

**UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

**Étude et développement de méthodes pour la production et la  
détection d'anticorps anti-peptides**

**par**

**Pierre Dagenais**

**Département de Pharmacologie**

**Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
philosophiae doctor (Ph.D.)**

**Janvier 1994**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street  
Ottawa, Ontario  
K1A 0N4

Bibliothèque nationale  
du Canada

Direction des acquisitions et  
des services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa (Ontario)  
K1A 0N4

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

**The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.**

**L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.**

**The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

ISBN 0-315-93023-3

**Canada**

A Chantal, Stéphanie, et à toute ma famille et  
belle-famille qui me permettent de vivre  
heureux.

## TABLE DES MATIERES

Table des matières	I
Liste des illustrations	VIII
Liste des tableaux	XIII
Liste des abréviations	XV
Résumé	

### INTRODUCTION:

I- Effet de l'introduction d'acides aminés pseudo-lipidiques sur la capacité immunogénique des peptides synthétiques	1
1. Les porteurs	2
2. Les adjuvants	3
3. Méthodes alternatives pour augmenter l'effet immunogénique des peptides	5
3.1 Les liposomes	5
3.2 Les "pieuvres" peptidiques	6
3.3 Les dérivés de la paroi cellulaire bactérienne	7
3.3.1 Les lipopolysaccharides	7
3.3.2 Le muramyl dipeptide	7
3.3.3 Lipoprotéines et lipopeptides	8
4. Effets de chaînes lipidiques sur la capacité immunogénique des antigènes protéiques	9
5. Objectifs	11

5.1 Peptides modèles	13
5.1.1 L'angiotensine II	13
5.1.2 Épitope de la protéine P-28 de <i>Schistosoma mansoni</i>	14
<b>II- Développement d'une méthode de liaison covalente des peptides synthétiques aux surfaces de polystyrène utilisées pour les essais ELISA</b>	
1. Essais ELISA	15
2. Méthodes de liaison covalente des antigènes	16
3. Objectifs	17
<b>III-Anticorps anti-angiotensine II réagissant avec des analogues non-peptidiques de l'angiotensine II: récepteur modèle de l'hormone</b>	18
1. L'angiotensine II et ces récepteurs	18
2. Les antagonistes non-peptidiques des récepteurs de l'angiotensine II	19
3. Objectifs	20
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES:</b>	
<b>I- Propriétés immunogéniques des peptides à longues chaînes aliphatiques</b>	
1. Synthèse d'acides aminés avec chaînes pseudo-lipidiques	22
1.1 Production de bis-O <sub>1</sub> O-octadécyl-dopa	22
1.2 Synthèses d'autres acides aminés pseudo-lipidiques	25

2.	Synthèse et purification des peptides	27
2.1	Liste des peptides utilisés	27
2.2	Clivage des peptides de la résine	29
2.3	Purification des peptides dérivés de la protéine rSm-28 GST du Schistosome	29
2.4	Analyse de la pureté des peptides	30
3.	Identification des peptides	31
4.	Marquages des peptides [Sar <sup>1</sup> ]Ang II et [Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II à l'iode 125	33
5.	Conjugaison peptides-protéines porteuses	
5.1	Méthode de couplage à la glutaraldéhyde	34
5.2	Couplage au disuccinimidyl subérate	35
5.3	Couplage au chlorhydrate de 1-éthyl-3(3-diméthyl- aminopropyl) carbodiimide (EDC)	36
5.4	Couplage à la maléimide succinimide caproïque	39
5.5	Couplage à l'hexafluorophosphate benzotriazolyl N- oxytrisdiméthyl aminophosphonium (BOP)	40
5.6	Evaluation du taux de liaison des peptides aux protéines	42
5.7	Dosages de protéines	42
6.	Immunisations	
6.1	Préparation de l'antigène	44
6.2	Injections	44
6.3	Prélèvements sanguins	45
7.	Essai ELISA	45
8.	Essai RIA	47
II-	Liaison covalente des peptides aux plaques ELISA	
1.	Synthèse et purification des peptides	

1.1 Peptides utilisés pour évaluer la méthode de liaison covalente	48
1.2 Provenance ou synthèse des peptides	49
1.3 Purification des peptides	49
2. Irradiation et activation des plaques de polystyrène	50
3. Évaluation de la liaison covalente	51
4. Essai ELISA avec des peptides liés de façon covalente à du polystyrène	51
 III-Reconnaissance croisée des antagonistes non-peptidiques de l'angiotensine II par des anticorps anti-angiotensine II	
1. ELISA de compétition	52
2. Provenance ou synthèse des substances utilisées	54
 RÉSULTATS:	
I- Propriétés immunogéniques des peptides à longues chaînes aliphatiques	
1. Premières observations	
1.1 Solubilité des antigènes	55
1.2 Effets nocifs des adjuvants de Freund	55
2. Dosages des anticorps anti-angiotensine II	
2.1 Spécificité de l'ELISA	55
2.2 Détermination de la concentration sérique d'IgG	61
2.3 Détermination de la concentration sérique d'IgM	64
2.4 Dosage des anticorps anti-angiotensine II avec la [Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II-glutaraldéhyde-KLH	67
2.5 Utilisation d'autres antigènes pour le dosage des	

anticorps anti-angiotensine II	67
2.6 Dosage des anticorps par RIA	67
3. Production d'anticorps anti-peptide 115-131 de la protéine rSm-28 GST de <i>Schistosoma mansoni</i>	
3.1 Spécificité de l'ELISA avec Sch-KLH	70
3.2 Détermination de la concentration sérique des IgG anti-Sch	72
3.3 Détermination de la concentration sérique des IgM anti-Sch	72
3.4 Reconnaissances des peptides Sch par les anticorps anti-Sch	75
4. Dosage des anticorps anti-protéines porteuses	75
<b>II- Liaison covalente des peptides aux plaques ELISA</b>	
1. Évaluation quantitative de la liaison des peptides au polystyrène	78
2. Effet du temps d'irradiation	80
3. Concentration du peptide	83
4. Effet du pH	83
5. Essai ELISA	87
5.1 Réutilisation des plaques ELISA	89
5.2 Spécificité des essais ELISA avec peptides liés de façon covalente	93
5.3 Utilisation de la méthode de liaison covalente pour les tests de dépistage	93
5.4 Dosage ELISA d'anticorps anti-angiotensine II avec la méthode de liaison covalente	96
<b>III-Reconnaissance croisée des antagonistes non-</b>	

peptidiques de l'angiotensine II par des anticorps anti-angiotensine II	100
DISCUSSION:	
I- Propriétés immunogéniques des peptides à longues chaînes aliphatiques	109
1. ELISA: spécificité	110
2. Dosage des anticorps sériques	112
3. Évaluation de l'affinité des anticorps	113
4. Efficacité des porteurs protéiques pour la production d'anticorps anti-peptides	113
4.1 Anticorps anti-angiotensine II	114
4.2 Anticorps anti-Sch	118
5. La pieuvre peptidique ou MAPS	119
5.1 Anticorps anti-angiotensine II	120
5.2 Anticorps anti-Sch	120
5.3 Utilisation du MAPS pour la détection d'anticorps spécifiques	121
6. Propriétés immunogéniques des peptides à longues chaînes aliphatiques	123
6.1 Synthèses des acides aminés pseudo-lipidiques	123
6.2 Incorporation d'acides aminés pseudo-lipidiques dans des peptides synthétiques	125
7. Méthodes prometteuses pour les vaccins synthétiques	128
II- Liaison covalente des peptides aux plaques ELISA	130
1. Effets des radiations	131

2. Effet de l'activation avec DCC/NHS	133
3. Sites de liaison disponibles sur la plaque	135
4. Effet du pH	135
5. Utilisation de la méthode de liaison covalente pour les essais ELISA	136
5.1 Réutilisation des plaques	137
5.2 Utilisation de la méthode de liaison covalente pour le dosage d'anticorps sériques	137
5.2.1 Anticorps anti-toxoplasmose	137
5.3 Anticorps anti-angiotensine II	138
III-Anticorps anti-angiotensine II réagissant avec les antagonistes non-peptidiques des récepteurs AT <sub>1</sub> de l'angiotensine II: récepteur modèle de l'hormone	140
CONCLUSION:	145
REMERCIEMENTS:	147
BIBLIOGRAPHIE:	148
ANNEXES:	168

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Fig.1	Ajout d'un groupement Boc à la fonction amine de la L-Dopa.	22
Fig.2	Réaction de Williamson : alkylation	24
Fig.3	Production de tétradécylglycine	26
Fig.4	Production de O-octadécyl-tyrosine	26
Fig.5	Conjugaison à la glutaraldéhyde	35
Fig.6	Conjugaison au disuccinimidyl suberate	36
Fig.7	Conjugaison à la 1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	38
Fig.8	Conjugaison à la maléimide succinimide caproïque	40
Fig.9	Conjugaison à l'hexafluorophosphate benzotriazolyl N-oxytrisdiméthyl aminophosphonium	41
Fig.10	Essai ELISA réalisé en utilisant la [Sar <sup>1</sup> ]Ang II-décylamine pour la détection d'anticorps anti-Ang II	57
Fig.11	Liaison comparative des anticorps mesurée par essais ELISA en présence et en absence d'antigène ([Sar <sup>1</sup> ]Ang II-décylamine)	58
Fig.12	Spécificité de détection des anticorps anti-angiotensine II mesurée par essais ELISA en utilisant la [Sar <sup>1</sup> ]Ang II-KLH	60

Fig.13	Titre ELISA correspondant aux anticorps de type IgG anti-angiotensine II évalué après le 2 <sup>e</sup> rappel d'immunisation	62
Fig.14	Évaluation par essais ELISA de la production d'anticorps anti-angiotensine II de type IgG chez des souris immunisées avec la [Sar <sup>1</sup> ]Ang II-BSA	63
Fig.15	Évolution individuelle de la production d'anticorps anti-angiotensine II de type IgG chez des souris immunisées avec la [Sar <sup>1</sup> ]Ang II-BSA	65
Fig.16	Titre en anticorps anti-angiotensine II de type IgM évalué par essais ELISA après le deuxième rappel d'immunisation	66
Fig.17	Courbe de compétition de la <sup>125</sup> I-[Sar <sup>1</sup> ]Ang II par de la [Sar <sup>1</sup> ]Ang II avec le sérum provenant de la souris #1 immunisée avec la [Sar <sup>1</sup> ]Ang II-BSA	68
Fig.18	Courbe de compétition de la <sup>125</sup> I-[Sar <sup>1</sup> ]Ang II par de la [Sar <sup>1</sup> ]Ang II avec le sérum provenant de la souris #4 immunisée avec la [Sar <sup>1</sup> ]Ang II-BSA	69
Fig.19	Spécificité de détection des anticorps anti-Sch mesurée par essais ELISA en utilisant la Sch-KLH	71
Fig.20	Titre en anticorps anti-Sch de type IgG évalué par ELISA après le 5 <sup>e</sup> rappel d'immunisation	73
Fig.21	Titre en anticorps anti-Sch de type IgM évalué par ELISA	74
Fig.22	Reconnaissance croisée des peptides Sch par des anticorps anti-Sch produit à l'aide de la Sch-ovalbumine	76

Fig.23	Évaluation de la production d'anticorps anti-protéines porteuses	77
Fig.24	Effets des radiations et de l'activation de plaques de polystyrène Dynatech sur la liaison de la $^{125}\text{I}$ -[Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II	79
Fig.25	Effets des radiations et de l'activation de plaques de polystyrène Maxisorp (Nunc) sur la liaison de la $^{125}\text{I}$ -[Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II	81
Fig.26	Effets du temps d'irradiation du polystyrène sur la liaison de la $^{125}\text{I}$ -[Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II	82
Fig.27	Effets de la concentration de peptide ajouté sur la liaison aux plaques Dynatech irradiées et activées	84
Fig.28	Effets de la concentration de N,N'-dicyclohexyl carbodiimide et de N-hydroxysuccinimide sur la liaison de la [Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II au polystyrène	85
Fig.29	Effets du pH sur la liaison covalente de la $^{125}\text{I}$ -[Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II au polystyrène	86
Fig.30	Effets de la taille des peptides sur leur reconnaissance antigénique mesurée par essais ELISA lorsqu'ils sont liés de façon covalente vs une méthode de liaison par adsorption	88
Fig.31	Effet de la taille des peptides sur leur reconnaissance antigénique suite à une réutilisation des plaques ELISA	90
Fig.32	Reconnaissance antigénique mesurée par essais ELISA de peptides liés de façon covalente au	

	polystyrène avant et après le lavage des plaques avec du SDS	91
Fig.33	Effet de la taille des peptides sur leur reconnaissance antigénique lorsqu'ils sont liés de façon covalente vs par adsorption au polystyrène, suite à une réutilisation des plaques ELISA	92
Fig.34	Spécificité de liaison des anticorps anti-CGRP aux peptides liés de façon covalente aux plaques ELISA	94
Fig.35	Effet de la liaison covalente de l'antigène peptidique aux plaques ELISA sur le dosage d'anticorps anti-toxoplasmose chez la souris	95
Fig.36	Essai de dosage d'anticorps anti-angiotensine II à l'aide de la [Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II liée de façon covalente aux plaques ELISA	97
Fig.37	Dosage d'anticorps anti-angiotensine II dans des séra de souris injectées avec la BSA	98
Fig.38	Spécificité des dosages d'anticorps anti-angiotensine II avec l'antigène lié de façon covalente aux plaques ELISA	99
Fig.39	Réactivité croisée d'anticorps anti-angiotensine II	102
Fig.40	Réactivités croisées des anticorps anti-angiotensine II avec des analogues non-peptidiques de l'angiotensine II	103

Fig.41	Réactivité croisée des anticorps anti-angiotensine II du sérum de la souris #6 avec des analogues non-peptidiques de l'angiotensine II	105
Fig.42	Courbe d'inhibition des complexes immuns anti-angiotensine II avec le sérum de la souris #6 testé par ELISA de compétition	106
Fig.43	ELISA de compétition avec des séra témoins	108

## LISTE DES TABLEAUX

Tab.I	Caractérisation par CCM du Boc-L-Dopa	23
Tab.II	Caractérisation par CCM du Boc-Bis-O <sub>1</sub> O-octadécyl-dopa	25
Tab.III	Structure primaire des peptides de la famille angiotensine II utilisés	27
Tab.IV	Structure primaire des peptides de la famille Schistosome utilisés	28
Tab.V	Analyse HPLC des peptides dérivés du Schistosome	31
Tab.VI	Analyse d'acides aminés des peptides dérivés de l'antigène rSm-28 GST du Schistosome	32
Tab.VII	Analyse d'acides aminés du peptide [(Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> )Ang II] <sub>4</sub> ,(Lys <sup>9</sup> ) <sub>2</sub> ,Lys <sup>10</sup> ,Tdg <sup>11</sup> ,Gly <sup>12</sup> ou Ang II-tétramère	33
Tab.VIII	Efficacité des réactions de couplages peptides-protéines effectuées	43
Tab.IX	Peptides utilisés pour évaluer la méthode de liaison covalente	48
Tab.X	Antigènes utilisés pour la production et la détection d'anticorps anti-angiotensine II	53
Tab.XI	Substances utilisés pour tenter d'inhiber la liaison des anticorps anti-angiotensine II	54

Tab.XII Pourcentage de Liaison d'analogues de  
l'angiotensine II au polystyrène irradié et activé. 87

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- A : alanine  
Aca: acide aminocaproïque  
AcOH : acide acétique  
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire  
AIP : angiotensin inhibiting peptide  
AID : épitope du virus du SIDA  
Ang II : angiotensine II  
APC: cellules présentatrices d'antigènes  
Boc: butyl-pyrocarbonate  
BSA : albumine de sérum bovin  
C : cystéine  
CCM : chromatographie sur couche mince  
CGRP : calcitonin gene related peptide  
CP-96,345 : (2S,3S)-cis-2-(diphenylmethyl)-N-((2-methoxyphenyl)methyl)-1-azabicyclo [2.2.2] octan-3-amine  
D : acide aspartique  
DCC : dicyclohexylcarbodiimide  
DMF : N,N-diméthyl formamide  
DMSO : diméthyl sulfoxyde  
D. O. : densité optique  
Dopa: 3,4-dihydroxy-phenylalanine  
DSS : disuccinimidyl suberate  
Dup 532 : 2-propyl-4-pentafluoroethyl-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl) methyl] imidazole-5-acide carboxylique  
Dup 753 : 2n-butyl-4-chloro-5-hydroxymethyl-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl) methyl] imidazole, sel de potassium  
E : acide glutamique  
EDC : éthyl diméthylaminopropyl carbodiimide  
ELISA : "enzyme linked immunosorbent assay"  
Exp 3174 : 2n-butyl-4-chloro-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl) methyl] imidazole-5-acide carboxylique  
F : phénylalanine  
FCA : adjuvant complet de Freund

FIA : adjuvant incomplet de Freund  
G : glycine  
H : histidine  
HPLC : chromatographie liquide à haute pression  
HR : hypersensibilité retardé  
HSA : albumine de sérum humain  
I : isoleucine  
i.d.: intra-dermale  
Ig : immunoglobuline  
i.p.: intra-péritonéale  
K : lysine  
KLH : hémocyanine de patelle  
L : leucine  
L-158,809 : 5,7-dimethyl-2 ethyl-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)[1,1']-  
biphenyl-4-yl]-methyl]-3H-imidazo [4,5-b] pyridine  
LPS : lipopolysaccharide  
M : méthionine  
MAPS : "multiple antigene peptide system"  
MBSA: BSA traité à la maléimide  
MHC: complexe majeur d'histocompatibilité  
MDP : muramyl dipeptide  
Mr : masse relative  
N : asparagine  
NHS : N-hydroxysuccinimide  
OVA : ovalbumine  
P : proline  
Pam : palmitoyl  
PBS : tampon phosphate salin  
PS : polystyrène  
PVC : chlorure de polyvinyl  
Q : glutamine  
R : arginine  
RAS : système rénine-angiotensine  
RIA : radioimmunoétalonnage  
S : serine  
Sar: sarcosine

s.c.: sous-cutané  
Sch : schistosome  
SDS : sodium dodécyl sulphate  
T : thréonine  
Tdg : tétradécylglycine  
TFA : acide trifluoroacétique  
V : valine  
W : tryptophan  
Y : tyrosine

## RÉSUMÉ

La première partie de la thèse porte sur l'étude de l'effet immunogène de l'introduction d'acides aminés pseudo-lipidiques (liés à de longues chaînes aliphatiques) dans des peptides synthétiques.

Des chaînes lipophiles de 14 et de 18 carbones ont été liées à certains acides aminés, lesquels ont ensuite été incorporés à deux peptides modèles, soit l'angiotensine II et un épitope du parasite *Schistosoma mansoni*. Les peptides conjugués aux chaînes aliphatiques ont ensuite été injectés à des souris BALB/c et la production d'anticorps polyclonaux spécifiques a été évaluée par ELISA et confirmée par RIA. Cette production d'anticorps a été comparée à celle induite par les peptides conjugués à des porteurs protéiques, aux peptides non conjugués, et à des tétramères de ces mêmes peptides liés à un réseau de lysines (MAPS).

Seuls les conjugués protéiques se sont avérés efficaces dans notre étude pour induire un haut taux d'anticorps spécifiques aux peptides. Les peptides avec acides aminés pseudo-lipidiques et les tétramères peptidiques ont également été inefficaces lorsqu'utilisés pour la détection d'anticorps en ELISA.

Des études ont déjà rapporté l'excellent rendement du MAPS pour la production et la détection des anticorps, mais il semble que des difficultés soit reliées à la production de ces composés. L'analyse par spectrophotométrie de masse nous a effectivement révélé une grande hétérogénéité des produits finaux.

