cell response to a non immunogenic peptide by its tandem association with a highly efficient T-helper peptide. *Immunopharmacology*. Vol. 28, 215-222.

Rousseaux-Prévost, R., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. 1978. IgE in experimental schistosomiasis. Quantitative determination of specific IgE antibodies against *S. Mansoni* : a follow-up study of two strains of infected rats. Correlation with protective immunity. *Immunology*. Vol. 35, 33-39.

Rudensky, A.Y., Preston-Hurlburt, P., Al-Ramadi, B.K., Rothbard, J. and Janeway Jr, C.A. 1992. Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature*. Vol. 359, 429-431.

Rudensky, A.Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S-C., Barlow, A. and Janeway Jr, C.A. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*. Vol. 353, 622-627.

Ruppert, J., Sydney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M. and Sette, A. 1993. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, Vol. 74, 929-937.

Sadun, E.H. and Gore, R.W. 1970. *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* : Homocytotropic reagin-like antibodies in infections of man and experimental animals. *Experimental Parasitology*. Vol. 28, 435-449.

Saito, Y., Peterson, P.A. and Matsumura, M. 1993. Quantitation of peptide anchor residue contributions to class I major histocompatibility complex molecule binding. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 268, No. 28, 21309-21317.

Sant, A.J. and Miller J. 1994. MHC class II antigen processing: biology of invariant chain. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 6, 57-63.

- Santoro, F., Capron, M., Joseph, M., Rousseaux-Prevost, R. and Capron, A. 1978.** Circulating antigens and immune complexes in *Schistosoma mansoni*-infected rats. Characterization by radioimmunoprecipitation-PEG assay (RIPEGA). *Clinical and Experimental Immunology*. Vol. 32, 435-442.
- Saper, M.A., Bjorkman, P.J. and Wiley, D.C. 1991.** Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2,6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 219, 277-319.
- Schafer, P.H. and Pierce, S.K. 1994.** Evidence for dimers of MHC class II molecules in B lymphocytes and their role in low affinity T cell responses. *Immunity*. Vol. 1, 699-707.
- Schild, H., Deres, K., Wiesmüller, K-H., Jung, G. and Rammensee, H-G. 1991.** Efficiency of peptides and lipopeptides for *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T cells. *European Journal of Immunology*. Vol. 21, 2649-2654.
- Schulze-Gahmen, U., Klenk, H-D. and Beyreuther, K. 1986.** Immunogenicity of loop-structured short synthetic peptides mimicking the antigenic site A of influenza virus hemagglutinin. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 159, 283-289.
- Sela, M. 1969.** Antigenicity: some molecular aspects. Synthetic antigens help our understanding of immunological phenomena on a molecular level. *Science*, Vol. 166, 1365-1374.
- Sette, A., Buus, S., Colon, S., Smith, J.A., Miles, C. and Grey, H.M. 1987.** Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Nature*, Vol. 328, 395-399.
- Sette, A., Sidney, J., Oseroff, C., Del Guercio, M-F., Southwood, S., Arrhenius, T., Powell, M.F., Colon, S.M., Gaeta, F.C.A. and Grey, H.M. 1993.** HLA DR4w4-binding motifs illustrate the biochemical basis of degeneracy and specificity in peptide-DR interactions. *The Journal of Immunology*. Vol. 151, No. 6, 3163-3170.
- Sette, A., Southwood, S., Miller, J. and Appella, E. 1995.** Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain-derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 181, 677-683.
- Shimizu, A. and Honto, T. 1984.** Immunoglobulin class switching. *Cell*. Vol. 36, 801-806.
- Sidney, J., Del Guercio, M.F., Southwood, S., Engelhard, V.H., Appella, E., Rammensee, H.G., Falk, K., Rötzschke, O., Takiguchi, M., Kubo, R.T., Grey, H.M. and Sette, A. 1995.** Several HLA alleles share overlapping peptide specificities. *The Journal of Immunology*. Vol. 154, 247-259.

Sidney, J., Oseroff, C., Del Guercio, M.F., Southwood, S., Krieger, J.I., Ishioka, K., Appella, E. and Sette, A. 1994. Definition of a DQ3.1-specific binding motif. *The Journal of Immunology*. Vol.152, 4516-4525.