La possibilité de produire des immunogènes peptidiques dont la structure peut être modifiée à volonté par l'incorporation d'acides aminés à fonctions pseudo-lipidiques est d'un grand intérêt, mais étant donné les difficultés de purification de ces composés, leurs inefficacités apparentes dans cette étude, et l'existence de nouvelles méthodes de production d'anticorps anti-peptides très efficaces, nous ne pouvons suggérer la conjugaison de chaînes aliphatiques aux haptènes peptidiques comme étant la façon la plus efficace pour produire des anticorps anti-peptides.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de développer une méthode permettant de lier des petits peptides synthétiques de façon covalente sur les plaques ELISA de polystyrène. Ce projet avait pour but premier de produire un nouvel outil de travail pour notre projet principal en facilitant la liaison de courts peptides tels que l'Ang II aux plaques ELISA.

Des plaques de polystyrènes ont d'abord été soumises à différentes doses de radiation gamma, puis ces dernières ont été activées chimiquement avec du N, N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en combinaison avec du N-hydroxysuccinimide (NHS), avant d'être incubées avec le peptide dans une solution aqueuse. Le taux de liaison du peptide a été évalué avec de l'<sup>125</sup>I-angiotensine II et la nature covalente du lien formé a été vérifié par des lavages au SDS 5% aqueux. L'irradiation des plaques provoque une augmentation de la liaison totale du peptide mais non de sa liaison covalente. Le traitement au DCC/NHS correspond à l'étape cruciale pour permettre la liaison covalente du peptide. Les deux traitements exécutés simultanément ont un effet synergique sur la liaison covalente et totale du peptide. Le degré supérieur de liaison obtenu avec la [Lys<sup>8</sup>]Ang II par rapport à la [Phe<sup>8</sup>]Ang II suggère que le peptide est lié par ses fonctions amines libres, à des fonctions carboxyliques présentes à la surface du polystyrène, et activées par le DCC/NHS.

Des essais ELISA effectués avec le CGRP et des fragments de ce peptide ont permis de montrer que les peptides liés de façon covalente peuvent être très bien reconnus par des anticorps spécifiques, et que la liaison covalente permet d'augmenter la reconnaissance des peptides les plus courts. Les plaques ELISA sur lesquelles l'antigène a été lié sont de plus réutilisables, et peuvent être conservées plusieurs mois à la température ambiante.

Cette méthode s'est toutefois avérée inefficace pour déceler des anticorps anti-angiotensine II, et un taux élevé de liaison non spécifique a été observé pour ce peptide avec certains séra hyperimmuns; mais étant donné les nombreux avantages de cette méthode de liaison, elle pourrait devenir intéressante dans le développement de nouvelles trousse diagnostiques.

Étant donné la disponibilité des nombreux séra positifs anti-angiotensine II (Ang II) que nous avons produits, et l'accessibilité de nouveaux analogues non-peptidiques de l'Ang II au laboratoire, nous avons développé un second sous-projet dont le but était de concevoir un récepteur modèle pour l'Ang II à partir des anticorps anti-Ang II. Cette étude a donc porté sur les interactions retrouvées entre des anticorps anti-Ang II et différents antagonistes ou analogues non-peptidiques de l'hormone.

Nous avons entrepris une étude de criblage, par ELISA de compétition, d'une série de séra polyclonaux anti-Ang II avec différents agonistes et antagonistes peptidiques et non-peptidiques de l'Ang II. Aucune réaction croisée n'a été observée avec différentes substances non reliées à l'Ang II (témoin) et avec des

analogues non-peptidiques AT<sub>2</sub>. La grande majorité des séra réagissent spécifiquement avec le plus puissant antagoniste non-peptidique AT<sub>1</sub> utilisé, le L-158,809 (5,7-diméthyl-2-éthyl-3-[[2'-(1H-tétrazol-5yl)][1,1']-biphényl-4-yl]-méthyl-3H imidazo [4,5b] pyridine. L'un des 8 sérum examiné reconnaît l'ensemble des antagonistes non-peptidiques AT<sub>1</sub>. Ces interactions sont observées peu importe que l'Ang II soit présenté par l'une ou l'autre de ses extrémités en ELISA, ce qui suggère que le site de liaison de ces anticorps se situe au centre de la molécule. L'affinité des anticorps anti-Ang II pour les antagonistes non-peptidiques est nettement inférieure à celle observée pour l'agoniste [Sar<sup>1</sup>]Ang II : 3-4 mM vs 10 pM, mais similaire à l'affinité retrouvée pour les antagonistes peptidiques saralazine et [Sar<sup>1</sup>,Phe(Br<sub>5</sub>)<sup>8</sup>]Ang II : 0.5 mM.

Ces résultats démontrent qu'il existe une homologie structurale entre les antagonistes non-peptidiques AT<sub>1</sub> et l'Ang II, et qu'il est possible de trouver des anticorps anti-Ang II capables d'imiter la structure de reconnaissance d'un récepteur de l'Ang II. De tels anticorps pourraient devenir des outils importants pour la conception de nouveaux ligands hormonaux.

## INTRODUCTION

### I- Effet de l'introduction d'acides aminés pseudo-lipidiques sur la capacité immunogénique des peptides synthétiques.

Depuis son avènement, la vaccination animale et humaine a été réalisée soit à l'aide d'injection d'organismes pathogènes (bactéries, virus, parasites, etc.) tués ou atténués, ou encore par immunisation avec une partie antigénique de cet organisme (protéines de la paroi cellulaire bactérienne, toxine, etc.). L'utilisation de vaccins classiques comporte toutefois divers inconvénients. En effet, la sécurité des vaccins fabriqués avec des virus tués ou atténués n'est pas inconditionnellement garantie. La production de ces vaccins nécessite une très grande quantité de matériel organique, ce qui peut s'avérer un processus de fabrication coûteux. La capacité de certains organismes pathogènes à modifier continuellement leurs déterminants antigéniques nécessite une création plus rapide de nouveaux vaccins (Van Regenmortel et al., 1988).

Une des alternatives prometteuses à la vaccination classique est le développement récent des vaccins synthétiques. Parmi ceux-ci on retrouve les vaccins produits à l'aide de protéines recombinantes et les vaccins composés de peptides synthétiques (Van Regenmortel et al. 1988).

Anderer et Schlumberger (1965) ont été les premiers à démontrer l'efficacité de l'immunisation avec un peptide synthétique (protection contre le virus de la mosaïque du tabac). Plusieurs vaccins à base de peptides synthétiques ont depuis lors été développés et testés pour l'immunisation animale et humaine (Van Regenmortel et al., 1988). Ces vaccins ont pour avantage d'avoir une structure chimique définie et de pouvoir être produits en très grande quantité (Kg) (Arnon et al., 1983). Les peptides utilisés pour l'immunisation sont toutefois de faibles poids moléculaires (<5000

d) et ont des propriétés hapténiques (i.e. molécule pouvant interagir avec des anticorps spécifiques, mais incapable d'induire à elle-seule une réponse immunitaire lorsqu'injectée à un animal (Cooper et Wiley, 1977)). Ils doivent donc être habituellement conjugués à un porteur, et être injectés en présence d'un adjuvant d'immunisation pour obtenir une production d'anticorps sériques et/ou une réponse immune cellulaire. Le développement de nouveaux adjuvants et/ou de nouveaux porteurs est donc devenu un secteur de recherche crucial dans la mise au point de nouveaux vaccins synthétiques (Arnon et al., 1983; Nussberger et al., 1984).

## 1. Les porteurs

Les porteurs les plus utilisés sont de nature protéique. Alors qu'une grande variété de protéines sont utilisées pour l'immunisation animale (KLH, BSA, ovalbumine, thyroglobuline, etc.) (Briand et al., 1985; Wisdom, 1992), seule la toxine du tétanos est employée comme porteur dans les vaccins synthétiques humains (Okawa et al., 1992). Les porteurs sont nécessaires au développement d'une réponse immunitaire complète contre l'haptène car ils permettent une reconnaissance antigénique par les cellules présentatrices de l'antigène ainsi que par les lymphocytes T et B (Okawa et al., 1992). L'utilisation de protéines en tant que porteurs cause toutefois de nombreux problèmes. Par exemple, lors de la conjugaison de la protéine porteuse à l'haptène peptidique, la structure antigénique des composés peut être modifiée par la procédure de couplage, ce qui diminue l'efficacité immunogénique de l'antigène (Briand et al., 1985). De plus, selon l'agent de couplage utilisé, une quantité relativement élevée de produits de réaction secondaire, difficile à éliminer, peut contaminer la préparation antigénique (Van Regenmortel et al., 1988).

Très peu de protéines peuvent être utilisées comme porteurs chez l'humain dû à l'hétérogénéité des préparations protéiques et à la possibilité de réaction secondaire, par exemple de type allergique, pouvant être causée par une forte production d'anticorps contre la protéine porteuse. La toxine du tétanos a été établie comme étant

sécuritaire chez l'humain, et elle possède de bonnes propriétés immunogéniques (John et al., 1989). Un nouveau problème est toutefois apparu en relation à l'utilisation de cette protéine. Cette toxine est déjà fréquemment utilisée pour la vaccination classique contre le tétanos, et il a été récemment noté que lorsqu'un individu est déjà présensibilisé à une protéine, des tentatives d'immunisation subséquentes avec un haptène conjugué à cette même protéine peut conduire à une suppression de la réponse immune contre l'haptène (Jacob et al., 1985; Schutze et al., 1985; Sad et al., 1991). Ce phénomène appelé "effet porteur" a été observé chez des individus déjà préimmunisés contre le tétanos, que l'on a ensuite tenté de vacciner contre la malaria en utilisant la toxine du tétanos comme protéine porteuse de l'haptène synthétique (antigène de la malaria) (John et al., 1989).

## **2. Les adjuvants**

L'adjuvant d'immunisation peut être défini comme étant toute substance permettant d'augmenter la réponse immunitaire spécifique contre un antigène sans y être lié (i.e. contrairement au porteur protéique) (Baschang, 1989). Les adjuvants les plus utilisés sont les adjuvants complets et incomplets de Freund pour les animaux de laboratoires, et l'hydroxyde d'aluminium ( $Al(OH)_3$ ) pour la vaccination humaine et vétérinaire (Van Regenmortel et al., 1988). L'adjuvant incomplet de Freund (FIA) ainsi que d'autres types d'émulsions huile/eau sont aussi utilisés pour plusieurs microorganismes dans la vaccination vétérinaire (Claasen et al., 1992).

L'adjuvant complet de Freund (FCA) a été mis au point en 1942 par McDermott et Freund qui ont découvert que le bacille de la tuberculose tué et mélangé à une huile minérale et à un agent émulsifiant pouvait augmenter la réponse immunitaire lorsqu'injecté avec un antigène (Freund, 1951; Baschang, 1989). Le FCA est aujourd'hui composé de 8.5 parties d'huile minérale ou de paraffine, de 1.5 partie de mannide monooléate servant d'agent émulsifiant, et de 0.5 à 1.0 mg/ml de mycobactéries tuées (Broderson, 1989).

L'adjuvant incomplet a la même composition mais est dépourvu de mycobactéries. Les adjuvants de Freund sont employés sous forme d'émulsion avec une phase aqueuse contenant l'antigène d'immunisation. L'émulsion est de type "eau dans l'huile", c'est-à-dire que l'huile sert de phase continue et entoure les gouttelettes d'eau (phase discontinue) (Check et al., 1992). Le mécanisme d'action de l'adjuvant de Freund n'est pas encore parfaitement connu, mais on sait qu'il agit au moins de deux façons: soit en protégeant l'antigène d'une dégradation métabolique trop rapide, prolongeant ainsi son exposition au système immunitaire (les adjuvants de Freund forment des dépôts libérant lentement l'antigène); et les mycobactéries de l'adjuvant complet ont de plus pour effet d'attirer et d'activer de façon non spécifique les cellules impliquées dans la réponse immunitaire (Allison, 1979; Osebold, 1982; Johnston et al., 1991; Deeb et al., 1992; East, 1992).

Les adjuvants de Freund sont encore considérés par plusieurs comme étant les meilleurs immunostimulants connus (Hui et al., 1991; Johnston et al., 1991). Les nombreux effets secondaires provoqués surtout par l'adjuvant complet limitent toutefois son utilisation aux animaux de laboratoires, et incitent au développement de nouveaux adjuvants moins toxiques. Dû à la rétention à long terme des dépôts d'huile et à l'hyperstimulation lymphocytaire causée par les mycobactéries du FCA, les adjuvants de Freund provoquent des zones d'inflammations fortes et étendues chez l'animal injecté, pouvant conduire à la formation d'abcès, d'ulcères, de nécroses et de lésions chroniques (Broderson, 1989; Wiedemann et al., 1991; Johnston et al., 1991). Les mêmes effets ont aussi été retrouvés chez l'humain lors d'injections de FCA (Ogonuki et al., 1967; Murray, 1972).

Introduit en 1926, l'hydroxide d'aluminium est le plus utilisé chez l'humain et fait partie de plusieurs formulations de vaccins vétérinaires (Rickman et al., 1991; Hui et al., 1991; Nicklas, 1992). Bien qu'étant considéré sécuritaire, son utilisation peut parfois provoquer la formation de granulomes douloureux ou d'autres effets secondaires (Kellner et al. 1991; Nicklas, 1992). L'hydroxyde d'aluminium est très efficace dans les vaccins classiques composés

de l'organisme pathogène (Hui et al., 1991; Rickman et al., 1991), mais des quantités importantes de l'antigène sont nécessaires pour induire la réponse immune (Claasen et Boersma, 1992; Nicklas, 1992). Des tentatives de vaccination avec cet adjuvant ont démontré son inefficacité dans le cas des vaccins synthétiques (Ballou et al., 1987; Rickman et al., 1991). Le faible effet immunostimulateur observé avec les antigènes peptidiques serait dû au fait que l' $Al(OH)_3$  serait incapable d'induire seul une immunité cellulaire, malgré sa capacité à augmenter l'immunité humorale (Herrington et al., 1987; Patarroyo et al., 1988; Brewer et Alexander, 1992).

Le développement de stratégies alternatives aux porteurs d'haptènes et aux adjuvants actuellement utilisés est devenu le principal défi à surmonter pour la formulation clinique de vaccins synthétiques.

### **3. Méthodes alternatives pour augmenter l'effet immunogénique des peptides**

Plusieurs alternatives ont déjà été utilisées avec plus ou moins de succès pour tenter d'augmenter la réponse immunitaire dirigée contre des haptènes peptidiques. Des peptides ont été par exemple adsorbés à du charbon (Boyd et Peart, 1968), conjugués à des disques de papier ou à du nitrocellulose (Nilson et Larsson, 1992), couplés à leurs résines de synthèse (McLean et al., 1991), couplés à de l'Affigel (Vera et al., 1988), polymérisés (Jacob et al., 1985), ou cyclisés (Dreesman et al., 1982). Parmi ces méthodes certaines suscitent un vif d'intérêt.

#### **3.1 Les liposomes**

Les liposomes sont définis comme étant des sphères ou des vésicules faites de bicouches de phospholipides séparées par des compartiments aqueux (Warren et al., 1986). Des antigènes de nature peptidique ou autre peuvent être attachés en surface des vésicules, incorporés dans les espaces internes aqueux, ou reconstitués dans les membranes lipidiques (Metzger et al., 1991). Les liposomes

interagissent de façon naturelle avec les macrophages et peuvent même avoir dans certains cas un rôle semblable aux cellules présentatrices d'antigènes (Walden et al., 1985; Walden et al., 1986; Alving 1991). L'efficacité des liposomes en tant qu'adjuvants et/ou porteurs dans la vaccination animale et humaine a été démontrée (Allison et Gregoriadis, 1974; Uemera et al., 1974; Gregoriadis, 1990; Alving, 1991; etc.). Les liposomes ne faisant toutefois pas partie intégrante de mon projet de thèse, je n'élaborerai pas davantage sur ce sujet.

### **3.2 Les "pieuvres" peptidiques**

Tam et Posnett sont les instigateurs de cette méthode originale de présenter l'antigène peptidique au système immunitaire appelé MAPS pour "Multiple Antigen Peptide System" (Posnett et al., 1988). Le peptide est présenté sous forme de plusieurs copies attachées à une matrice dendritique de lysine branchée (une lysine est liée par ses fonctions aminées  $\alpha$  et  $\epsilon$  aux fonctions carboxyliques de deux autres lysines, qui peuvent ensuite en lier deux autres chacune par leur fonction amine, et ainsi de suite). Ainsi, 2, 4, 8, 16, etc. copies d'un peptide sont liés par la même extrémité à un noyau de lysine ressemblant à l'apparence d'une pieuvre. Il semblerait que les octamères peptidiques seraient les plus efficaces pour induire la réponse immunitaire (Tam, 1989). Cette méthode comporte certains avantages indéniables: 1- La synthèse de l'antigène peut être effectuée directement en phase solide, et ce dernier peut ensuite être utilisé tel quel sans besoin d'un couplage à un porteur. 2- Le noyau de lysine ne correspond qu'à une faible proportion de l'antigène total (5 à 20% du poids de l'antigène) et est constitué majoritairement de chaînes de carbones peu immunogènes (Lu et al., 1991), ce qui fait en sorte que la grande majorité des anticorps sont produits contre le peptide même, et ce contrairement aux antigènes peptidiques conventionnels conjugués à des porteurs protéiques. L'effet inducteur des octamères peptidiques sur la réponse immunitaire a été démontré lors d'immunisation chez l'animal (Posnett et al., 1988; Wolowczuk et al., 1991; Lu et al., 1991; Mclean

et al., 1991).

### **3.3 Les dérivés de la paroi cellulaire bactérienne**

Une des méthodes les plus étudiées ces dernières années demeure l'utilisation d'agents mitogènes dérivés de la paroi cellulaire bactérienne. Les lipopolysaccharides (LPS), le muramyl dipeptide (MDP), et les lipoprotéines ou lipopeptides des bactéries Gram négatif constituent trois classes majeures de substances mitogènes utilisées pour la fabrication de vaccins synthétiques (Baschang, 1989).

#### **3.3.1 Les lipopolysaccharides**

Le LPS est un activateur polyclonal des lymphocytes B et des macrophages (Bessler et al., 1985b; Wildemann et al., 1991). Sa partie mitogénique active a été isolée et constitue la fraction lipidique de la molécule, soit le lipide A. Le LPS et le lipide A ont déjà été évalués pour leur efficacité dans les vaccins synthétiques (Couthino et al., 1974), mais des effets pyrogéniques et de toxicité partielle limitent leurs utilisations (Wildemann et al., 1991). La toxicité du lipide A peut être diminuée en enlevant un groupement phosphate, ce qui produit le monophosphoryl lipide A dont l'efficacité a été démontrée lors de vaccinations d'animaux (Alving, 1991; Hui et al., 1991), et comme vaccin prophylactique chez l'humain (Gustafson et Rhodes, 1992). Une autre façon possible pour diminuer la toxicité du lipide A est de l'incorporer dans des liposomes (Alving et Richards, 1990; Fries et al., 1992).

#### **3.3.2 Le muramyl dipeptide**

Le MDP ou N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine est une molécule isolée d'un peptidoglycan, la muréine (Arnon et al., 1983). Il constitue la structure minimale capable de remplacer l'effet des mycobactéries du FCA (Ellouz et al., 1974). Le MDP et des dérivés du MDP ont été évalués en tant que porteurs et/ou adjuvant pour des

peptides synthétiques dans des vaccinations expérimentales (Arnon et al., 1980; Warren et al., 1986; Hui et al., 1991). Des effets de toxicité et de pyrogénicité sont cependant également associés à l'utilisation de ces molécules (Dinarello et Krueger, 1986).

### 3.3.3 Lipoprotéines et lipopeptides

Les lipoprotéines de bactéries telles que *Escherichia coli* sont aussi de bons activateurs des lymphocytes B (Bessler et Ottenbreit, 1977). Des analogues synthétiques correspondant à la partie N-terminale de ces lipoprotéines ont été produits. Ces analogues consistent en des lipopeptides formés de trois chaînes d'acides gras (acide palmitique de 16 carbones) liés à une courte séquence peptidique de 3 ou 4 acides aminés. Les lipopeptides tripalmitoyl-S-glycéril cystéinyl-séryl-sérine (Pam<sub>3</sub> Cys Ser Ser) et tripalmitoyl-S-glycéril cystéinyl-sérine (Pam<sub>3</sub> Cys Ser) se sont avérés très efficaces lorsqu'utilisés sous forme couplés à des peptides synthétiques pour induire une réponse immunitaire complète sans besoin d'autres porteurs et/ou adjuvants (Bessler et al., 1985a; Muller et al., 1989; Loleit et al., 1990; Wildemann et al., 1991; Metzger et al., 1991). Il semble que les lipopeptides soient dépourvus de tout effet toxique, n'aient pas d'effet pyrogène, et n'induisent aucun dommage tissulaire à long terme (Reitermann et al., 1989; Muller et al., 1989; Wildemann et al., 1991; Schild et al., 1991). En plus de l'activité mitogénique et activatrice sur les lymphocytes B (Bessler et al., 1985a), l'effet immunomodulateur des lipopeptides pourrait possiblement être aussi relié à la présence des chaînes lipidiques hydrophobes. Les lipides pourraient soit permettre une augmentation de la demi-vie de l'antigène *in vivo*, influencer sa distribution systémique, ou encore favoriser l'attachement de l'antigène à la membrane des cellules immunocompétentes (Deres et al., 1989; Bessler et al., 1985b; Schild et al., 1991). Bessler et coll. (1985b) ont toutefois aussi démontré que l'effet immunogène des lipopeptides dépendait beaucoup des quelques acides aminés dont ils sont composés.

Les études portant sur l'influence directe de chaînes lipidiques simples sur la capacité immunogène des antigènes protéiques sont plus rares. Les principales études seront résumées dans la section suivante.

#### **4. Effets de chaînes lipidiques sur la capacité immunogénique des antigènes protéiques**

Coon et Hunter (1973) ont observé que l'acide dodécanoïque conjuguée à la BSA peut induire une hypersensibilité retardée (HR) contre la protéine lorsqu'injectée chez le cobaye. Cette HR était de plus accompagnée d'une inhibition de la production d'anticorps contre la BSA. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'induction d'HR pouvait être due à la relocalisation systémique du conjugué protéine-lipide (Coon et Hunter, 1973). Ils ont observé, à l'aide de marqueurs radioactifs, que le conjugué BSA-acide dodécanoïque se localisait dans les aires thymo-dépendantes des ganglions lymphatiques, contrairement à la BSA qui était plutôt emprisonnée dans les centres germinaux des ganglions. L'inefficacité de la conjugaison acide gras-BSA pour produire des anticorps anti-BSA a été expliquée par l'interférence possible induite par les chaînes lipidiques, entre les sites antigéniques de la protéine et les sites de reconnaissance des lymphocytes B.

Dans le même genre d'étude, Heatley et Stark (1975) ont noté que l'acylation de l'albumine de sérum humain (HSA), également avec des chaînes lipidiques de 12 carbones, produisait une augmentation de la production d'anticorps anti-HSA chez le rat. Cette augmentation pouvait s'expliquer selon eux par une diminution de la vitesse d'élimination de l'antigène protéique, dû à la tendance du conjugué protéine-lipide à s'agréger et à adhérer aux cellules. Ils ont proposé qu'une acylation trop grande de la protéine, cachant ainsi les déterminants antigéniques, pouvait être la cause de l'inhibition de la production d'anticorps dans l'expérience de Coon et Hunter (Coon et Hunter, 1973, Heatley et Stark, 1975).

Singh et Leskowitz (1978) ont démontré que l'induction de l'HR par le conjugué BSA-lipide semblait davantage reliée à l'augmentation du temps d'élimination de la protéine modifiée plutôt qu'à sa relocalisation dans les tissus lymphatiques (Singh et Leskowitz, 1978). Ainsi malgré que la BSA couplée à la dodécylamine demeure au site d'injection et ne se localise pas dans les tissus lymphatiques, ce conjugué est moins rapidement éliminé que la BSA couplée à l'acide dodécanoïque, et a un effet supérieur sur l'HR (Singh et Leskowitz, 1978). L'effet stimulateur des lipides sur l'immunité cellulaire pourrait donc ressembler à l'effet d'un adjuvant classique, soit en augmentant la période de présentation de l'antigène au système immunitaire .

Stark et coll. (1980a) ont fait une étude détaillée de l'effet des différents types d'acylation possibles sur la production d'anticorps anti-HSA. Ils ont noté qu'en général plus il y a de lipides ajoutés à la protéine, plus il y a augmentation de la production d'anticorps contre cette protéine. Toutefois chez le rat, une fois dépassé un certain seuil d'acylation, le rapport degré d'acylation / production d'anticorps devient inversé (Stark et al., 1980a). Le même phénomène n'est pas observé chez la souris (Stark et al., 1980a). Les meilleures réponses humorales ont été obtenues en utilisant des chaînes aliphatiques de longueurs intermédiaires (10 à 14 carbones), les chaînes plus longues ayant possiblement un effet masquant sur les déterminants antigéniques de la protéine. Ces auteurs ont de plus noté que l'effet de l'acylation dépend également de la nature de la protéine. Par exemple, l'ajout d'une chaîne aliphatique à une protéine telle que la toxine de la diphtérie ne fait que diminuer la réponse humorale contre cette protéine (Stark et al., 1980).

La possibilité d'utiliser les acides gras pour augmenter la capacité immunogénique des peptides synthétiques a été décrite pour la première fois par Hopp (1984). Ce dernier coupla deux chaînes d'acide palmitique sur les fonctions amines  $\alpha$  et  $\epsilon$  d'un résidu lysine en position N-terminale d'un peptide de 16 acides aminés représentant un déterminant antigénique du virus de l'hépatite B. Il

obtient ainsi une meilleure production d'anticorps contre le virus qu'en utilisant le même peptide conjugué à la KLH. Il suggéra que l'efficacité du dipalmityl-lysyl-peptide pouvait être reliée à la formation des agrégats et des micelles qu'il pût mettre en évidence.

Jacob et coll. (1985) ont également obtenu une production d'anticorps spécifiques en utilisant le dipalmityl-lysyl couplé à des peptides, de 13 à 15 acides aminés, dérivés de la toxine du choléra. Même si la production d'anticorps était inférieure à celle obtenue avec les mêmes peptides conjugués à une protéine, il est intéressant de noter que les anticorps produits contre ces peptides étaient capables d'inhiber l'activité biologique de la toxine du choléra.

## **5. Objectifs**

Comme on a pu le constater dans cette partie de l'introduction, la nécessité de trouver des alternatives valables aux immunostimulants actuellement employés est essentielle au développement des vaccins synthétiques. Parmi les nombreuses méthodes présentées, l'une des plus intéressante, la conjugaison à de longues chaînes aliphatiques a été encore peu évaluée avec des peptides synthétiques. Pourtant les avantages inhérents à cette procédure d'immunisation sont évidents.

1. Il a été démontré dans plusieurs cas que les chaînes aliphatiques accentuent l'immunogénéicité des protéines. Cet effet peut être attribuable aux propriétés hydrophobes des lipides qui permettraient soit la formation de micelles ou d'agrégats (Stark et al., 1980a, Hopp,1984); à une augmentation de la liaison de l'antigène aux parois des membranes cellulaires (Singh et Leskowitz, 1978; Stark et al., 1980a); à une relocalisation systémique de l'antigène (Coon et Hunter, 1973; Stark et al., 1980a); ou à une diminution de sa vitesse d'élimination (Heatley et Stark, 1975; Singh et Leskowitz, 1978). Ces propriétés ont d'ailleurs été aussi attribuées à la partie lipidique des analogues lipopeptidiques dérivés des parois bactériennes (Bessler et al.,1985b; Deres et al., 1989; Schild et al.,

1991).

2. Sauf exception (Maneta-Peyret et al., 1992), il semble qu'aucun anticorps ne serait produit contre la partie lipidiques des antigènes avec chaînes aliphatiques (Wildemann et al., 1991). Cette propriété aurait pour avantage d'éviter la production d'anticorps non spécifiques aux peptides d'immunisation, diminuant les risques de réactions secondaires.

3. Les lipides ne provoquent aucun effet toxique (Coon et Hunter, 1973).

L'un des objectifs du projet de recherche consistait à vérifier l'efficacité et l'utilité de conjuguer de longues chaînes aliphatiques à des peptides pour augmenter leur capacité immunogénique. Hopp (1984) a été le premier à suggérer l'utilisation de cette procédure, et peu d'études ont par la suite été rapportées sur le sujet. Les méthodes de synthèses des peptides avec chaînes aliphatiques développés par Hopp demeurent cependant limitatives, car la dipalmitoyl-lysine ne peut être ajoutée qu'à l'extrémité du peptide. Nous avons adapté les principes initiés par Hopp pour permettre la synthèse en phase solide des peptides à longues chaînes aliphatiques. En ajoutant des chaînes aliphatiques à différents acides aminés avant la synthèse du peptide, nous pouvons positionner ces chaînes aliphatiques à des points stratégiques du peptide, et ce en tenant compte des déterminants antigéniques de ce dernier. La chimie de synthèse de ces nouveaux immunogènes est ainsi simplifiée, et la structure finale de l'antigène peptidique peut être prédéterminée et modifiée à volonté. Le but premier de ce projet consiste donc à vérifier de quelle façon et jusqu'à quel point l'ajout d'acides aminés à longues chaînes aliphatiques peut modifier l'immunogénicité des peptides.

Il est par ailleurs important de vérifier la possibilité de coupler des chaînes aliphatiques sur différents types d'acides aminés, pour éviter de modifier substantiellement la structure originale du peptide immunogène. Le terme acide aminé pseudo-

lipidique sera utilisé dans nos études pour désigner des acides aminés sur lesquels des chaînes aliphatiques auront été ajoutés.

## 5.1 Peptides modèles

Afin de réaliser cette étude nous avons utilisé deux peptides modèles, soit l'angiotensine II (Ang II) et un peptide déduit du gène de la protéine P-28 du parasite *Schistosoma mansoni* (Wolowczuk et al., 1990). Les deux peptides possèdent des caractéristiques essentielles pour l'étude.

### 5.1.1 L'angiotensine II

L'angiotensine II (Ang II) est un peptide de 8 acides aminés non immunogène dû à son faible poids moléculaire (Hermann et al., 1986). Il doit donc être couplé à un porteur et injecté en présence d'un adjuvant pour produire une réponse immune (Vallotton, 1970; Abruzzini et Thomas, 1983; Couraud, 1986, Hermann et al., 1986; Picard et al., 1986). Lorsque c'est le cas, cet octapeptide peut induire une réponse humorale (Dietrich, 1966), ainsi qu'une réponse à médiation cellulaire spécifique (Vallotton, 1970). La production d'anticorps anti-Ang II est toutefois souvent faible étant donné le caractère "soi" du peptide (Michel et al., 1989; Partidos et al., 1992). La faible capacité immunogène de ce peptide associée à sa nature hapténique permettra de vérifier si l'addition de chaînes aliphatiques peut, tels que les porteurs protéiques, permettre l'induction d'une réponse immunitaire.

Une autre caractéristique importante à la production d'anticorps anti-Ang II est la difficulté de produire des anticorps capable de reconnaître spécifiquement la partie N-terminale de ce peptide, et non l'angiotensine III, son métabolite majeur, qui ne diffère de l'Ang II que par le premier acide aminé en N-terminal (Nussberger et al., 1983; Reilly et al., 1987). Afin de vérifier si l'addition de chaînes aliphatiques pouvait en partie pallier à ce problème, nous avons choisi d'ajouter les acides aminés pseudo-lipidiques à l'extrémité C-terminale de l'Ang II, de façon à garder

intacte et libre l'extrémité N-terminale du peptide.

### 5.1.2 Épitope de la protéine P-28 de *Schistosoma mansoni*

Le deuxième peptide modèle utilisé consistait en un peptide de 17 acides aminés correspondant à la séquence 115-131 d'une protéine de *Schistosoma mansoni*, la protéine P-28 (Wolowczuk et al.,1990) ou rSm-28 GST (Wolowczuk et al.,1991). *S. mansoni* est un parasite responsable de la schistosomiase ou bilharziose une maladie très répandue dans les régions tropicales et subtropicales (Capron et Dessaint, 1992). Cette maladie qui implique la présence de vers adultes dans les veines portales et mésentériques conduit souvent de façon indirecte à la mort du malade (>800 000 décès par année) en produisant un affaiblissement général de l'organisme (information de l'institut Pasteur de Lille). La protéine P-28 isolée du parasite, et dont le nom provient de sa masse moléculaire de 28 Kd (Balloul et al., 1987a), est utilisée comme vaccins expérimentaux contre la maladie et est capable d'induire une protection immunitaire chez différents animaux (Damonville et al., 1988; Wolowczuk et al., 1990; Pancré et al., 1990). La séquence 115-131 déduit du gène de P-28 est connue comme étant un déterminant antigénique majeur de la protéine (Wolowczuk et al., 1990), lequel peut également induire une réponse immunitaire complète contre le parasite (Wolowczuk et al., 1990,1991). Ce peptide possède des épitopes reconnus par les lymphocytes B et T chez la souris (Francis et al., 1985; Wolowczuk et al., 1991). Le peptide 115-131 est toutefois faiblement immunogène et doit donc être couplé à un porteur (Wolowczuk et al., 1990) ou utilisé sous forme d'octamère (pieuvre) pour induire une réponse immunitaire (Wolowczuk et al., 1991).

Le fait que les caractéristiques immunogènes de ce peptide soient bien connues, permettra de comparer plus aisément les effets de l'ajout de chaînes aliphatiques à ce peptide. De plus, contrairement à l'Ang II, le peptide 115-131 du Schistosome peut tout de même induire une faible réponse immunitaire lorsqu'il est

utilisé seul. Donc si l'effet des lipides est relativement faible (que ce soit un effet positif ou négatif), il pourra être détecté plus facilement avec le peptide 115-131, qu'avec l'Ang II.

## **II- Développement d'une méthode de liaison covalente des peptides synthétiques aux surfaces de polystyrène utilisées pour les essais ELISA.**

### **1. Essais ELISA**

Les premiers essais ELISA effectués m'ont permis de constater la difficulté associée à l'utilisation de peptides de faible taille tels que l'Ang II en tant qu'antigène utilisé pour la détection d'anticorps spécifiques. Nous avons donc cherché à développer une nouvelle méthode simple pour lier de façon covalente ces peptides de faible poids moléculaire à la surface de plastique la plus utilisée en ELISA soit le polystyrène.

L'ELISA ou "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" est l'une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'anticorps (Boudet et coll., 1991). Elle constitue avec le RIA (radioimmuno-étalonnage), l'une des méthodes les plus sensibles pour détecter la présence d'anticorps spécifiques (Peterfy et al., 1983). L'utilisation d'une détection colorimétrique plutôt que d'un marqueur radioactif apporte à l'ELISA les avantages d'être plus sécuritaire, et d'être stable à long terme (Engvall et al., 1971). Il s'agit de plus d'un essai simple, rapide, versatile et peu coûteux (Steward et Lew, 1985). Cet essai est basé premièrement sur la liaison d'un antigène à une surface de plastique. Cette liaison est habituellement assurée par une simple adsorption de l'antigène qui dépend surtout d'interactions hydrophobes faibles de type Van der-Waals-London (Briand et al., 1985). En général, le taux d'adsorption de l'antigène aux plaques ELISA est proportionnel à sa masse moléculaire (Cantarero et al., 1980; Rotmans et Delwel, 1983; Verschoor et Visser, 1990). La plupart des antigènes de faibles masses moléculaires, notamment plusieurs peptides synthétiques, adhèrent faiblement aux plaques

ELISA. On situe la limite de liaison des peptides au plastique à environ une taille de 15 à 20 acides aminés (Briand et al., 1985; Van Regenmortel et al., 1988; Wisdom, 1992).

L'utilisation de polypeptides de masse plus élevée ayant une meilleure adhérence aux surfaces de plastique est donc souvent préférée comme antigène de détection. Ces polypeptides constitués de plusieurs épitopes sont cependant moins discriminatifs et moins spécifiques que les peptides formés d'un seul épitope. Une autre méthode couramment utilisée consiste à conjuguer les petits peptides à des porteurs protéiques qui sont eux-mêmes adsorbés aux plaques ELISA (Briand et al., 1985). Cette méthode introduit toutefois plusieurs incertitudes dues à l'addition de nouveaux antigènes potentiels (porteurs protéiques) et à la non spécificité des méthodes de couplage habituellement employées (Briand et al., 1985). La liaison des protéines au plastique n'étant pas de nature covalente, une partie de l'antigène peut se détacher de la surface de la plaque pendant les périodes d'incubation et les étapes de lavages, diminuant ainsi la sensibilité de l'essai (Engvall et al., 1971; Lehtonen et Viljanen, 1980).

## **2. Méthodes de liaison covalente des antigènes**

Plusieurs méthodes pour lier des peptides de façon covalente à des plaques ELISA ont été développées (Phillips et al., 1980; Klasen et al., 1983; Rotmans et Delwel, 1983; Larson et al., 1987; Verschoor et Visser, 1990; Varga et Fritsch, 1990; Sondergard-Andersen et al., 1990; Ordroneau et al., 1991). Certaines de ces méthodes basées sur la modification chimique de la surface de plastique sont toutefois longues et complexes (Phillips et al., 1980; Rotmans et Delwel, 1983). Dans certains cas, un prétraitement des plaques ELISA à la glutaraldéhyde 0.025% à 10% semble suffisant pour augmenter la liaison d'acides aminés ou de petits peptides tels que des mélanges de peptides provenant de digestions trypsiques de la chaîne- $\gamma$  de l'hémoglobine (Klasen et al., 1983; Ordroneau et al., 1991), mais cette méthode a été démontrée insatisfaisante dans

d'autres cas (séquences peptidiques de 16 à 23 acides aminés de la protéine gp-120 de HIV-1) (Boudet et al., 1991).

Larson et coll. (1987) ont utilisé les radiations gamma pour lier des acides carboxyliques insaturés à du polystyrène. La présence de nouvelles fonctions à la surface du plastique permettait ensuite de coupler des protéines en utilisant un agent activateur des carboxylates (exemple: carbodijimide). C'est en effectuant une expérience semblable que nous avons découvert une nouvelle façon de lier des peptides de façon covalente aux surfaces de polystyrène.

Une étude des différents facteurs pouvant influencer l'efficacité de cette liaison covalente a ensuite été entreprise pour optimiser la méthode, et examiner les différentes possibilités de son utilisation.

### **3. Objectifs**

L'objectif principal de ce projet était: La mise au point d'une nouvelle méthode pour lier de façon covalente des antigènes peptidiques aux plaques ELISA.

Objectifs secondaires:

1. L'étude des différents paramètres impliqués dans la liaison des peptides de façon à optimiser la méthode.
2. L'évaluation des possibilités d'utilisation de cette méthode de liaison avec différents peptides et des possibilités de réutilisation et de conservation des plaques ELISA avec des peptides liés de façon covalente.
3. La comparaison de l'efficacité, de la sensibilité et de la spécificité des essais ELISA avec des antigènes liés de façon covalente, par rapport aux méthodes ELISA conventionnelles où l'antigène est lié grâce à des interactions hydrophobes.