Silver, M.L., Guo, H-C., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. 1992. Atomic structure of a human MHC molecule presenting an influenza virus peptide. *Nature*. Vol. 360. 367-369.

Singh, B., Lee, K-C., Fraga, E., Wilkinson, A., Wong, M. and Barton, M.A. 1980. Minimum peptide sequences necessary for priming and triggering of humoral and cell-mediated immune responses in mice: use of synthetic peptide antigens of defined structure. *The Journal of Immunology*. Vol. 124, No. 3, 1336-1343.

Sinigaglia, F. and Hammer, J. 1994. Defining rules for the peptide-MHC class II interaction. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 6, 52-56.

Smithers, S.R. and Terry, R.J. 1965. Acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the albino rat. *Parasitology*, Vol.55, 711-717.

Smithers, S.R. and Terry, R.J. 1967. Resistance to experimental infection with *Schistosoma mansoni* in rhesus monkeys induced by the transfer of adult worms. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 61, No. 4, 517-533.

Smithers, S.R. and Terry, R.J. 1969. Immunity in schistosomiasis. *Annals New York Academy of Sciences*. Vol. 160, 826-840.

Solheim, J.C., Carreno, B.M., Smith, J.D., Gorka, J.C., Myers, N.B., Wen, Z., Martinko, J.M., Lee, D.R. and Hansen, T.H. 1993. Binding of peptides lacking consensus anchor residue alters H-2L^d serologic recognition. *The Journal of Immunology*. Vol. 151. No. 10. 5387-5397.

Staats, H.F., Jackson, R.J., Marirano, M., Takahashi, I., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 1994. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 6, 572-583.

Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. 1994. Crystal structure of human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*. Vol. 368. 215-221.

Stevens, W.J., Feldmeir, H., Bridts, C.H. and Daffalla, A.A. 1983. IgG and IgE circulating immune complexes, total serum IgE and parasite related IgE in patients with mono-or mixed infection with *Schistosoma mansoni* and/or *S. haematobium*. Influence of therapy. *Clinical and Experimental Immunology*. Vol. 52, 144-152.

Stirewalt, M.A. 1974. *Schistosoma mansoni* : Cercaria to schistosomule. *Advances in Immunology*. Vol. 12. 115-182.

Suh, W.K., Cohen-Doyle, M.F., Fruh, K., Wang, K., Peterson, P.A. and Williams, D.B. 1994. Interaction of MHC class I molecules with antigen processing. *Science*. Vol. 264, 1322-1326.

Suhrbier, A., Schmidt, C. and Fernan, A. 1993. Prediction of an HLA B8-restricted influenza epitope by motif. *Immunology*. Vol. 79, 171-173.

Taïbi, A., Plumas-Marty, B., Guevara-Espinoza, A., Schöneck, R., Pessoa,, H., Loyens, M., Piras, R., Aguirre, T. Gras-Masse, H., Bossus, M., Tartar, A. Capron, A. and Ouaisi, A. 1993. Trypanosoma cruzi: immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *The Journal of Immunology*. Vol. 151, No. 5, 2676-2689.

Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Alexander, H., Houghten, R.A., Olson, A.J., Lerner, R.A. and Hendrickson, W.A. 1984. The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature*. Vol. 312. 127-134.

Tam, J.P., Heath, W.F. and Merrifield, R.B. 1983. SN₂ deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: Evidence and application in peptide synthesis. *Journal of American Chemistry Society*. Vol. 105, 6442-6455.

Tanaka, T., Slamon, D.J. and Cline, M.J. 1985. Efficient generation of antibodies to oncoproteins by using synthetic peptide antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 82, 3400-3404.

Teyton, L., O'Sullivan, D., Dickson, P.W., Lotteau, V., Sette, A., Fink, P. and Peterson, P.A. 1990. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature*. Vol. 348, 39-44.

Torpier, G., Capron, A. and Ouaisi, M.A. 1979. Receptor for IgG(Fc) and human β 2-microglobulin on *S. mansoni* schistosomula. *Nature*, Vol. 278, 447-449.