### **III- Anticorps anti-angiotensine II réagissant avec des analogues non-peptidiques de l'angiotensine II : récepteur modèle de l'hormone.**

Dans le projet principal l'Ang II à été utilisé en tant que peptide modèle pour évaluer l'effet immunogénique des acides aminés pseudo-lipidiques. Plusieurs séra comportant des anticorps spécifiques à l'Ang II ont donc été développé pour les besoins de cette étude. L'intérêt du laboratoire pour l'Ang II et ses récepteurs nous a donné par ailleurs accès à de nouveaux analogues non-peptidiques de l'Ang II, tandis que plusieurs analogues de nature peptidique ont également déjà été synthétisés au laboratoire. Dans un esprit de logique opportune nous avons donc décider de réaliser un sous-projet qui consistait à étudier les interactions entre les anticorps anti-Ang II et les analogues de l'Ang II. Le but de ce projet était de vérifier la possibilité d'utiliser certains anticorps anti-Ang II comme récepteur modèle de l'hormone.

#### **1. L'angiotensine II et ses récepteurs**

L'Ang II est l'effecteur premier du système rénine-angiotensine (RAS) lequel joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine et dans l'homéostasie des liquides et des électrolytes corporels (Catt et Abbott, 1991; Zelezna et al., 1992). Cette hormone agit également sur les systèmes endocriniens, hépatiques et reproducteurs, en plus d'avoir des effets au niveau du système nerveux central, du système nerveux sympathique et sur la stimulation du coeur (Mendelsohn, 1985; Garcia et al., 1989; Catt et Abbott, 1991). Il n'est donc pas surprenant de retrouver des récepteurs de l'Ang II dans une très grande variété de types cellulaires incluant les cellules des muscles lisses vasculaires, du coeur, du foie, de l'utérus, des reins, du cerveau et des glandes surrénales et pituitaires (Regoli et al., 1974; Capponi et Catt, 1979; Mendelsohn, 1985; Kiron et Soffer, 1989; Marie et al., 1990).

La caractérisation des récepteurs de l'Ang II a progressé rapidement grâce à la découverte récente de plusieurs antagonistes de natures peptidiques et non-peptidiques (Chiu et al., 1989; Whitebread et al., 1989), et au clonage et à l'expression du type AT<sub>1</sub> des récepteurs de l'Ang II (Murphy et al., 1991; Sasaki et al., 1991). Ces études ont mis en évidence l'existence des classes AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> et permis d'attribuer au récepteur AT<sub>1</sub> la plupart des fonctions physiologiques connues de l'Ang II. Le rôle du récepteur AT<sub>2</sub> reste à explorer, mais il semblerait que sur la base de la distribution tissulaire, les fonctions de ce récepteur pourraient être différentes de celles de AT<sub>1</sub>. Par exemple, le récepteur AT<sub>2</sub> est abondant dans les tissus en développement, tel que dans certaines régions du cerveau, de la médulla surrénale et des organes reproducteurs du rat, et pourrait possiblement jouer un rôle dans le contrôle de la croissance tissulaire (Catt et Abbott, 1991; Smith et al., 1992). Les récepteurs de l'Ang II sont de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le mécanisme d'action de l'AT<sub>1</sub> passerait soit par l'inhibition de l'adénylate cyclase, ou par la stimulation de la phospholipase C avec production d'inositol triphosphate, de diacylglycérol, et mobilisation de calcium (Smith et al., 1992).

## **2. Les antagonistes non-peptidiques des récepteurs de l'angiotensine II**

Les antagonistes non-peptidiques des récepteurs de l'Ang II ont non seulement contribué à la progression de la caractérisation des récepteurs, mais constituent également une nouvelle classe de drogue anti-hypertensive, qui ont l'avantage d'avoir une longue durée d'action et d'être dépourvue de tout effet agoniste contrairement aux antagonistes peptidiques connus de l'Ang II (Wong et al., 1991; Smith et al., 1992).

Le premier antagoniste non-peptidique à avoir atteint les tests cliniques est le Dup 753 ou Losartan<sup>R</sup> (Christen et al., 1991a; Christen et al., 1991b). Ce composé est hautement sélectif pour le récepteur AT<sub>1</sub> de l'Ang II. Il demeure partiellement intact

lorsqu'absorbé oralement, mais il est également converti en un métabolite encore plus puissant le Exp 3174 (Wong et al., 1990). D'autres antagonistes efficaces du récepteur AT<sub>1</sub> ayant une affinité et un potentiel antihypertenseur supérieur au Dup 753 ont été développés, entre autre le Dup 532 (Chiu et al., 1991) et le L-158,809 (Siegl et al., 1990, 1992; Chang et al., 1992). Des ligands non-peptidiques sélectifs aux récepteurs AT<sub>2</sub> ont aussi été produits dont le PD-123,177 et le PD-123,319 (Lu et al., 1991a) et le ligand peptidique CGP 42112a (Whitebread et al., 1989).

La ressemblance structurale entre les analogues non-peptidiques de l'Ang II et l'hormone peptidique est peu évidente, mais comme toutes ces substances se lient de façon compétitive sur les mêmes récepteurs, elles doivent donc partager une surface moléculaire commune.

### **3. Objectifs**

La structure exacte des sites de liaison des récepteurs de l'Ang II n'est pas encore connue, mais de telles informations seraient importantes pour la conception future de nouvelles drogues se liant au récepteur. La mise au point d'un récepteur modèle de nature plus maniable (plus facile à étudier, moins complexe que le récepteur naturel) faciliterait certainement la compréhension de l'interaction de l'Ang II avec ses récepteurs. Étant donné qu'il a été démontré que des anticorps produits contre des ligands hormonaux (notamment l'Ang II) pouvaient posséder des caractéristiques de liaison similaires ou même identiques aux récepteurs de ces même ligands (Talwar et al., 1985; Couraud, 1986; Reilly et al., 1987), nous avons pensé que des anticorps anti-Ang II pourraient servir de récepteurs modèles pour l'hormone. Afin de vérifier l'existence de tels anticorps, nous avons émis l'hypothèse que des anticorps capables de lier spécifiquement la plupart des analogues de l'Ang II, (peptidiques et non-peptidiques) avec une relation structure-activité semblable à celles des récepteurs de l'Ang II, pourraient posséder des sites de liaison dont la structure ressemblerait à

ceux des récepteurs.

Nous avons donc entrepris une étude de criblage des différents séra de souris immunisées avec l'Ang II que nous avons développé dans le projet principal, et ce afin de trouver des anticorps interagissant non seulement avec les analogues peptidiques de l'Ang II, mais aussi avec des ligands non-peptidiques des récepteurs de l'hormone. Ces anticorps confirmerait de plus l'existence d'une homologie structurale entre les antagonistes non-peptidiques et l'hormone naturelle.

Dans le but de réaliser cette étude, nous avons choisi d'utiliser une méthode d'ELISA de compétition en se servant de séra polyclonaux provenant de souris immunisées avec l'Ang II. L'utilisation de séra polyclonaux permet d'avoir accès à un vaste éventail d'anticorps spécifiques à différent segment de l'Ang II. La découverte d'un anticorps d'intérêt pourrait éventuellement conduire à la production d'un anticorps monoclonal et à une étude plus détaillée des sites de liaison de cet anticorps.

L'objectif principal de ce projet consistait donc à vérifier l'existence d'anticorps pouvant interagir avec l'Ang II et avec les analogues peptidiques et non-peptidiques de l'hormone dans le but de:

1. Démontrer une homologie structurale existant entre les antagonistes non-peptidiques et l'Ang II.
2. Concevoir un récepteur modèle à partir de la partie variable FAB d'anticorps anti-Ang II.

Cette étude pourrait également permettre de déterminer les régions de l'Ang II imitées par les antagonistes non-peptidiques et donc probablement impliquées directement dans la liaison avec le récepteur.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

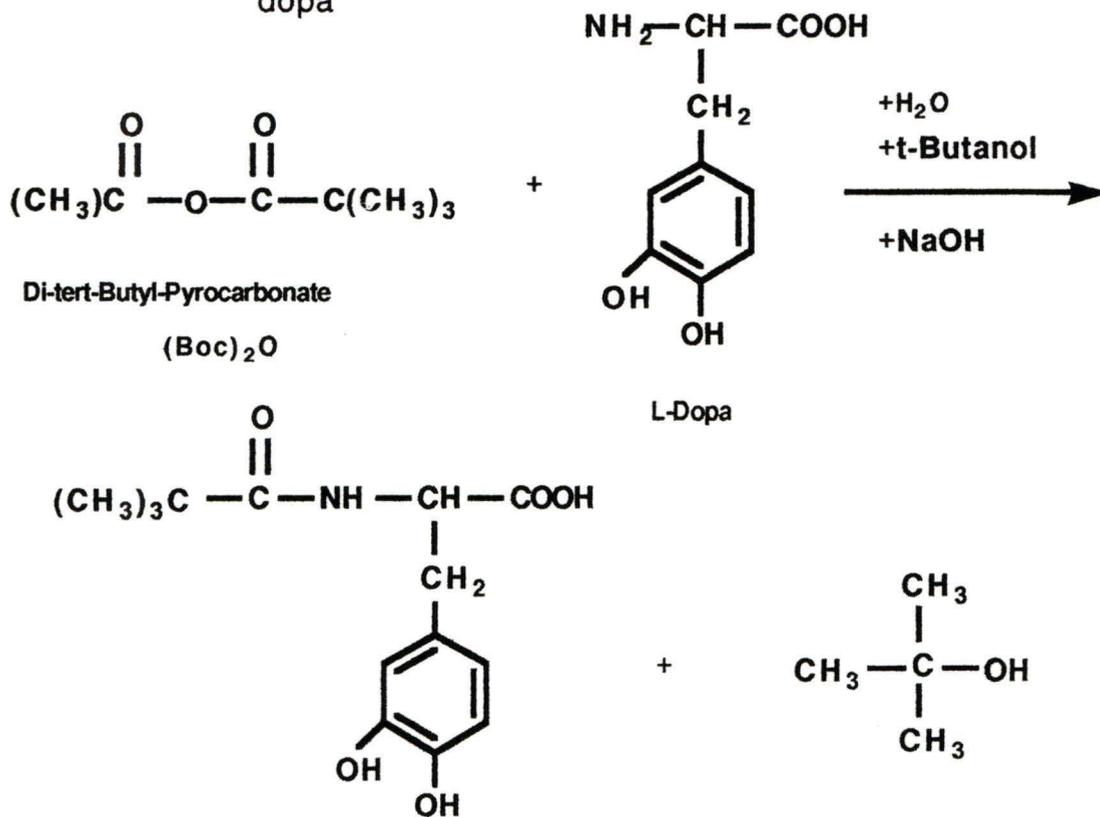
### I- Propriétés immunogéniques des peptides à longues chaînes aliphatiques.

#### 1. Synthèse d'acides aminés pseudo-lipidiques

##### 1.1 Production de Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-dopa

a) Etape 1 : Protection de la fonction  $\alpha$ -amine de la L-dopa par le groupement Boc (Stewart et Young, 1984).

**FIGURE 1:** Ajout d'un groupement Boc à la fonction amine de la L-dopa



Réactif:

L-dopa (Mr: 197.2), 15g = 0.076 mole

NaOH (Mr: 40.0), 3.5 excès vs L-Dopa = 0.266 mole = 10.65g

(Boc)<sub>2</sub>O (Mr: 218.2), 3.2 excès vs L-Dopa = 0.243 mole = 53.11g

Le NaOH (Fisher) a d'abord été solubilisé dans un mélange d'eau (50 ml) et de t-butanol (50 ml) (Fisher), et on a ajouté la L-dopa (Sigma). Le mélange a été refroidi dans un bain de glace, puis lentement, sur une période de 15 à 30 min., le (Boc)<sub>2</sub>O a été ajouté. Du t-butanol a ensuite été légèrement ajouté pour aider à la solubilisation et le pH a été ajusté à 10. Le tout a été laissé sous agitation pendant une période de 12 h. à température ambiante.

Le t-butanol a par la suite été évaporé, la solution replacée sur la glace et le pH a lentement été ajusté à 3 avec du HCL 4N. Cette acidification permet de neutraliser le carboxylate et de libérer les fonctions hydroxyliques de la L-dopa ayant pu réagir avec le groupement Boc.

Le Boc-L-dopa a ensuite été extrait à l'acétate d'éthyle (Aldrich), puis la solution a été évaporée et lyophilisée. La pureté du composé a été vérifiée qualitativement par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de gel de silice (Merck #5554) dans les systèmes de solvant: chloroforme: acide acétique: méthanol (C:A:M/95:5:3, v/v/v) et butanol: acide acétique: eau (B:A:W/5:2:3, v/v/v). L'acide aminé a été révélé par coloration à la ninhydrine.

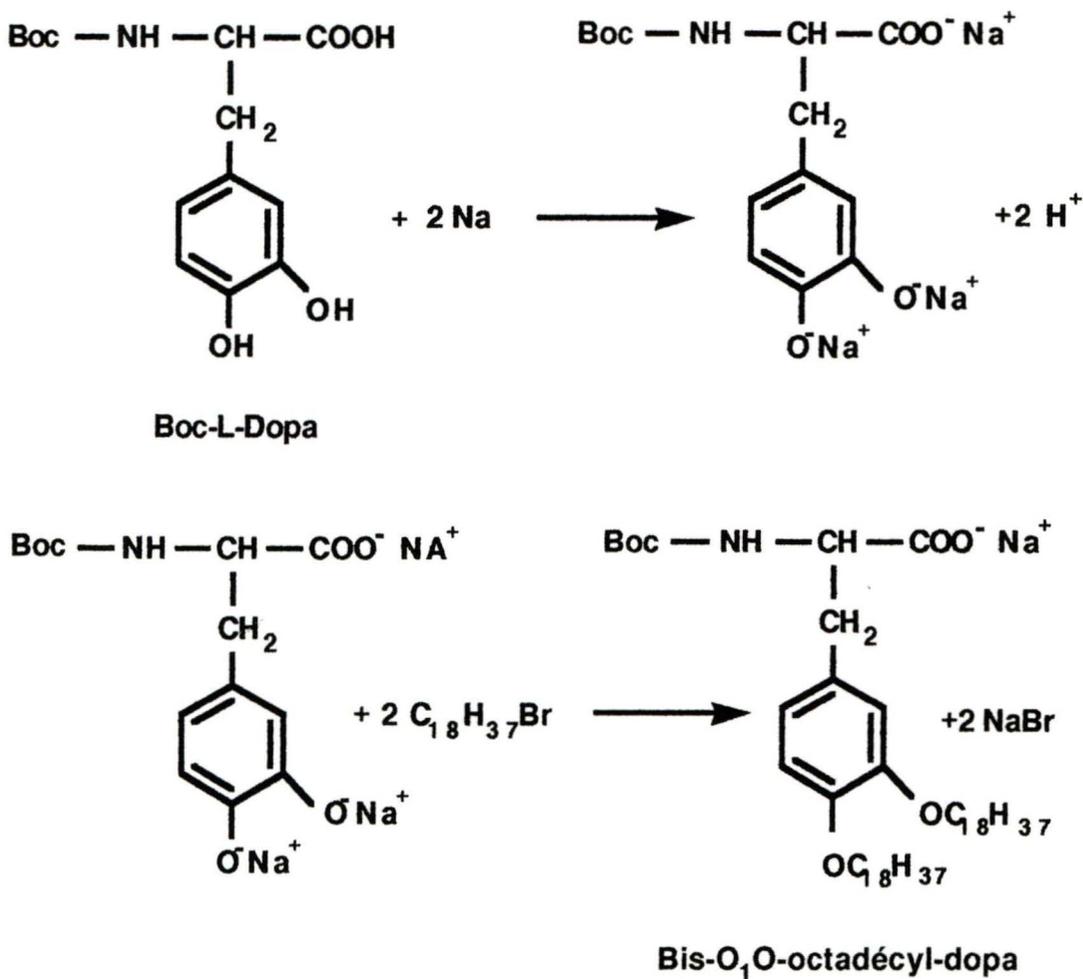
Tableau I Caractérisation par CCM du Boc-L-dopa. ( $R_f$  \*)

Phase d'extraction \ Solvant	C:A:M/95:5:3		Produit
	B:A:W/5:2:3		
Aqueuse	0*	0.31	L-Dopa
Organique (Acétate d'éthyle)	0.24	0.80	Boc-L-Dopa

\* Indice de migration relative des produits isolés suite à l'extraction avec acétate d'éthyle.

b) Etape 2 "Réaction de Williamson: Alkylation " (Vogel, 1956)

FIGURE 2:



Le Boc-L-dopa a été solubilisé dans de l'éthanol (Fisher), puis on y a lentement ajouté, sur une période d'environ 1 h., 3.5 excès (0.23 mole) de sodium. Par la suite, 2.2 excès (0.14 mole) de 1-Bromooctadecane ( $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{Br}$ , Aldrich) on aussi été ajouté toujours très progressivement, ainsi que quelques grains d'iode ( $\text{NaI}$ ) servant de catalyseur. Le bromure de sodium (produit de réaction) a été filtré sur un papier Whatman No 1. Le produit de réaction a été

mélangé dans un rapport 4:1 avec du NaOH 4N de façon à obtenir une concentration finale de 1N NaOH. Le tout a été gardé sous agitation pendant 2h. à température ambiante pour saponifier un octadécyl ester éventuellement fermé. Le mélange réactionnel a par la suite été acidifié à pH 3 avec du HCl 1N dans un bain de glace, puis l'eau a été partiellement évaporé avec un appareil Rotavapor (Büchi R-110). Le produit final a enfin été extrait avec de l'acétate d'éthyle, puis ce dernier solvant a été évaporé. L'efficacité de la réaction a été vérifiée par CCM avec le système de solvant B:A:W/5:2:3.

**Tableau II** Caractérisation par CCM du Boc-bis-O<sub>1</sub> O-octadécyl-dopa

	L-dopa	Boc-L-dopa	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> Br*	Boc-bis-O <sub>1</sub> O-octadécyl-dopa
R <sub>f</sub>	0.31	0.80	0.85	0.92

\* Le C<sub>18</sub> H<sub>37</sub> Br est révélé sous lumière U.V.

Le produit de la réaction ( Boc-bis-O<sub>1</sub> O-octadécyl-dopa) a été solubilisé dans un mélange 30% méthanol (Fisher), 70% chloroforme (Fisher) et chromatographié sur une colonne de gel de silice. Le dérivé d'acide aminé purifié a ensuite été séché et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Le produit obtenu a été analysé par spectrophotométrie de masse à l'aide d'un analyseur FAB modèle 5988A de Hewlett-Packard

Poids moléculaire théorique évalué: 802.2

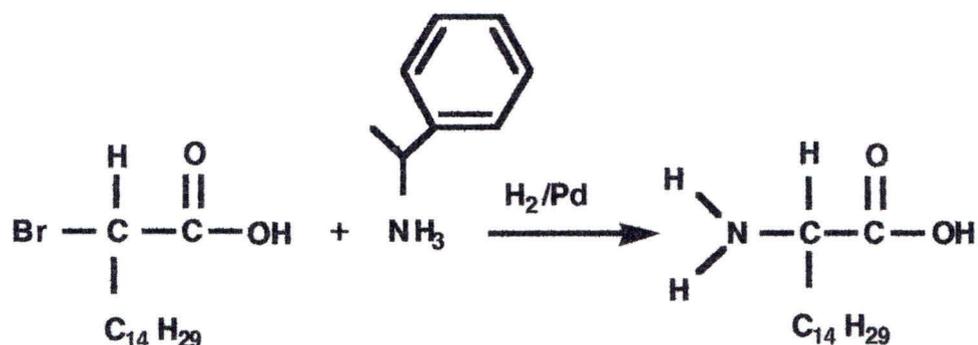
Poids obtenu: 703 dû à la perte du groupement Boc lors de la méthode d'analyse de la masse moléculaire (annexe 1).

## 1.2 Synthèse d'autres acides aminés pseudo-lipidiques.

Outre la bis-O<sub>1</sub> O-octadécyl-dopa, deux autres acides aminés

pseudo-lipidiques ont également été produits, soit la tétradécylglycine, produit à partir de l'acide  $\alpha$ -bromo-hexadécanoïque (Aldrich):

Figure 3: Production de tétradécylglycine

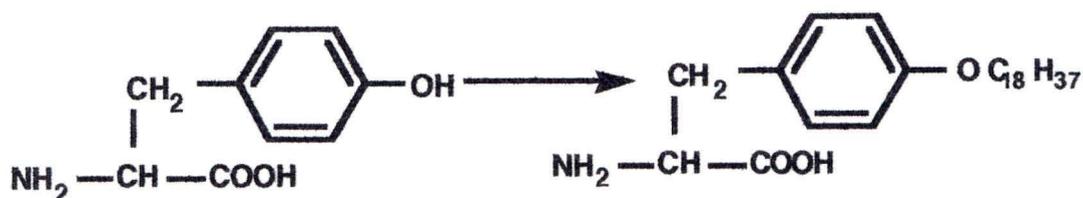


$\alpha$ -bromohexadécanoïque acide

Tétradécylglycine

et l'O-octadécyl-tyrosine, dont la production est identique à la bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-dopa (réaction de Williamson):

FIGURE 4: Production de O-octadécyl-tyrosine



Tyrosine

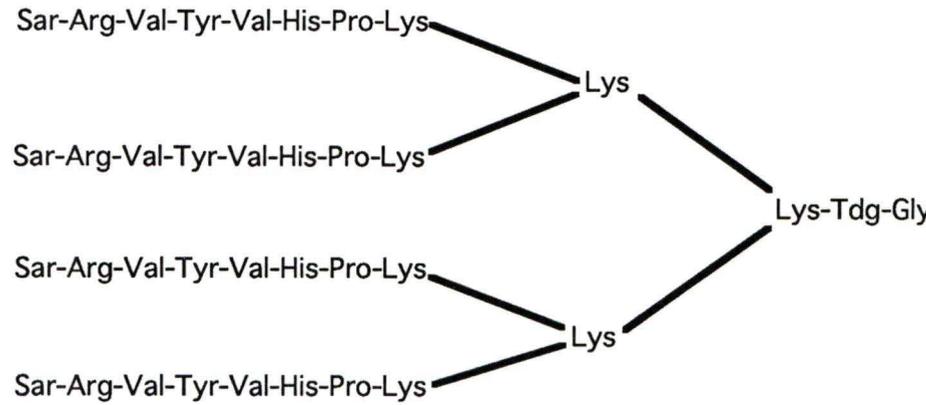
O-octadécyl-Tyrosine

Ces acides aminés ont été synthétisé au laboratoire par Christine Dubeaux, PhD., et Witold Neugebauer, PhD., (Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke).

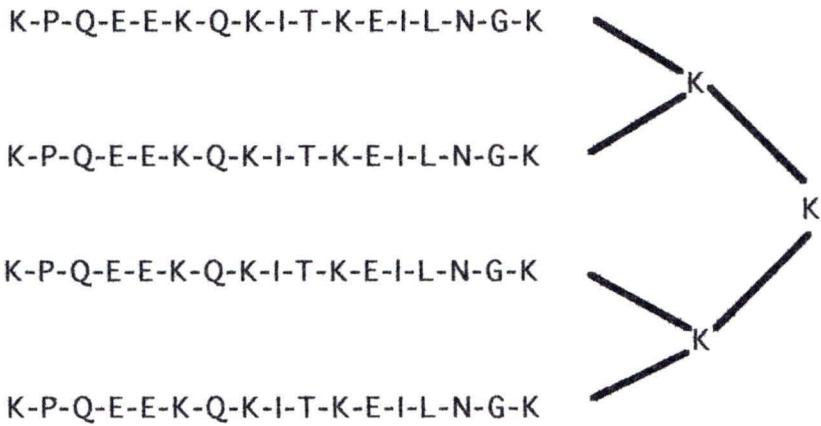
## 2. Synthèse et purification des peptides

### 2.1 Liste des peptides utilisés

**Tableau III Structure primaire des peptides de la famille angiotensine II utilisée**

Angiotensine II	Structure primaire	Poids Moléculaire
[Sar <sup>1</sup> ]Ang II	Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe	988
[Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II	Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Lys	969
[Sar <sup>1</sup> ,Bis-Alkyl-Dopa <sup>8</sup> ]Ang II	id. -His-Pro-Bis-Alkyl-Dopa	1542
[Sar <sup>1</sup> ,Tdg <sup>8</sup> ]Ang II	Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Tdg	1093
[Sar <sup>1</sup> ,Alkyl-Tyr <sup>8</sup> ]Ang II	id. -His-Pro-Alkyl-Tyr	1289
[Sar <sup>1</sup> ,Tdg <sup>8,9,10</sup> ,Gly <sup>11</sup> ]Ang II	id. -His-Pro-Tdg-Tdg-Tdg-Gly	1712
[(Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> )Ang II] <sub>4</sub> (Lys <sup>9</sup> ) <sub>2</sub> ,Lys <sup>10</sup> ,Tdg <sup>11</sup> ,Gly <sup>12</sup> ou Ang II-tétramère	 <p>The diagram illustrates the primary structure of the Ang II-tetramer. It consists of four identical Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Lys chains. Each chain is connected to a central Lys-Tdg-Gly chain through its C-terminal Lys residue. The connections are shown as lines forming a diamond shape with the central Lys-Tdg-Gly chain at the right vertex and the four Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Lys chains at the left vertex. The central Lys-Tdg-Gly chain is labeled as such, and the four Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Lys chains are also labeled as such.</p>	4498

**Tableau IV Structure primaire des peptides de la famille Schistosome utilisés**

Peptide 115-131	Structure primaire	Poids Moléculaire
Sch	K-P-Q-E-E-K-Q-K-I-T-K-E-I-L-N-G-K	2012.4
[Bis-O <sub>1</sub> O-octadécyl-Dopa <sup>18</sup> , Gly <sup>19</sup> ]Sch	K-P-Q-E-E-K-Q-K-I-T-K-E-I-L-N-G-K-(Bis-Alkyl-Dopa)-G	2871.7
[Tdg <sup>18</sup> , Tdg <sup>19</sup> , Gly <sup>20</sup> ]Sch	K-P-Q-E-E-K-Q-K-I-T-K-E-I-L-N-G-K-Tdg-Tdg-G	2575.7
[Sch] <sub>4</sub> (Lys <sup>18</sup> ) <sub>2</sub> , Lys <sup>19</sup> ou Sch-tétramère		8380.2

Tous les peptides ont été synthétisés au laboratoire par Richard Laprise (Merrifield, 1963, Barbeau et al., 1992) et tous les peptides dérivés de l'Ang II ont été purifiés par Christine Dubeaux, PhD., et Marie-Reine Lefebvre (Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke).

## 2.2 Clivage des peptides de la résine

Suite à la synthèse des peptides, ces derniers ont été clivés de la résine, et les chaînes latérales déprotégés. La résine a été asséchée et pesée, et 2 ml/g d'anisole ont été ajoutés. Le tout a été placé dans un appareil spécial de plastique (Kel-f et teflon) sans verre. Un volume de 20 ml de fluorure d'hydrogène anhydre (HF) a ensuite été condensé sous vide dans le mélange réactionnel à 4°C. On laisse réagir pendant 1 h., puis le HF a été évaporé sous vide, puis à l'aide d'un jet d'azote. La résine a été lavée à l'éthyl éther anhydre et les peptides ont été extraits avec une solution d'acide acétique aqueux 25 ou 50% (v/v). Une fois l'acide acétique évaporé dans un appareil Rotavapor (Büchi R-110), le peptide a été lyophilisé.

## 2.3 Purification des peptides dérivés de la protéine rSm-28 GST du Schistosome

Suite à leurs synthèses, la purification des peptides est nécessaire pour enlever les résidus de solvant (acide acétique) et de sels provenant du clivage du peptide, et pour séparer les peptides désirés des fragments peptidiques provenant de délétions ou de terminaisons de chaînes (Van Regenmortel et al., 1988).

Le peptide Sch (tableau IV) a été chromatographié à basse pression sur une colonne de résine C<sub>18</sub> (Waters) d'une longueur de 30 cm et avec un diamètre de 2 cm, élué par un gradient linéaire d'acetonitrile de 5 à 45% aqueux en combinaison avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0.05%. Le peptide Sch-tétramère a été purifié de la même façon. Le peptide [Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>18</sup>, Gly<sup>19</sup>]Sch a d'abord été déssalé par filtration sur une colonne de partition G<sub>25</sub> (46 cm x 4 cm) (Pharmacia) élué avec acide acétique (AcOH) 0.2N, puis purifié sur une colonne de résine C<sub>8</sub> (Waters) (30 cm x 2 cm) élué par un gradient linéaire d'isopropanol 10 à 75% aqueux en combinaison avec du TFA 0.05%. Le [Tdg<sup>18</sup>, Tdg<sup>19</sup>, Gly<sup>20</sup>]Sch a été pour sa part chromatographié sur une colonne de type LH-

20 (Sigma) (30 cm x 2 cm) élué avec AcOH 0.2N.

Tout les solvants ont été dégazés avant les chromatographies sur colonne afin d'éviter l'oxydation de certains acides aminés (Van Regenmortel et al., 1988) et pour éviter la présence d'air dans les colonnes.

#### **2.4 Analyse de la pureté des peptides**

Les peptides nouvellement synthétisés ont d'abord été analysés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) en phase inversée et élués avec un gradient linéaire d'acétonitrile. Les peptides sont détectés à la sortie de la colonne à l'aide d'un détecteur ultra-violet à une longueur d'onde de 217 nm. Suite à une chromatographie sur colonnes à basse pression, les fractions ont ensuite été analysées par CCM avec le système de solvant B:A:W/5:2:3 (section 1). Les peptides ont été révélés par une méthode qui colore les liens peptidiques amides (annexe 2). Les peptides dérivés du Schistosome ne migrent pas avec le système de solvant utilisé, ce qui permettait de les différencier des contaminants majeurs visibles sous lumière ultra-violet, et dont l'indice de migration relative était supérieur à 0. Les fractions les plus homogènes ont été récupérées, lyophilisées et analysées de nouveau par HPLC (élué avec un gradient linéaire d'acétonitrile) afin d'évaluer leur pourcentage de pureté final. La pureté finale des différents analogues de l'Ang II (tableau III) a été établie à un niveau supérieur à 95%.

**Tableau V** Analyse HPLC des peptides dérivés du Schistosome

	Sch <sup>*</sup>	[Sch] <sub>4</sub> (Lys <sup>18</sup> ) <sub>2</sub> Lys <sup>19</sup>	[Dopa <sup>18</sup> ]Sch <sup>*</sup>	[Tdg <sup>18,19</sup> ]Sch
Colonne	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>8</sub>
%ACN <sup>1</sup>	25.4	27.3	66.5	68
Brut(%) <sup>2</sup>	46	80	37	70
Purifié (%) <sup>3</sup>	80	90	50	77

\* Voir profil chromatographique aux annexes 3 à 6.

1. Pourcentage d'acétonitrile qui élue le peptide de la colonne.

2. Pourcentage de pureté après clivage au HF (évaluer à l'ordinateur par la mesure des surfaces sous les courbes obtenues par l'HPLC).

3. Pourcentage de pureté après purification par chromatographie à base pression.

### 3. Identification des peptides

Afin de vérifier partiellement la structure primaire des peptides purifiés, nous avons fait appel à deux techniques, soit la spectrophotométrie de masse et l'analyse d'acides aminés. Les spectres de masse des peptides dérivés de l'Ang II ont été réalisés à l'aide d'un analyseur FAB modèle 5988A de Hewlett-Packard, et les poids moléculaires obtenus correspondent aux poids théoriques calculés. Ce type d'appareil ne peut toutefois être utilisé pour déterminer des poids moléculaires élevés (supérieur à 2000) tels que les peptides dérivés de l'antigène du Schistosome. Le poids moléculaire du peptide Sch purifié a néanmoins pu être confirmé par un spectrophotomètre de masse avec bombardement au californium, à l'Institut Pasteur de Lille, France. Le poids moléculaire réel du peptide a été retrouvé à 2012.4, et le sel sodique du peptide est aussi visible avec un pic à 2036.9 (annexe 7).

Les acides aminés des peptides les plus lourds, soit les peptides dérivés de l'antigène du Schistosome, ainsi que le tétramère de l'Ang II:  $\{[(\text{Sar}^1, \text{Lys}^8)\text{Ang II}]_4, (\text{Lys}^9)_2 \text{Lys}^{10}, \text{Tdg}^{11}, \text{Gly}^{12}\}$  ont été analysés au laboratoire du Dr B. Lemieux (Département de pédiatrie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke) par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions et détecté par coloration à la ninhydrine. Les peptides ont été d'abord hydrolysés sous vide pendant 24 heures à 110°C dans une solution de HCL 6N contenant 1% de phénol. L'acide chloridrique a ensuite été évaporé. Les résultats des analyses sont présentés aux tableaux VI et VII.

**Tableau VI. Analyse d'acides aminés des peptides dérivés de l'antigène rSm-28 GST du Schistosome.**

	Acides Aminés							
	Asx	Glx <sup>2</sup>	Gly	Ile	Leu	Lys	Pro	Thr
Valeurs théoriques ( $\mu\text{M}$ )	1	5	1	2	1	5	1	1
Valeurs observées ( $\mu\text{M}$ )								
Sch	.63	4.09	1.61	2.45	1.34	4.09	.9	.67
<sup>1</sup> [Bis-Alkyl-Dopa <sup>18</sup> ]Sch	.62	4.67	1.86 <sup>3</sup>	2.03	1.05	5.70	.89	1.30
[Tdg <sup>18,19</sup> , Gly <sup>20</sup> ]Sch	.68	4.08	2.00 <sup>3</sup>	2.63	.97	4.39	.48	.93
[Sch] <sub>4</sub> (Lys <sup>18</sup> ) <sub>2</sub> Lys <sup>19</sup>	1.22	4.40	1.02	1.62	.86	5.70 <sup>4</sup>	1.24	1.18

<sup>1</sup> Les valeurs indiquées pour ces trois peptides ont été ajustés par rapport aux données obtenues avec le peptide Sch.

<sup>2</sup> Glx : Gln et Glu, la Gln est convertit en Glu lors de l'hydrolyse acide

<sup>3</sup> Valeur théorique pour ces peptides : 2

<sup>4</sup> Valeur théorique pour ce peptide : 5.75

**Tableau VII. Analyse d'acides aminés du peptide**  
**[(Sar<sup>1</sup>, Lys<sup>8</sup>)Ang II]<sub>4</sub> (Lys<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, Lys<sup>10</sup>, Tdg<sup>11</sup>, Gly<sup>12</sup>**  
**ou Ang II-tétramère**

	Acides Aminés							
	Arg	Gly	His	Lys	Pro	Sar	Tyr	Val
Valeurs théoriques (μM)	1	.25	1	1.75	1	1	1	2
Valeurs observées (μM)	1.08	3.85	1.26	1.17	.73	N.D.	.76	2.00

N.D. : Non déterminé

#### 4. Marquage des peptides [Sar<sup>1</sup>]Ang II et [Sar<sup>1</sup>, Lys<sup>8</sup>]Ang II à l'iode 125.

Afin de pouvoir déterminer précisément le rapport de liaison entre l'Ang II et des protéines porteuses (voir section 5), et dans le but de doser la présence d'anticorps anti-Ang II par RIA, nous avons marqué ce peptide avec un isotope radioactif: l'iode 125. La méthode que nous avons utilisée est la méthode de marquage à l'Iodo-Gen (1, 3, 4, 6-Tétrachloro-3α-6α- diphenylglycoluril) qui permet d'ioder le résidu tyrosine du peptide (Fraker et Speck, 1978). Une solution de 0.4 μg/μl d'Iodo-Gen (25 μl) (Pierce) dans le dichlorométhane a été évaporé dans un tube étroit de polypropylène de 500μl (Starstedt). On a ensuite ajouté dans l'ordre, 100 μl de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T. Baker) 0.5 M à pH 7.2, 25 μl de peptide à concentration de 10<sup>-6</sup>M dans du KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, puis 1mCi=10μl de Na<sup>125</sup>I (Amersham). La réaction a lieu à température ambiante et a été arrêtée après 30 min. en aspirant le contenu du tube dans une seringue contenant 250 μl de KI 1M et 250 μl de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1M. Le mélange a ensuite été purifié par un appareil HPLC et les produits séparés sur colonne de résine C<sub>18</sub> (Waters). Ces derniers ont été élués avec un gradient linéaire d'acétonitrile 10 à 60% aqueux en combinaison avec du TFA 0.05% à un débit de 1 ml/min. Le peptide monoiodé marqué a été détecté à l'aide d'un compteur Geiger. L'activité spécifique du peptide marqué a été évaluée par Roger Bossé, Ph.D. (Département de pharmacologie,

Faculté de médecine, Université de Sherbrooke) à environ 400 Ci/mmoles par essai de liaison de la  $^{125}\text{I}$ -Ang II sur membrane de foie de rat (Bossé et al., 1990).

## **5. Conjugaison peptides-protéines porteuses**

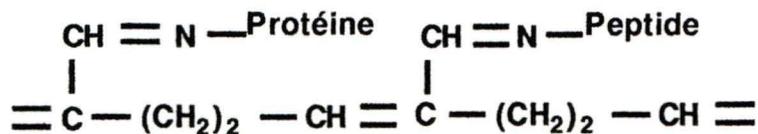
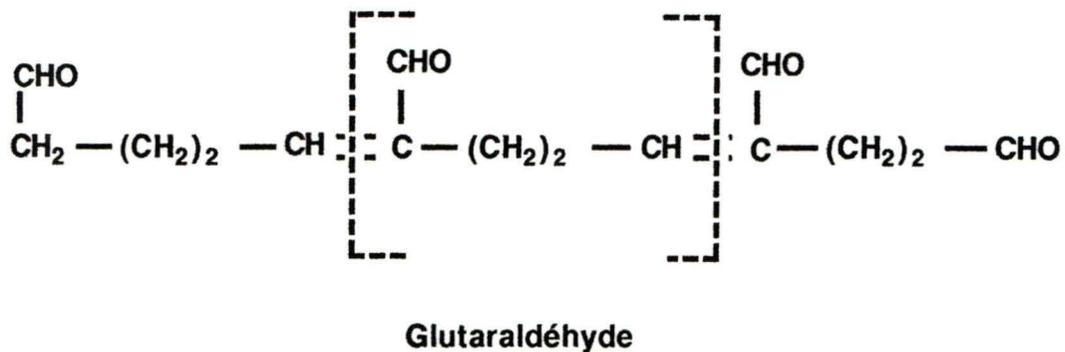
### **5.1 Méthode de couplage à la glutaraldéhyde**

La conjugaison peptide-protéine par la glutaraldéhyde introduit par Avrameas et Terninck (1969) permet avant tout la liaison des peptides et des protéines par leurs fonctions amines. Les conditions de couplage utilisées servent à optimiser la liaison entre le peptide et la protéine en tentant de diminuer la polymérisation des protéines ou des peptides entre eux. Le rapport de peptides et de protéines utilisés pour le couplage varie selon la taille de la protéine; par exemple Van Regenmortel et al. (1988) suggère un rapport de 20 à 40 moles de peptides par mole de protéine lorsque la protéine est de petite taille (ex: BSA, Mr: 67 Kd, ovalbumine, Mr: 43 Kd) et ce rapport peut être augmenté à 500 moles peptide/mole protéine pour les grosses protéines (ex: KLH, Mr: 2000 Kd).