Torpier, G., Capron, M. and Capron, A. 1977. Structural changes of the tegumental membrane complex in relation to developmental stages of *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda). *Journal of Ultrastructure Research*, Vol. 61, 309-324.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and source applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 76, 4350.

Townsend, A.R.M., Gotch, F.M. and Davey, J. 1985. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell*, Vol. 42, 457-467.

- Udaka, K., Tsomides, T.J. and Elsen, H.N. 1992.** A naturally occurring peptide recognized by alloreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in association with a class I MHC protein. *Cell*. Vol. 69, 989-998.
- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J. and Liu, M.A. 1994.** Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *European Journal of Immunology*. Vol. 24, 1590-1596.
- Unanue, E.R. 1992.** Cellular studies on antigen presentation by class II MHC molecules. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 4, 63-69.
- Unanue, E.R. and Allen, P.M. 1987.** The Basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, Vol. 236, 551-557.
- Van Bleek, G.M. and Nathenson, S.G. 1990.** Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b molecule. *Nature*, Vol. 348, 213-216.
- Van Regenmortel, M.H.V., Briand, J.P., Muller, S., and Plaué, S. 1988** Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Eds. Burdon, R.H. and Van Knippenberg, P.H.* Volume 19, Chapter 5, 144-158.
- Venkatesan, P. and Wakelin, D. 1993.** ELISAs for parasitologists : or lies, damned lies and ELISAs. *Parasitology Today*, Vol. 9, No. 6. 228-233.
- Vermund, S.H., Bradley, D.J. and Ruiz-Tiben, E. 1983.** Survival of *Schistosoma mansoni* in the human host: estimates from a community-based prospective study in Puerto Rico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 32, No. 5, 1040-1048.
- West, M.A., Lucocq, J.M. and Watts, C. 1994.** Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature*. Vol. 369, 147-151.
- Westhof, E., Altschuh, D., Moras, D., Bloomer, A.C., Mondragon, A., Klug, A. and Van Regenmortel, M.H.V. 1984.** Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature*. Vol. 311, 123-126.
- Wolowkzuk, I., Auriault, C., Gras-masse, H., Vendeville, C., Balloul, J.M., Tartar, A. and Capron, A. 1989.** Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *The Journal of Immunology*. Vol. 142, No. 4, 1342-1350.
- Xu, C-B., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Wolowczuk, I., Tartar, A. and Capron, A. 1993.** *Schistosoma mansoni* 28-kDa Glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. *The Journal of Immunology*. Vol 150, No. 3, 940-949.

Xu, C-B., Verwaerde, C., Grzych, J-M., Fontaine, J. and Capron, A. **1991.** A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *European Journal of Immunology*. Vol. 21, 1801-1807.

Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pillai, S. and McGhee, J.R. **1993.** Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: Oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 178, 1309-1320.

Yun, T.J., Tallquist, M.D., Rohren, E.M., Sheil, J.M. and Pease, L.R. **1994.** Minor pocket B influences peptide binding, peptide presentation and alloantigenicity of H-2K^b. *International Immunology*. Vol. 6, No. 7, 1037-1047.

Zhang, Q.J., Gavioli, R., Klein, G. and Masucci, M.G. **1993.** An HLA-A11-specific motif in nonamer peptides derived from viral and cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 90, 2217-2221.