La réaction de conjugaison a lieu à pH basique, le tampon choisi était un tampon bicarbonate  $\text{NaHCO}_3$  0.1M à pH 8.4. Le peptide et la protéine ont d'abord été dissous lentement dans le tampon à une concentration de 5 mg/ml. Quelques gouttes de diméthyl formamide (DMF) ont parfois été ajoutées pour aider à la solubilisation. 3 équivalents de glutaraldéhyde (Grade 1:25%, Sigma) utilisé à 2.5% aqueux ont ensuite été ajoutés goutte à goutte pour chaque équivalent de peptide (environ 120  $\mu\text{l}$  de glutaraldéhyde 2.5% pour 10 mg d'Ang II). Une coloration jaunâtre apparaît progressivement. La réaction a procédé pendant 3-4 h. à température ambiante, puis a été arrêtée en dialysant le conjugué contre un tampon sodique carbonate/bicarbonate 0,1M à pH 8.5 (16.8 g  $\text{NaHCO}_3$ , 2.12 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) contenant 18 g de  $\text{NaCl}$  et 0.02%  $\text{NaN}_3$  pour 2 litres d'eau, puis contre de l'eau contenant du  $\text{NaN}_3$  à 0.02% (3 X 2 litres). La dialyse a été

effectuée à 4°C sous agitation continue en utilisant des sacs à dialyse Fisher#08670-3BB avec limite d'exclusion de 12 000 à 14 000. La dialyse est nécessaire pour éliminer le peptide restant qui n'a pas été conjugué ainsi que des sous produits de la réaction qui peuvent parfois être toxiques.

**FIGURE 5:** Conjugaison à la glutaraldéhyde



#### Conjugué protéine-peptide par la glutaraldéhyde

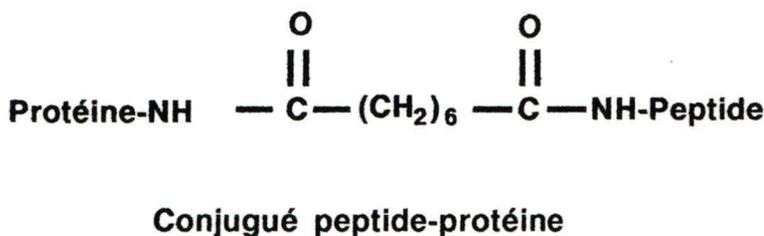
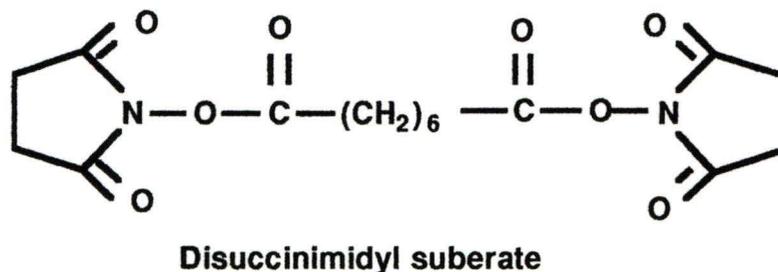
### 5.2 Couplage au disuccinimidyl suberate (DSS)

Le DSS est un réactif homobifonctionnel, qui tout comme la glutaraldéhyde, permet la liaison par les fonctions amines des peptides et des protéines. Étant donné que ce réactif n'est pas habituellement utilisé pour les conjugaisons des antigènes peptidiques, nous avons adopté une méthode de couplage utilisée pour le dimethyl suberimidate (Van Regenmortel et al. 1988).

La protéine a été solubilisé à une concentration de 2 mg/ml dans un tampon triéthanolamine-HCl 0.2M à pH 8.5. Le peptide dissout dans du DMF a ensuite été ajouté, ainsi que 5 équivalent de DSS, (Pierce) préalablement dissous dans du DMSO. On a laissé réagir pendant une nuit sous faible agitation à la température ambiante. Le

produit de conjugaison a été dialysé tel que décrit pour la méthode de la glutaraldéhyde, lyophilisé, et les concentrations de protéine déterminées par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951).

**FIGURE 6:** Conjugaison au disuccinimidyl suberate



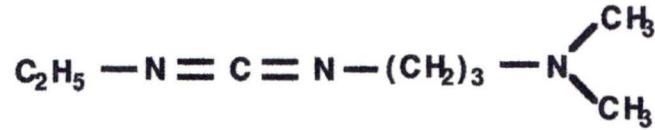
### 5.3 Couplage au chorhydrate de 1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

Les carbodiimides sont très connus pour leur utilisation en synthèse peptidique. Ils permettent entre autre le couplage des fonctions amines avec les fonctions carboxyliques et ont pour avantage d'éviter la présence d'un composé intermédiaire entre le peptide et la protéine (par exemple, la glutaraldéhyde). La méthode utilisée est dérivée de la méthode originale de Goodfriend et al. (1964).

Pour la conjugaison, on a utilisé 3 équivalents de peptide pour chaque équivalent d'amine de la protéine porteuse. La réaction a été

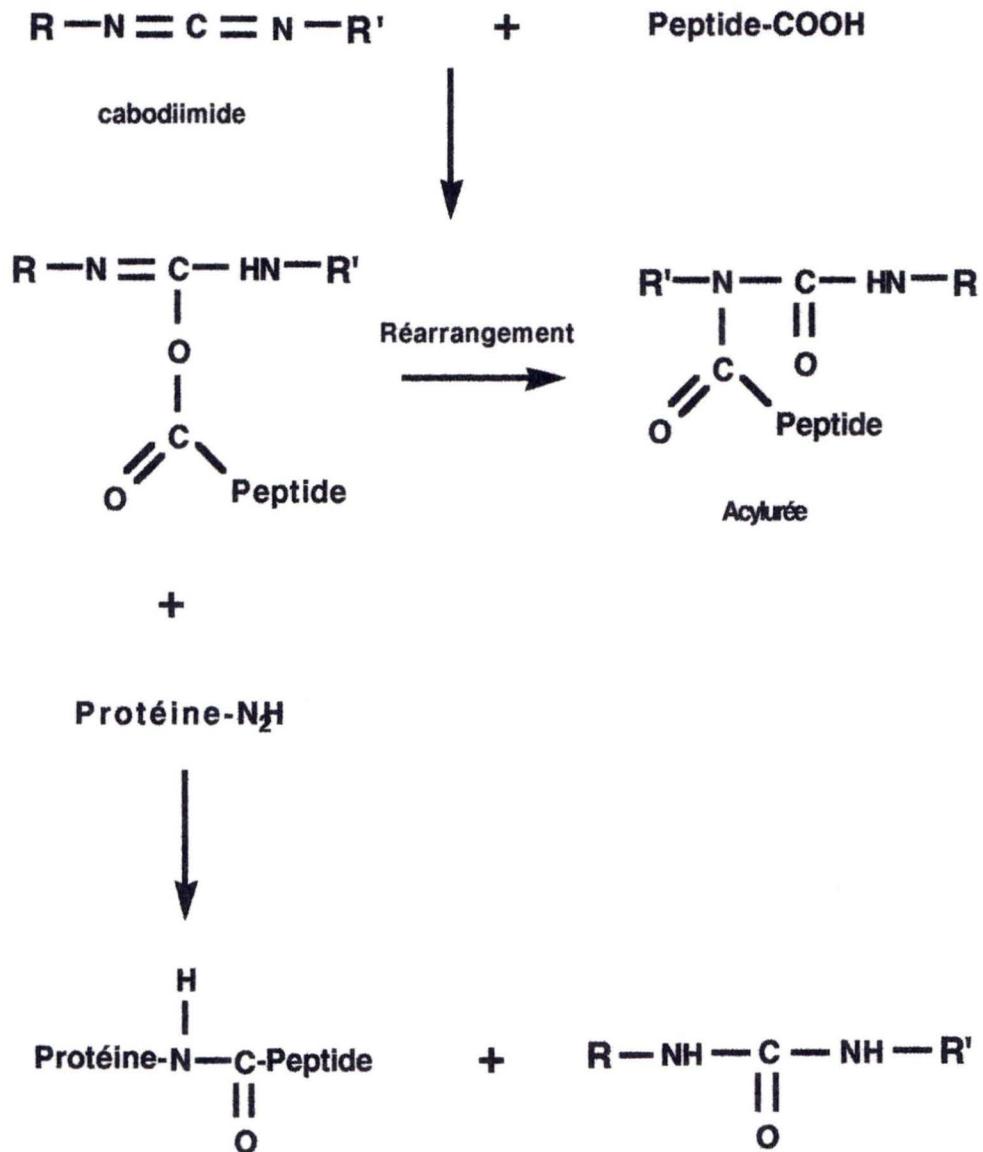
effectuée dans un tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) à 0.1M et à pH 5.5 ajusté avec de l'acide citrique 0.1M. Le peptide et la protéine ont été dissous dans un minimum de tampon, et 1 équivalent de EDC (Pierce) a été ajouté pour chaque équivalent de peptide. On a laissé réagir pendant une nuit et à la température ambiante sous agitation, puis le produit de réaction a été dialysé tel que décrit précédemment, contre de l'eau contenant du  $\text{NaN}_3$  0.02% (5 x 2 litres changer aux 4 heures). Le conjugué a également été lyophilisé et les protéines ont été dosées.

**FIGURE 7:** Conjugaison à l'1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (Goodfriend et al., 1964).



1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

**Mécanisme de réaction:**



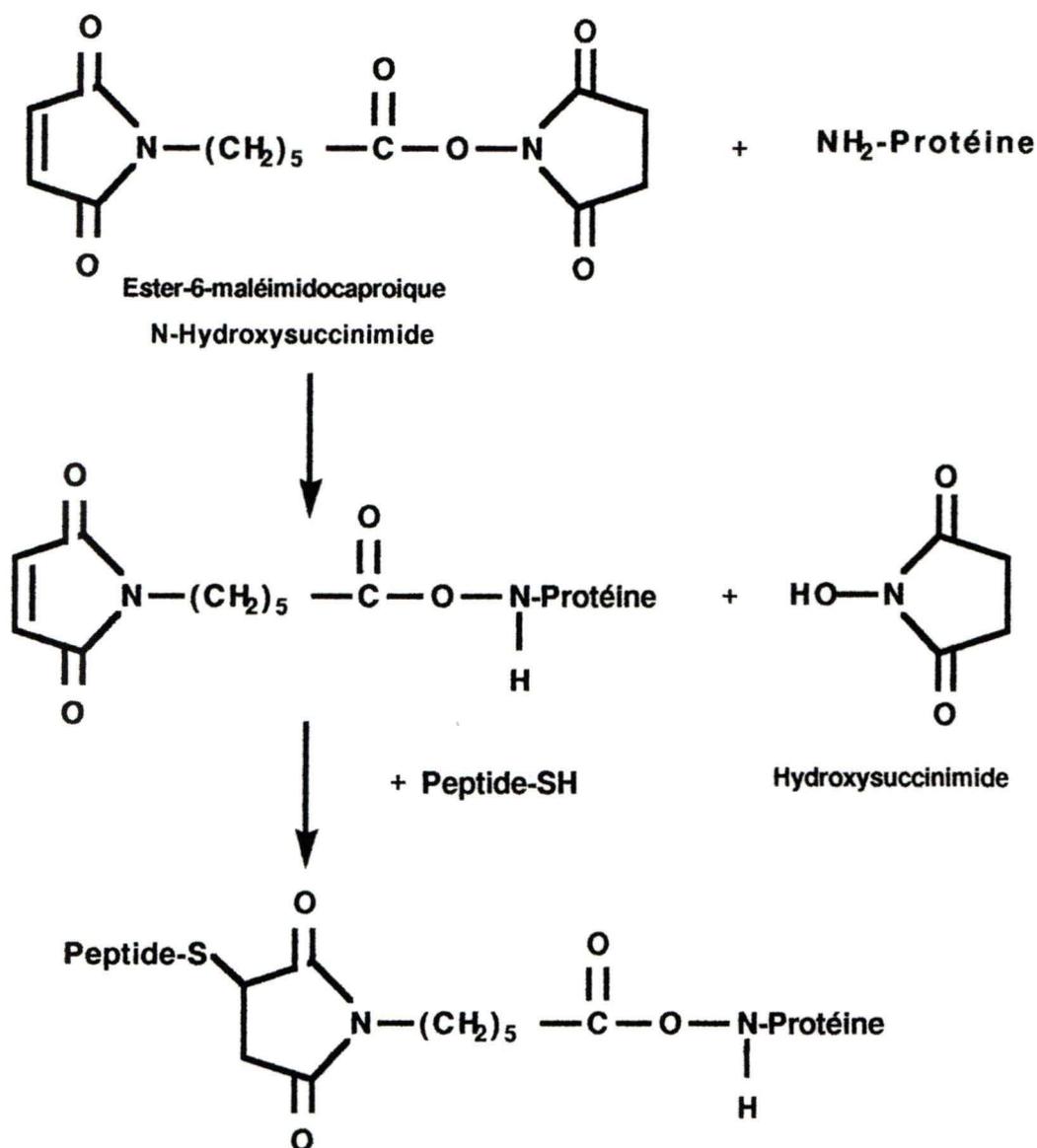
#### 5.4 Couplage à la maléimide succinimide caproïque

Cette méthode de conjugaison comporte deux étapes distinctes, soit l'activation de la protéine, suivie par l'addition du peptide qui est lié par un groupement thiol (SH) ajouté à la structure du peptide, si celui-ci ne renferme pas de résidu cystéine.

Des quantités équimolaires de protéines et de  $\epsilon$ -maléimidocaproïque N-hydroxysuccinimide (Pierce) ont été solubilisées séparément dans des volumes minimaux de tampon phosphate 0.1M à pH 6.6, et incubées ensemble sous agitation pendant 24 h. La solution a ensuite été centrifugée et le surnageant prélevé. La protéine activée a été dialysée contre le tampon phosphate, puis contre de l'eau (3 x 2 litres). Après avoir été lyophilisée, la protéine a été purifiée sur une colonne G<sub>25</sub> (Pharmacia) équilibrée et éluée avec de l'acide acétique 1% aqueux.

Dans la deuxième étape, le peptide comportant une fonction sulfhydryl protégée par un groupement acétamidométhyl a d'abord été déprotégé par un traitement à l'acétate de mercure, puis la fonction SH libre a été générée par l'ajout d'H<sub>2</sub>S sous azote et à pH acide. Le peptide a ensuite été ajouté à la protéine activée dans le tampon de départ (phosphate dibasique 0.1M, pH 6.6) dégazé sous azote. La réaction a procédé pendant une heure à la température ambiante et à l'obscurité, puis le conjugué a été dialysé contre de l'eau contenant de l'azote de sodium 0.02% (5 x 2 litres), lyophilisé, et la concentration de protéines a été déterminée.

**FIGURE 8:** Conjugaison à la maléimide succinimide caproïque



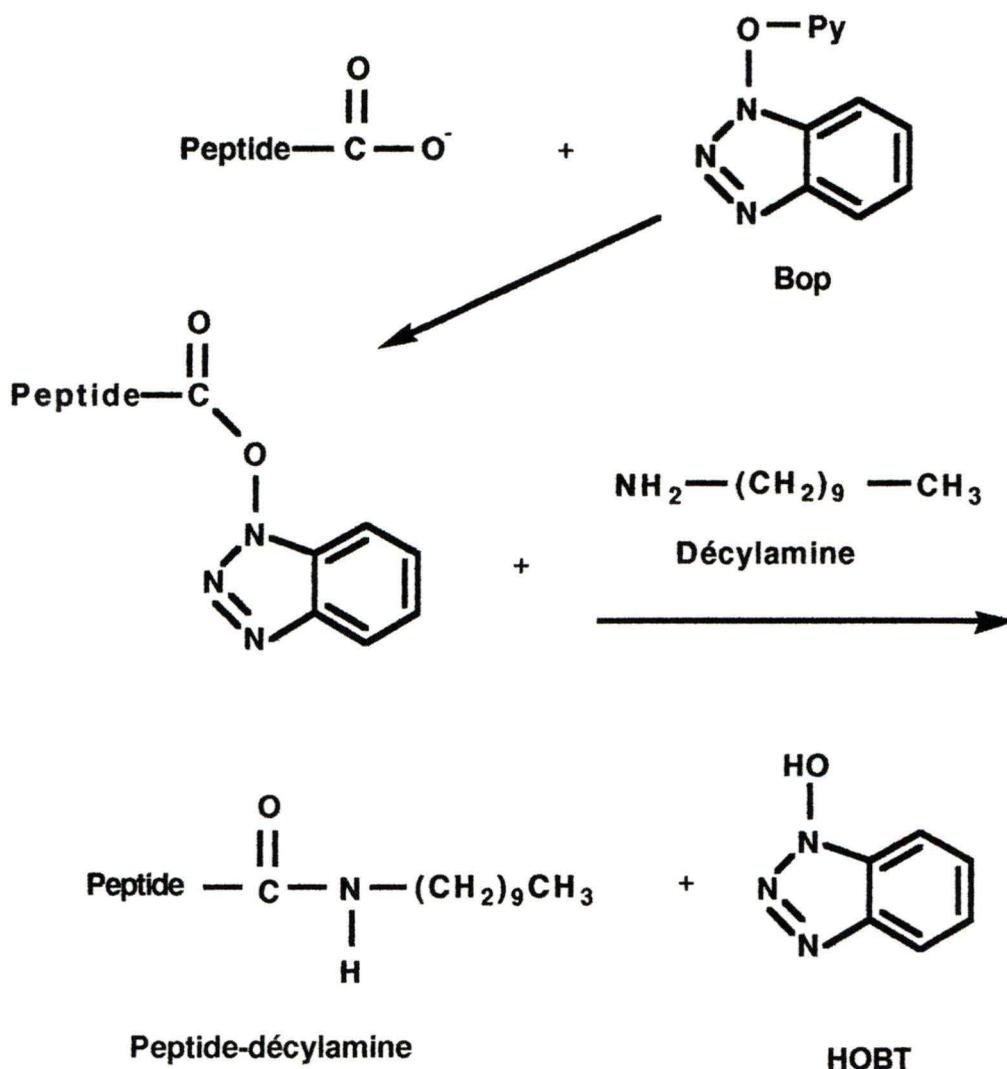
### 5.5 Couplage à l'hexafluorophosphate benzotriazolyl N-oxytrisdiméthyl aminophosphonium (Bop).

Le Bop ou hexafluorophosphate benzotriazolyl N-oxytrisdiméthyl aminophosphonium est un réactif qui permet, tel le carbodiimide, le couplage des fonctions amines aux fonctions carboxyliques (Le-Nguyen et al., 1987). Dans nos études, nous l'avons utilisé pour conjuguer l'Ang II avec un acide gras: la décylamine:

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{NH}_2$  (J.T. Baker Chemical Co.).

Le peptide a d'abord été solubilisé dans du DMF à 4°C, 7.5 équivalents molaires de Bop ont été ajoutés et le pH ajusté à 8. Par la suite, on a ajouté 7.5 équivalents molaires de décylamine (Mr: 157.3 d) par rapport au peptide, et le pH a été réajusté à 8. On a laissé sous agitation pendant 48 heures à 4°C. Le conjugué a été purifié sur une colonne  $\text{G}_{15}$  (Pharmacia) élué avec AcOH 0.2N. La pureté du conjugué a été vérifiée par HPLC et par CCM avec le système de solvant (B:A:W/5:2:3) et révélé avec la coloration de Pauly qui colore les résidus histidine (Nussberger et al., 1983).

**FIGURE 9:** Conjugaison à l'hexafluorophosphate benzotriazolyl N-oxytrisdiméthyl aminophosphonium



## **5.6 Evaluation du taux de liaison des peptides aux protéines.**

Tel qu'indiqué à la section 4, le taux de liaison de l'Ang II a été déterminé en utilisant de l'Ang II marquée à l'iode 125 ( $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^4\text{Ang II}$ ). Environ  $5 \times 10^6$  CPM d' $^{125}\text{I}$ -Ang II (400 Ci/mole) a été ajouté à l'Ang II non marqué lors du couplage, et la radioactivité totale du conjugué a été déterminée à la fin de la dialyse (compteur  $\gamma$  LKB Wallac). Le peptide radioactif qui demeure à l'intérieur du sac suite à la dialyse a été considéré couplé à la protéine. Le peptide non couplé est éliminé pendant la dialyse (N.B. des expériences témoins en absence d'agent de couplage ont été effectués et ont permis de confirmer cette affirmation). Le pourcentage de peptides marqués couplés aux protéines est représentatif du pourcentage total de liaison du peptides. Cette méthode est considérée comme la plus efficace pour déterminer le rapport de liaison des peptides à des protéines (Van Regenmortel et al., 1988).

## **5.7 Dosages de protéines (Méthode de Lowry et al., 1951)**

Les échantillons de conjugués peptides-protéines ont été dissous dans un tampon bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$  0.1M) à des concentrations de 50, 100 et 200  $\mu\text{g/ml}$ .

Réactifs de dosage:

Réactif A = 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans 0.1N NaOH.

Réactif B = 0.5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans 1% NaK tartrate

Les réactifs A et B ont été mélangés dans un rapport 50 à 1 respectivement, puis 2 ml de cette solution a été ajoutés à 200 $\mu\text{l}$  d'échantillon ou de protéines de références. Du réactif Folin Ciocalteu 1N (200  $\mu\text{l}$ ) a ensuite été ajouté et mélangé, et la réaction procède pendant 30 minutes. La densité optique est lue à 660nm.

Tableau VIII Efficacité des réactions de couplages peptides-protéines effectuées

Méthode	Protéine	Peptide <sup>1</sup>	Rapport (mole) peptide/protéine théorique	Rapport (mole) peptide/protéine expérimentale <sup>2</sup>	% de protéine
Glutaraldéhyde	Ovalbumine	Sch	23	N.D. <sup>3</sup>	70
	Thyroglobuline	[Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II	691	24	12
	KLH	[Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II	898	98	80
DSS	KLH	Sch	497	N.D.	69
	KLH	[Sar <sup>1</sup> ]Ang II	809	108	70
EDC	BSA	[Sar <sup>1</sup> ]Ang II	169	8.5	10
	BSA	[Sar <sup>1</sup> ]Ang II	169	9.65	13
	BSA	[Sar <sup>1</sup> ]Ang II	169	4.86	78
Maléimide	BSA	[Sar <sup>1</sup> ,Phe <sup>8</sup> SH]Ang II	45	N.D.	25
Bop	Décylamine <sup>4</sup>	[Sar <sup>1</sup> ]Ang II	5	N.D.	N.D.

1: Ovalbumine Mr: 43 000;

Thyroglobuline Mr: 669 000;

KLH: hémocyanine de patelle Mr:  $2 \times 10^6$  ;

BSA: Albumine bovine Mr: 67 000

2: Mesuré avec <sup>125</sup>I-Ang II

3: N.D.= Non déterminé

4: Décylamine: acide gras, Mr: 157.3

## 6. Immunisations

Les peptides utilisés pour l'immunisation étaient pour l'Ang II: 1- [Sar<sup>1</sup>]Ang II; 2- [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8</sup>]Ang II; 3- [Sar<sup>1</sup>,Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>8</sup>]Ang II; 4- [Sar<sup>1</sup>,O-octadécyl-Tyr<sup>8</sup>]Ang II; 5- [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8,9,10</sup>,Gly<sup>11</sup>]Ang II; 6- Ang II-tétramère; 7- [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA, 8- [Sar<sup>1</sup>,Phe<sup>8</sup>-SH]Ang II-MBSA; 9- [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-Thyroglobuline.

Les dérivés de l'antigène du Schistosome suivant ont été utilisés: 1- Sch; 2- [Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>18</sup>,Gly<sup>19</sup>]Sch; 3- [Tdg<sup>18</sup>,Tdg<sup>19</sup>, Gly<sup>20</sup>]Sch; 4-Sch-tétramère; 5- Sch-OVA.

La BSA seule a également été utilisée comme antigène pour l'immunisation.

### 6.1 Préparation de l'antigène

Tout le matériel d'immunisation (solutions tampons, seringues, tubes de verre) a d'abord été stérilisé à l'autoclave. Les peptides conjugués ou non ont été pesés et dissous aux concentrations appropriées dans un tampon PBS 0.1M pH 7.4. Pour chaque antigène, un volume équivalent d'adjuvant de Freund a été ajouté au tampon PBS dans de petits tubes de verre (4ml), puis l'émulsion des deux phases liquides a été créée en prélevant la phase aqueuse avec une seringue de verre de 1ml munie d'une aiguille de 1 1/2" x 18 1/2 G, et en la rejetant sous pression dans l'adjuvant avec une aiguille plus fine de 26 G 1/2 (Becton-Dickinson). L'opération a été répétée jusqu'à la formation d'une émulsion homogène et stable. Cette dernière condition est nécessaire pour assurer l'efficacité de l'adjuvant d'immunisation (Cooper et Wiley, 1977).

### 6.2 Injections

Les peptides ont été injectés i.p. à des souris BALB/c femelles adultes (Charles River, St-Constant, Québec), dans un volume de

200ul (100ul PBS/100ul adjuvant). Pour les premières immunisations, l'adjuvant complet de Freund (Sigma) a été utilisé alors que les rappels ont été faits avec de l'adjuvant incomplet (Sigma). On a effectué 5 à 8 rappels par souris à des intervalles de deux semaines. Lors d'une première immunisation, les doses d'Ang II non conjuguées étaient de 70 nmoles, et de 50 nmoles pour les rappels. L'Ang II conjuguée à la BSA a été injectée à une dose de 50 µg de protéine (3.5 à 6.5 nmoles d'Ang II) pour la première injection et avec 30 µg (2.1 à 3.9 nmoles d'Ang II) pour les immunisations subséquentes. La BSA non conjuguée a été injectée aux mêmes concentrations. Toutes les immunisations avec les peptides dérivés de l'antigène du Schistosome (conjugué ou non à des protéines), ont été faites avec une première injection de 83 µg de protéines, et les rappels avec 50µg.

Pour chacun des antigènes, des groupes de 4 souris ont été injectés, à l'exception de la [Sar<sup>1</sup>]Ang II - BSA (8 souris), la BSA non conjuguée (3 souris), la Sch-OVA, la [Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>18</sup>, Gly<sup>19</sup>]Sch et la [Tdg<sup>18</sup>,Tdg<sup>19</sup>, Gly<sup>20</sup>]Sch (6 souris).

### **6.3 Prélèvements sanguins**

Les prélèvements sanguins ont été effectués à l'extrémité de la queue des souris, 5 jours après chacun des rappels. On a recueillie 500 µl de sang dans des tubes coniques de 1.5 ml, on a laissé coaguler pendant 1 à 2 h. puis le sang a été centrifugé pendant 15 min. à 800g. Le sérum a été prélevé, aliquoté et conservé à -20°C. De 20 à 300 µl de sérum sont obtenus pour des volumes de 50 à 600 µl de sang prélevé par souris. Du sérum provenant de 11 souris non-immunisées a également été périodiquement récolté.

## **7. Essai ELISA**

Les anticorps anti-peptides ont été dosés dans des plaques ELISA à 96 puits (Maxisorp Nunc Immunoplate I, Gibco Canada). La

[Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH et la Sch-KLH ont été principalement utilisées pour la détection des anticorps, mais les peptides [Sar<sup>1</sup>]Ang II, [Sar<sup>1</sup>]Ang II-décylamine, [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-KLH, l'Ang II-tétramère, la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-thyroglobuline, le Sch-tétramère et le Sch ont également été testés pour cette fonction.

Un volume de 100µl de [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH à 20 µg/ml ou de 100 µl de Sch-KLH à 40 µg/ml a d'abord été incubé avec un tampon sodique carbonate/bicarbonate 0.1M à pH 9.6 (42.4 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 71.4 mg NaHCO<sub>3</sub>, 100 ml d'eau) dans des plaques ELISA pendant une nuit à la température ambiante. Les puits ont ensuite été vidés puis traités avec une solution de lait en poudre à 1% (i.e. 1 g/100 ml) dans du tampon PBS 0.01M pH 7.4, puis laissé pendant une heure à la température ambiante. La plaque a été lavée deux fois avec du tampon PBS 0.01M additionné de lait en poudre 0.2% et de Tween 20 (polyoxyéthylène-sorbitan-monolaurate, Sigma) 0.4% v/v, ce qui correspond à la solution de lavage aussi utilisée pour les étapes de lavages ultérieures.

Des dilutions sériées de 100 µl de séra immuns dans la solution de saturation ont été ajoutés aux puits et incubés pendant deux heures à 37°C. Les plaques ont été relavées avec la solution de lavage (3 fois), et 100 µl d'anticorps anti-IgG ou anti-IgM de souris conjugués à la peroxydase (Sigma) dilués 1000 ou 5000 fois dans la solution de saturation, a été ajoutés aux plaques qui ont été réincubées deux heures à 37°C. Suite à une dernière série de lavage, le substrat a été ajouté pour permettre une détection colorimétrique: un volume de 100 µl d'ortho-phénylènediamine dihydrochloride (Sigma) à une concentration de 0.4mg/ml dans du tampon phosphate-citrate 0.05M à pH 5.0 (25.7 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M, 24.3 ml acide citrique 0.1M, 50 ml d'H<sub>2</sub>O) et avec 0.05% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été ajouté à chaque puits. La réaction se déroule à l'obscurité pendant 30 min. et est arrêtée par l'addition de 100 µl de HCl 1N. La densité optique a été déterminée à 492 nm à l'aide d'un lecteur ELISA (BioRad Model 3550).

Le titre en anticorps a été défini comme étant l'inverse de la

plus grande dilution de sérum donnant une densité optique de 0.1 supérieur au bruit de fond. Ce dernier a été déterminé en utilisant la protéine non conjuguée (KLH seul) comme antigène de détection. Chaque dilution de sérum a donc été testée en duplicata avec le peptide conjugué à la KLH et aussi en duplicata avec la KLH seul.

## 8. Essai RIA

Du charbon activé comprenant 0.1% de Dextran (Schwarz, Omgeberg, New York) (2 g/l), 1% de charbon (Schwarz, Omgeberg, New York) (20 g/l) et 0.2% d'azoture de sodium a été préparé dans du tampon Tris-HCl 0.15M à pH 8.0.

Les substances suivantes diluées dans un tampon PBS 0.1M à pH 7.4 contenant 0.2% de BSA ont été respectivement ajoutés dans des tubes de polystyrènes, soit un volume de 50  $\mu$ l d'[<sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>]Ang II (50 000 cpm), un volume de 50  $\mu$ l d'une concentration croissante d'Ang II jusqu'à concurrence de  $10^{-6}$ M (concentration finale), puis un volume de 200  $\mu$ l de diverses dilutions des séra. Le tout a été mélangé, et incubé pendant deux heures à 37°C. Un volume de 150  $\mu$ l de la préparation de charbon activé a été ajouté à chaque tube et laissé pendant 10 min. à 4°C. Les tubes ont été centrifugés à 2 500 g pendant 15 min. à 4°C, puis le surnageant a été prélevé et compté au compteur  $\gamma$  (LKB Wallac). Les comptes obtenus indiquent le taux de peptides marqués complexés avec les anticorps sériques. Chaque dilution de sérum a été dosée en triplicata. La liaison totale a été déterminée en absence d'Ang II non radioactive, et la liaison spécifique a été déterminée en soustrayant la liaison obtenue en présence d'une concentration saturante d'Ang II non radioactive ( $10^{-6}$ M).

## II- Liaison covalente de peptides aux plaques ELISA

### 1. Synthèse et purification des peptides

#### 1.1 Tableau IX Peptides utilisés pour évaluer la méthode de liaison covalente

Nom	Structure primaire	Poids moléculaire
CGRP 1-37	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-CONH <sub>2</sub>	3786.2
CGRP 12-37	LAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-CONH <sub>2</sub>	2632.5
CGRP 25-37	NNFVPTNVGSKAF-CONH <sub>2</sub>	1393.8
CGRP 28-37	VPTNVGSKAF-CONH <sub>2</sub>	1018.3
CGRP 30-37	TNVGSKAF-CONH <sub>2</sub>	893.0
CGRP 32-37	VGSKAF-CONH <sub>2</sub>	607.8
CGRP 34-37	SKAF-CONH <sub>2</sub>	450.6
[Sar <sup>1</sup> ]Ang II	Sarcosyl-RVYVHPF-COOH	988.9
[Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II	Sarcosyl-RVYVHPK-COOH	969.2
[Sar <sup>1</sup> ,Aca <sup>8</sup> ,Lys <sup>9,10,11</sup> ]Ang II	Sarcosyl-RVYVHPAca <sup>*</sup> KKK-COOH	1356.8
gp41, HIV-1 592-604	LGIWGCSGKLIC-COOH	1391.7
NK-1	Palmitoyl-PYINPDLYLKK-COOH	1604.8
AIP	HDMKKVLDS-COOH	1072.3
Substance K modifié	AcaHKTDSAcaC-COOH	1164.3
Substance P (4-11) modifié	PKKWFWWF-CONH <sub>2</sub>	1222.5
Toxoplasme	RLLPGGLQQGRGNVGPERRGG-COOH	2018.3

\* Aca : acide aminocaproïque

## 1.2 Provenance ou synthèse des peptides

Les peptides CGRP 1-37, 12-37, 25-37, et 28-37 sont des dons du Dr A. Fournier INRS-Santé, Pointe Claire, Québec. L'ACTH est de Organon Canada LTD, Toronto, Ontario. Le peptide de la toxoplasmose est un don du Dr A. Tartar Institut Pasteur de Lille, France.

Les autres peptides ont été synthétisés pour le laboratoire par Richard Laprise et Benoit Desprez (Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke) (Merrifield, 1963, Barbeau et al., 1992).

Le peptide 592-604 gp41 HIV-1 est un peptide dont la séquence d'acides aminés été déduit de la séquence d'ADNc du virus HIV-1 et correspond à un épitope majeur du virus. La séquence d'acides aminés du peptide 308-318 NK-1 a été déduit de l'ADNc du récepteur NK-1 des neurokinines (Shigemoto et al., 1990) et représente la boucle extracellulaire situé entre les domaines transmembranaires 6 et 7 du récepteur. Le peptide toxoplasmose est un épitope majeur du parasite responsable de cette maladie.

## 1.3 Purification des peptides

Les peptides [Sar<sup>1</sup>]Ang II, [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II, 592-604 gp41 HIV-1, la substance K modifié et la substance P (4-11) très modifié ont été purifiés par Marie-Reine Lefebvre (Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke). Suite au clivage par HF (voir I section 2.2 ), les peptides CGRP 30-37, 32-37 et 34-37 ont été déssalés sur une colonne G<sub>15</sub> (Pharmacia) éluée avec AcOH 0.2N. Une pureté supérieure à 90%, observée par analyse HPLC (détecté à une longueur d'onde de 217 nm), a été obtenue pour chacun de ces peptides (profils chromatographiques analytiques, annexes 8, 9 et 10). Suite à l'hydrolyse acide des peptides, l'analyse en acides aminés a permis de confirmer la présence de chacun des acides aminés. Le poids moléculaire des peptides a également été confirmé par analyse des spectres de masse (I- section 3, et annexes 11, 12 et 13).

Le peptide [Sar<sup>1</sup>,Aca<sup>8</sup>,Lys<sup>9, 10, 11</sup>]Ang II a d'abord été déssalé sur une colonne G<sub>25</sub> (Pharmacia) élué avec AcOH 0.2N, puis chromatographié sur une colonne C<sub>18</sub> à phase inversée (Waters) éluée avec un gradient linéaire eau-acétonitrile en combinaison avec du TFA 0.05%. L'analyse HPLC des produits bruts et purifiés a permis de démontrer une amélioration de pureté de 58% (brut) à 90% après purification (annexes 14 et 15).

Le peptide 308-318 NK-1 a été chromatographié sur une colonne LH-20 (Sigma) élué avec du DMF distillé. La pureté et l'identité du peptide ont également été vérifiés par analyse HPLC, CCM et par spectrophotométrie de masse.

## **2. Irradiation et activation des plaques de polystyrène**

Les plaques de polystyrène ont été soumises à des radiations gamma émises par une source de <sup>60</sup>Cobalt 1.1732 MeV à température ambiante et une intensité moyenne de 38.8 rad/sec, jusqu'à une dose cumulative optimale de 3.5 Mrad. Les plaques ont ensuite été activées pendant 30 min. avec 0.1M N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, Aldrich) et 0.1M N-hydroxysuccinimide (NHS 97%, Aldrich) dissous dans du DMSO (25 µl/puits). Les puits ont ensuite été rincés avec de l'eau, puis asséchés. Un volume de 100 µl de peptides à une concentration de 10 µg/ml dans de l'eau a été ajouté aux puits et incubé à la température ambiante pendant une nuit.

Plusieurs paramètres ont été variés pour étudier leurs effets et pour optimiser la liaison des peptides. Les facteurs suivants ont été étudiés: le type de plaque ELISA, la concentration de l'antigène peptidique, le temps d'irradiation, la concentration et le type d'agent de couplage, le pH du tampon de couplage, l'irradiation en présence d'un acide insaturé, l'effet de l'irradiation et de l'activation, et l'effet du temps séparant l'irradiation et l'activation des plaques.

### **3. Evaluation de la liaison covalente**

La liaison covalente a été évaluée avec de la [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>]Ang II. Une concentration de  $2 \times 10^{-8}$  Ci de [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>]Ang II (50 000 cpm) dilué avec de l'Ang II à une activité spécifique finale de 50 mCi/mole (1 µg) a été ajouté à chaque puits. Après une nuit d'incubation, la plaque a été rincé à l'eau, les puits ont été séparés à l'aide d'une scie et comptés individuellement au compteur gamma (LKB Wallac) de façon à évaluer la liaison totale du peptide. Chaque puits a ensuite été lavé 4 x 5 minutes avec du détergent SDS (Fischer) 5% aqueux à 100°C, et recompté pour l'évaluation de la liaison covalente des peptides au polystyrène.

### **4. Essai ELISA avec des peptides liés de façon covalente à du polystyrène**

Les détails de la procédure ELISA utilisée sont décrits à la section I no. 7 des méthodes. Les peptides ont toutefois été ajoutés aux plaques irradiées et activées tel que décrit ci-haut. Les peptides qui ont été utilisés pour la détection des anticorps en ELISA sont le CGRP et ses fragments carboxy-terminaux, l' Ang II, et l'épitope de la toxoplasme. Tout les peptides ont été utilisés à une concentration de 10 µg/ml. Les anticorps polyclonaux anti-CGRP (Amersham) ont été produits chez le lapin et sont spécifiques à la partie carboxy-terminale des peptides. Les anticorps anti-Ang II ont été produits chez la souris tel que décrit à la section I no. 6 des méthodes, et les anticorps anti-toxoplasme proviennent de sérum de souris infectées par le parasite et ont été généreusement fournis par l'Institut Pasteur de Lille. La révélation de ces anticorps a été effectuée avec des anti-IgG de souris produits chez la chèvre et conjugués à la peroxydase (Sigma), utilisée à une dilution finale de 1 : 1000.

Suite à la lecture des D.O., les plaques ELISA ont été lavées avec du détergent SDS 5% aqueux bouillant, entreposées à la température ambiante ou à -20°C durant différentes périodes de

temps, puis retestées pour évaluer la possibilité de conserver et de réutiliser des plaques contenant des antigènes liés de façon covalente.