Zhang, W., Young, A.C.M., Imarai, M., Nathenson, S.G. and Sacchettini, J.C. **1992.** Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2K^b molecule containing a single viral peptide: Implications for peptide binding and T-cell receptor recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89, 8403-8407.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1	
INTRODUCTION.....	2	
GENERALITES		
LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	4	
I - INTRODUCTION.....	4	
II-LES ANTICORPS	5	
1 - Structure	6	
2 - Liaison antigène-anticorps.....	7	
3 - Notions d'affinité et d'avidité	8	
III - LES MOLECULES DE CMH	8	
1 - Les molécules de CMH de classe I	9	
a - Structure.....	10	
b - Fixation des peptides aux molécules de CMH I.....	11	
c- Peptides antigéniques.....	13	
d- Présentation de l'antigène par les molécules de CMH de classe I.....	16	
2 - Les molécules de CMH de classe II.....	18	
a - Structure.....	18	
b - Fixation des peptides aux molécules de CMH II.....	19	
c - Peptides antigéniques.....	20	
d - Présentation de l'antigène par les molécules de CMH classe II.....	22	
3 - Reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TcR.....	23	
4- Conclusion	24	
UTILISATION D'IMMUNOGENES PEPTIDIQUES COMME VACCINS POTENTIELS.....		26
I - RAPPELS SUR LA VACCINATION.....	26	
II - VACCINATION A L'AIDE DE PEPTIDES SYNTHETIQUES.....	27	
1 - Conception	28	
2 - Immunogénicité	28	
3 - Principe	29	
III - CRITERES POUR LA SELECTION D'IMMUNOGENES		

PEPTIDIQUES	31
1 - Critères pour la sélection de séquences antigéniques	31
a - Localisation en surface	32
b - Mobilité de la chaîne protéique	33
c - Conformation de la séquence.....	33
2 - Critères d'immunogénicité	35
a - Taille d'un peptide immunogénique	35
b - Reconnaissance du peptide par le système immunitaire de l'hôte.....	35
 IV - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE.....	36
1 - Principe	36
2 - Le support.....	37
3 - Protection des acides aminés.....	39
a - Fonction α -aminée.....	39
b - Chaînes latérales.....	39
4 - Synthèse.....	40
a - Fixation du premier acide aminé.....	40
b - Elongation de la chaîne.....	41
5 - Elimination de la résine et déprotection des chaînes latérales.....	42
6 - Purification et contrôles	42
a - Introduction.....	43
b - Technique de purification : CLHP préparative en phase inverse	44
c - Contrôles.....	44
α - CLHP analytique en phase inverse.....	44
β - Analyse d'acides aminés.....	45
γ - Spectrométrie de masse	45
 LA BILHARZIOSE.....	46
 I - GENERALITES SUR LA BILHARZIOSE	46
1 - Qu'est-ce que la bilharziose ?.....	47
2 - Fiche signalétique des schistosomes.....	48
3 - Le cycle biologique	48
 II - LA RÉPONSE IMMUNE CHEZ LES ANIMAUX.....	53
1 - Choix du modèle animal	53
2 - Caractères de la réponse immune contre les schistosomes.....	54
3 - La réaction granulomateuse.....	55
4 - L'immunité spécifique	56
a - Immunité thymo-dépendante.....	56
b - Mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps (ADCC).....	57
5 - Mécanismes d'échappement du parasite.....	57

III - LA REPOSE IMMUNE CHEZ L'HOMME.....	58
1 - L'immunité à la réinfection.....	58
2 - Les différents isotypes d'anticorps mis en jeu.....	59
a - Isotypes effecteurs.....	59
b - Isotypes bloquants.....	59
IV - BILHARZIOSE : VERS UN VACCIN ?.....	60
1 - Localisation de l'antigène Sm28GST.....	62
2 - Mécanismes effecteurs impliqués dans la protection.....	62
a - Réduction de la charge parasitaire.....	62
b- Réduction de la ponte des parasites.....	64
c - Réduction de la viabilité des œufs.....	64
3 - Réponse immunitaire anti-Sm28GST.....	65
a - Réponse humorale.....	65
b - Réponse cellulaire.....	65
V - EPITOPES IMPLIQUES DANS LE POUVOIR PROTECTEUR DE LA Sm28GST.....	66
1 - Prédiction des épitopes de la Sm28GST.....	66
2 - Analyse de l'antigénicité des peptides sélectionnés.....	67
a - Antigénicité B des peptides 115-131 et 190-211.....	67
b - Effet anti-fécondité des peptides N et C terminaux.....	67
c - Peptides reconnus par les anticorps inhibant l'activité enzymatique.....	68
VI - CONCLUSION.....	69

RESULTATS EXPERIMENTAUX

MELANGES DE PEPTIDES OBTENUS PAR SYNTHÈSE COMBINATOIRE : UTILISATION COMME ANTIGÈNE DANS LES TESTS SERODIAGNOSTICS70

A - INTRODUCTION70

B - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.....71

I - STRATÉGIE ET CONCEPTION DES PEPTIDES71

1 - Stratégie71

2 - Synthèse peptidique en phase solide.....75

a - Synthèse des peptides 190-211 et 115-131.....75

b - Synthèse des lipopeptides 190-211 et 115-13175

c - Synthèse combinatoire.....76

3 - Déprotection77

a - Déprotection des peptides et des lipopeptides77

b - Déprotection des mélanges combinatoires.....	78
4 - Purification	78
a - Purification des peptides	78
b - Purification des lipopeptides.....	79
5 - Caractérisation.....	79
II - MATERIELS ET METHODES.....	80
1 - Réactifs utilisés.....	80
2 - Synthèses.....	80
a - Formation d'une résine MBHA-lysine-palmitoyl.....	80
b - Synthèse classique en phase solide	81
c - Synthèse des mélanges combinatoires	81
3 - Déprotections.....	82
a - Déprotection des histidines-(2,4) dinitrophényle	82
b - Coupure HF.....	82
4 - Purification	83
a - Purification des peptides	84
b - Purification des lipopeptides.....	84
5 - Caractérisation.....	84
a - CLHP analytique en phase inverse	84
b - Spectrométrie de masse.....	85
c - Analyse d'acides aminés.....	85
III - RESULTATS.....	85
1 - CLHP préparative en phase inverse.....	85
2 - CLHP analytique en phase inverse.....	87
3 - Spectrométrie de masse.....	88
4 - Analyse d'acides aminés.....	90
C - ETUDES IMMUNOLOGIQUES	92
I - MATERIEL ET METHODES.....	92
1- Matériel utilisé.....	92
a - Animaux.....	92
b - Sérums humains	92
c - Réactifs.....	92
2 - Protocoles d'immunisation	93
a - Immunisation sous-cutanée	93
b - Hyper-immunisation de lapins.....	93
3 - Infestations.....	94
4 - Prélèvement des sérums.....	94
5 - Test ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay)	94
6 - Electrophorèse en polyacrylamide/SDS et Western blot.....	95
a - Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	95
b - Immunoélectrotransfert.....	96
c - Coloration des gels au bleu de Coomassie.....	97
d - Coloration des gels au nitrate d'argent.....	97

II - RESULTATS	98
1 - Résultats obtenus avec des animaux immunisés	98
a - Sérums de souris.....	98
b - Sérums de rats	100
2 - Résultats obtenus avec des animaux infestés.....	102
a - Sérums de souris.....	102
b - Sérums de rats	103
3 - Résultats obtenus avec des sérums humains.....	105
4 - Mesures d'avidités	107
a - Principe de l'élution au thiocyanate.....	107
b - Résultats avec des sérums de rats immunisés	109
c - Résultats avec des sérums de rats infestés par Schistosoma mansoni.....	110
d - Résultats avec des sérums d'individus infestés par Schistosoma mansoni.....	111
5 - Western blot	112
<i>D - DISCUSSION</i>	113
<i>E - CONCLUSION</i>	116
MELANGES DE PEPTIDES OBTENUS PAR SYNTHESE COMBINATOIRE : UTILISATION COMME IMMUNOGENES EN VACCINOLOGIE	117
<i>A - INTRODUCTION</i>	117
<i>B - SYNTHESE PEPTIDIQUE</i>	118
I - STRATEGIE ET CONCEPTION DES PEPTIDES.....	118
1 - Stratégie	118
2 - Synthèse peptidique en phase solide.....	121
II - MATERIEL ET METHODES	122
1 - Réactifs utilisés.....	122
2 - Synthèse des mélanges combinatoires.....	122
III - RESULTATS.....	123
1 - Analyse d'acides aminés des mélanges dérivés du peptide 115-131.....	123
2 - Analyse d'acides aminés des mélanges dérivés du peptide 190-211.....	124

C - ETUDES IMMUNOLOGIQUES	127
I - INTRODUCTION.....	127
II - MATERIEL ET METHODES	127
1 - Matériel utilisé.....	127
a - Réactifs.....	127
b - Animaux	128
2 - Protocole d'immunisation.....	128
3 - Récupération des sérums.....	128
4 - Test ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay)	129
5 - Tests de prolifération cellulaire.....	129
a - Stimulation in vitro des splénocytes	129
b - Quantification de la prolifération cellulaire.....	130
III - RESULTATS.....	131
1 - Cytotoxicité des lipopeptides pour les cellules en culture.....	131
2 - Etudes avec des souris non syngéniques.....	131
a - Utilisation des mélanges combinatoires dérivés du peptide 115-131.....	131
b - Utilisation des mélanges combinatoires dérivés du peptide 190-211.....	133
3 - Etudes avec des souris syngéniques : études avec les mélanges dérivés du peptide 190-211	135
a - Choix d'une souche mauvaise répondeuse	135
α - Etude de la réponse cellulaire	136
β - Etude de la réponse humorale	137
b - Résultats obtenus avec des souris CBA	138
α - Etude de la réponse cellulaire	138
β - Etude de la réponse humorale	139
c - Etude du mélange B	140
D - DISCUSSION	142
E - CONCLUSION	144
UTILISATION DE PEPTIDES MODIFIES EN VACCINATION PAR VOIE ORALE	145
A - INTRODUCTION	145
B - MATERIEL ET METHODES	147
1 - Réactifs utilisés en synthèse peptidique.....	147
2 - Matériel utilisé en immunologie.....	147
a - Réactifs.....	147

b - Animaux	148
3 - Synthèse peptidique	148
4 - Broyage des peptidyl-résines.....	148
5 - Immunisations.....	148
a - Immunisation par voie orale	148
α - Immunisation par intubation.....	148
β - Ingestion dans du lait	149
b - Immunisation sous-cutanée.....	149
c - Immunisation intra-péritonéale.....	149
6 - Infestations.....	149
7 - Prélèvements des sérums	150
8 - Prélèvements des liquides intestinaux	150
9 - Tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	151
C - SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.....	152
I - STRATEGIE ET CONCEPTION DES PEPTIDES.....	152
1 - Stratégie	152
2 - Synthèse peptidique	154
II - RESULTATS.....	155
1 - Résultats obtenus avec le lipopeptide 190-211 modifié sur son extrémité amino-terminale	155
a - CLHP en phase inverse préparative	155
b - CLHP en phase inverse analytique	156
c - Spectrométrie de masse	157
d - Analyse d'acides aminés.....	157
2 - Résultats obtenus avec les peptidyl-résines	158
D - RESULTATS DES ETUDES IMMUNOLOGIQUES.....	159
I - TESTS DE PROTECTION	159
1 - Résultats obtenus par immunisation intrapéritonéale.....	160
2 - Résultats obtenus par immunisation sous-cutanée.....	160
II - GAVAGES PAR INTUBATION : DOSE 1.....	160
1 - Résultats obtenus avec le peptide 190-211 libre.....	161
2 - Résultats obtenus avec le lipopeptide libre.....	162
3 - Résultats obtenus avec la peptidyl-résine.....	163
4 - Résultats obtenus avec la lipopeptidyl-résine	164
5 - Récapitulatif des résultats obtenus avec la dose 1.....	165
III - GAVAGES PAR INTUBATION : DOSE 2	166
1 - Résultats obtenus avec le peptide 190-211 libre.....	166
2 - Résultats obtenus avec le lipopeptide libre.....	167
3 - Résultats obtenus avec la peptidyl-résine.....	168
4 - Résultats obtenus avec la lipopeptidyl-résine	169

5 - Récapitulatif des résultats obtenus avec la dose 2.....	170
IV - GAVAGES DANS DU LAIT	171
1 - Résultats obtenus avec la peptidyl-résine 190-211	171
2 - Résultats obtenus avec la lipopeptidyl-résine	172
E - DISCUSSION	174
F - CONCLUSION.....	177
CONCLUSION GENERALE.....	178
ABREVIATIONS.....	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	183