### **III- Reconnaissance croisée des antagonistes non-peptidiques de l'angiotensine II par des anticorps anti-angiotensine II.**

#### **1. ELISA de compétition**

Dans cette étude, les séra de souris immunisées avec l'Ang II (8 souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II couplée à la BSA par le carbodiimide (EDC)) ont été utilisés. (Voir section I du matériel et méthodes). Les dilutions de séra donnant 50% de la D.O. maximale observée en ELISA ont d'abord été déterminées pour chacun des séra en utilisant la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH (conjugué à l'aide de DSS), et la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-KLH (conjugué avec la glutaraldéhyde) comme antigènes servant à la détection des anticorps spécifiques. L'utilisation de ces deux antigènes permet d'exposer les deux extrémités de l'Ang II (tableau X). Les séra ont ensuite été préincubées pendant deux heures à 37°C soit avec une concentration fixe de peptide [10<sup>-4</sup>M] ou d'autre composés [10<sup>-3</sup>M] ou avec des concentrations croissantes [10<sup>-13</sup>M à 10<sup>-2</sup>M] de ces mêmes substances (tableau XI). Les séra ainsi préincubés ont ensuite été testés par une méthode ELISA conventionnelle (section I no. 7 des méthodes). Les résultats obtenus ont été comparés aux D.O. mesurés en absence de substances ajoutés au sérum. Le pourcentage d'inhibition de la liaison des anticorps dû à la présence des substances ajoutés au sérum est calculé comme étant:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \times \left[ 1 - \frac{A_{492} \text{ en présence de substances ajoutés }}{A_{492} \text{ en absence de substances ajoutés}} \right]$$

où A<sub>492</sub> représente l'absorbance (ou la D.O.) observé à 492nm.

Afin de s'assurer de la spécificité de compétition des anticorps anti-Ang II, des séra de souris immunisées avec le peptide Sch-OVA (section I du matériel et méthodes) ont également été



**Tableau XI Substances utilisés pour tenter d'inhiber la liaison des anticorps anti-angiotensine II**

Substances	Nom
Analogues non-peptidiques de l'Ang II:	AT <sub>1</sub> : Dup 532, Dup 753, Exp 3174, L-158,809 AT <sub>2</sub> : PD 123177, PD 123319
Agoniste peptidique de l'Ang II:	[Sar <sup>1</sup> ]Ang II
Antagonistes peptidiques de l'Ang II:	Saralazine, [Sar <sup>1</sup> ,Phe(Br <sub>5</sub> ) <sup>8</sup> ]Ang II
Peptides témoins:	ACTH
Antagonistes non-peptidiques témoins:	Naloxone (antagoniste des opioïdes) CP-96,345 (antagoniste NK <sub>1</sub> des neurokinines)

## 2. Provenance ou synthèse des substances utilisées

Les antagonistes non-peptidiques provenaient de dons de compagnies pharmaceutiques: les antagonistes Dup 532, Dup 753 et Exp 3174 de Dupont-Merck Research Institute (Mississauga, Ontario), le L-158,809 de Merck Sharp & Dohm (Rahway, N.J.), le PD-123,177 et le PD-123,319 de Parke-Davis/Warner-Lambert & Co. (Ann Arbor, Michigan), et le CP-96,345 de la compagnie Pfizer (Indianapolis, In).

Les peptides [Sar<sup>1</sup>]Ang II, Saralazine et [Sar<sup>1</sup>,Phe (Br<sub>5</sub>)<sup>8</sup>]Ang II ont été synthétisés dans notre laboratoire.

L'ACTH provenait de Organon Canada LTD (Toronto, Ontario) et la Naloxone de Sigma (St-Louis, MO).

## **RÉSULTATS**

### **I- Propriétés immunogéniques des peptides à chaînes pseudo-lipidiques**

#### **1. Premières observations**

##### **1.1 Solubilité des antigènes**

Lors de la préparation des antigènes préalablement aux immunisations, ces derniers ont en général d'abord été dissous dans un tampon phosphate avant d'être émulsifiés avec l'adjuvant. Les peptides à longues chaînes aliphatiques se dissolvaient toutefois parfois difficilement dans ce tampon. Pour faciliter la préparation des antigènes, certains des peptides comportant des acides aminés pseudo-lipidiques ont donc d'abord été mis en suspension dans l'adjuvant avant d'être émulsionnés avec le tampon phosphate.

##### **1.2 Effets nocifs des adjuvants de Freund**

Suite à des injections (i.p.) répétées de FCA et de FIA, nous avons pu constater la perte de poils au niveau du crâne et/ou du museau chez environ 10% des souris. Aucun autre signe de toxicité n'était évident chez ces souris avec les différents antigènes utilisés.

#### **2. Dosage des anticorps anti-angiotensine II**

##### **2.1 Spécificité de l'ELISA**

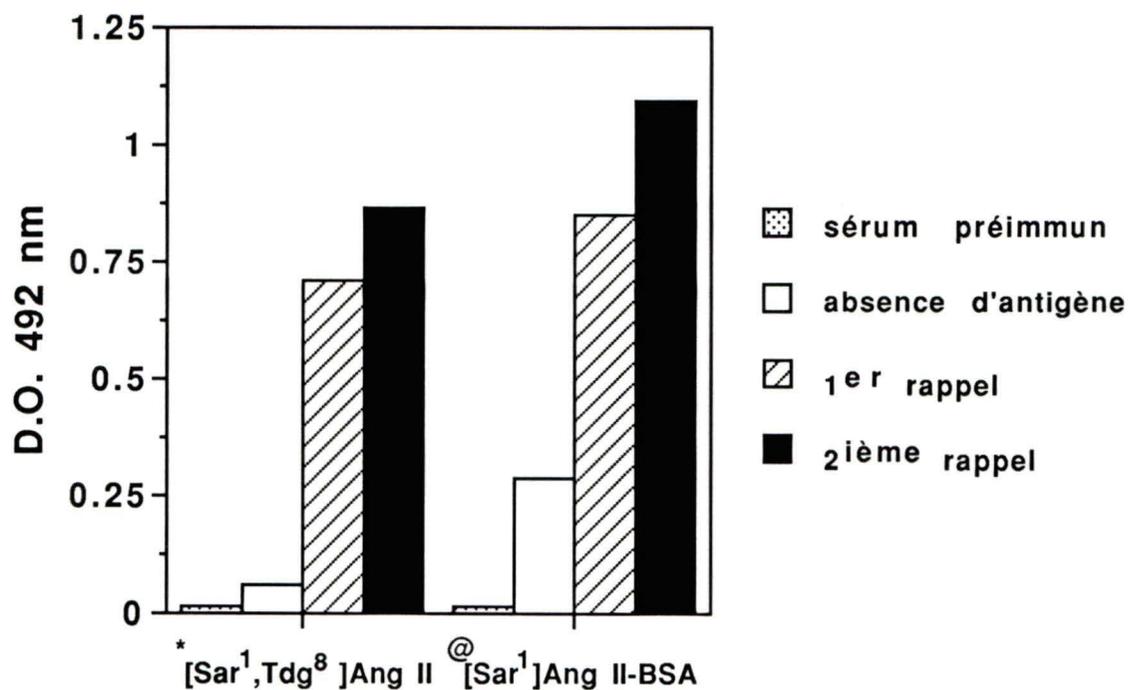
Le but de la première partie de ce travail était de vérifier la production d'anticorps spécifiques chez des souris immunisées avec l'Ang II comportant des acides aminés pseudo-lipidiques, par rapport à l'utilisation d'Ang II non-conjugué ou couplée à une protéine porteuse.

Nous avons choisi l'ELISA pour comparer la production

d'anticorps étant donné sa simplicité et son efficacité. Dans les premiers essais, l'Ang II conjuguée à la décylamine ([Sar<sup>1</sup>]Ang II-décylamine) a été employée pour la détection des anticorps anti-Ang II, car il a été démontré que l'adsorption au polystyrène pouvait être améliorée par les propriétés hydrophobes de longues chaînes aliphatiques ajoutées à des peptides (Hummel et al., 1988).

La figure 10 illustre des résultats représentatifs obtenus avec cette méthode avec une dilution de sérum minimale de 100 fois. Afin de mesurer uniquement la liaison spécifique des anticorps, il est important de soustraire à chaque sérum la liaison non spécifique, c'est à dire la D.O. obtenue en absence d'antigène dans la plaque. Par exemple à la figure 10, la liaison non spécifique est plus élevée (D.O.=0.228) après le premier rappel (2 injections) avec le sérum de souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA, qu'avec la [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8</sup>]Ang II (D.O.=0.060). On peut noter de plus l'absence d'anticorps anti-Ang II de type IgG dans le sérum de la souris non-immunisée (sérum pré-immun), tandis qu'il semble y avoir des anticorps reconnaissant spécifiquement le peptide chez les souris immunisées. Ce taux d'anticorps augmente d'ailleurs au second rappels d'immunisations.

Les résultats illustrés à la figure 11 nous montrent toutefois que lorsque les puits sont préincubés en présence d'un tampon seulement, sans antigène, on observe une augmentation de la D.O. obtenue avec les séra des souris immunisées. L'absorbance atteint presque le niveau obtenu en présence de l'antigène Ang II-décylamine. Il semblerait donc que les anticorps dosés dans les séra de la figure 10 représenteraient uniquement une augmentation de la liaison non spécifique des anticorps, dû à la préincubation des puits avec le tampon de liaison. Il est à noter que cette augmentation de liaison non spécifique a été observée avec plusieurs types de plaques ELISA, et ce malgré l'étape de saturation des puits précédant l'ajout des séra. L'augmentation du taux d'anticorps observé après le deuxième rappel démontre que la liaison non spécifique est probablement proportionnelle aux taux d'anticorps totaux présents dans les séra. De fait cette liaison non spécifique est presque absente



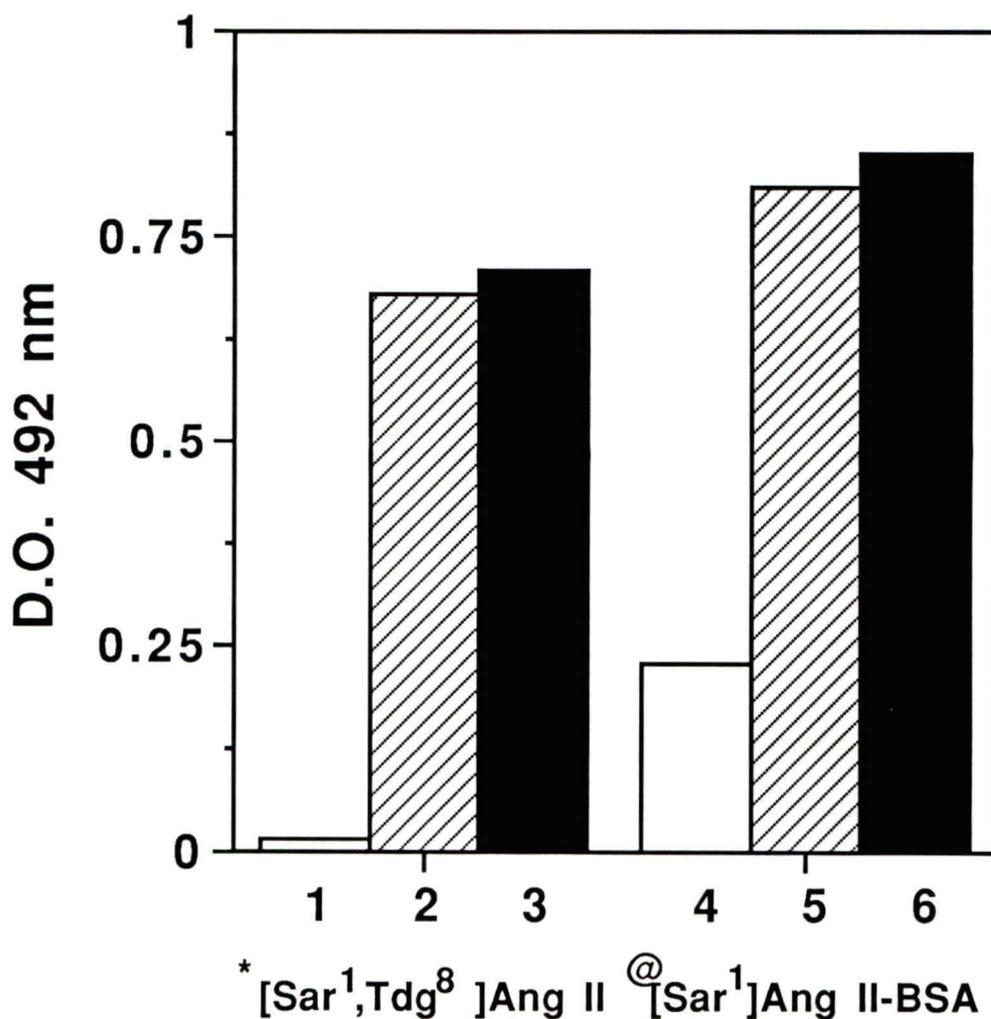
**FIGURE 10:** Essai ELISA réalisé en utilisant la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-décylamine pour la détection d'anticorps anti-Ang II

La figure illustre un résultat représentatif de l'ensemble des dosages effectués, et non la moyenne des résultats obtenus.

Les sera utilisés ont été dilués 100 fois.

\* Sérum de souris immunisée avec [Sar<sup>1</sup>, Tdg<sup>8</sup>]Ang II.

@ Sérum de souris immunisée avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA.



**FIGURE 11:** Liaison comparative des anticorps mesurée par essais ELISA en présence et en absence d'antigène ([Sar<sup>1</sup>]Ang II-décylamine)

La figure représente un résultat représentatif de l'ensemble des dosages effectués. Les sera ont été utilisés à une dilution 1 : 100.

\* Sérum de souris injectée avec [Sar<sup>1</sup>, Tdg<sup>8</sup>]Ang II.

@ Sérum de souris injectée avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA.

**Colonnes 1 et 4:** Puits non traités avant l'ajout du sérum.

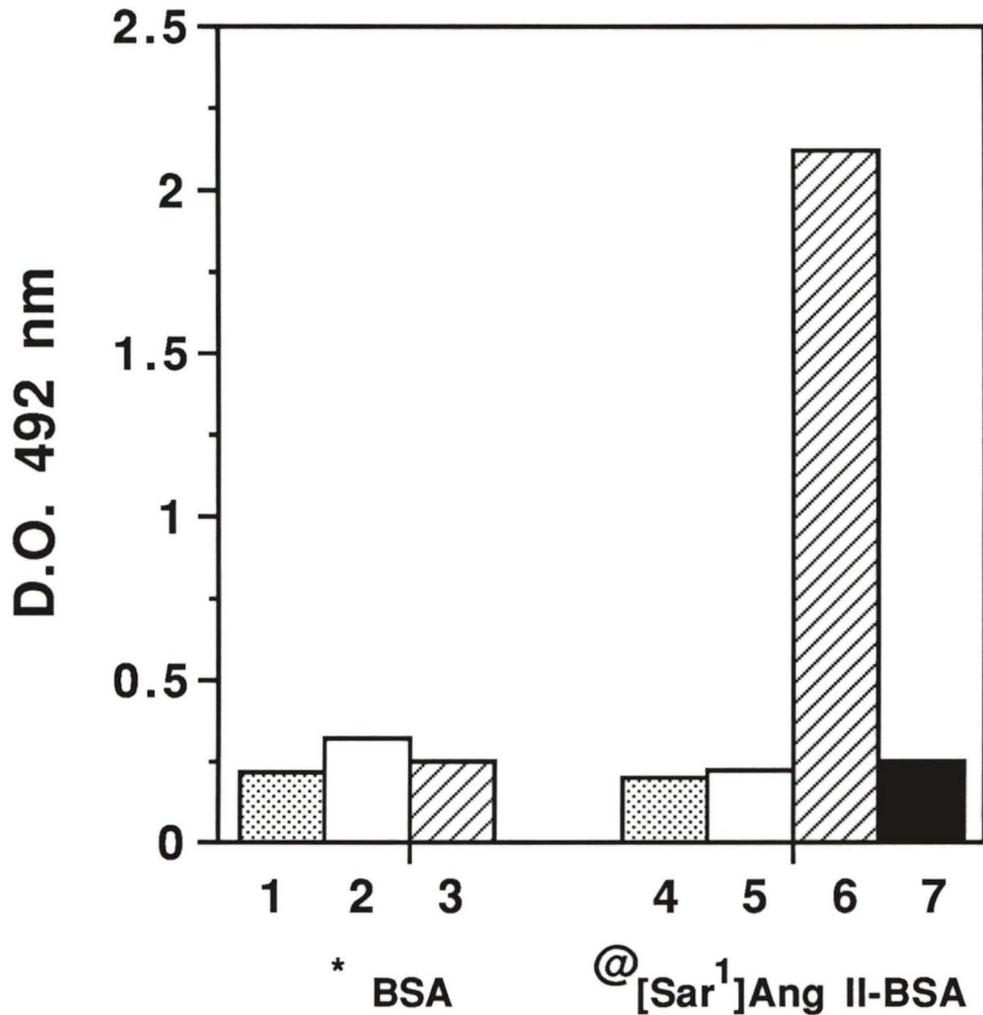
**Colonnes 2 et 5:** Puits préincubés 12 h. avec un tampon phosphate à pH 7.4.

**Colonnes 3 et 6:** Puits préincubés pendant 12 h. avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-décylamine (dans un tampon phosphate pH 7.4).

dans les séra de souris non immunisées, alors qu'elle est élevée dans les séra de souris immunisées avec des antigènes protéiques tel que la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA ou la BSA seulement.

L'inefficacité de la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-décylamine en tant qu'antigène dans les essais ELISA nous a incité à opter a) pour une autre méthode de liaison de l'antigène (conduisant au développement de la méthode de liaison covalente des peptides sur polystyrène, et b) à une méthode de liaison plus conventionnelle, soit en utilisant l'Ang II conjuguée à une protéine, la KLH. Afin de diminuer le taux élevé de liaison non spécifique, nous avons également remplacé la gélatine, utilisée à des concentrations variant de 0.1 à 1%, par du lait en poudre (1g/100 ml) dans le traitement des puits. De plus un tampon carbonate/biarbonate sodique à 0.1M et à un pH de 9.6 a été utilisé afin de remplacer le tampon PBS 0.1M à un pH de 7.4 d'abord utilisé pour l'étape de liaison de l'antigène à la plaque.

La figure 12 illustre la spécificité des essais ELISA obtenues avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH. Dans le cas des séra de souris injectées avec la BSA, la D.O. observée après plusieurs rappels, en présence de [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH, est faible et inférieure ou équivalente à la D.O. obtenue avec les puits préincubés avec le tampon de liaison seule ou avec la KLH. Par contre pour le sérum de souris injectées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA, le taux de liaison des anticorps de type IgG en présence de [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH est supérieur à la liaison en absence de cet antigène. Il est possible de démontrer que cette liaison est spécifique à l'Ang II, puisqu'elle est entièrement déplaçable en préincubant d'abord le sérum avec une concentration de  $10^{-6}$ M de [Sar<sup>1</sup>]Ang II (figure 12, colonne 7).



**FIGURE 12:** Spécificité de détection des anticorps anti-angiotensine II mesurée par essais ELISA en utilisant la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH

La figure illustre un résultat représentatif de l'ensemble des dosages effectués et non la moyenne des résultats obtenus.

Les sera ont été utilisés à une dilution 1 :100.

\* Sérum de souris injectée avec BSA (4<sup>e</sup> rappel).

@ Sérum de souris injectée avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA (8<sup>e</sup> rappel).

**Colonnes 1 et 4:** Puits préincubés avec un tampon carbonate/bicarbonate pH 9.6.

**Colonnes 2 et 5:** Puits préincubés avec 20 µg/ml de KLH dans le tampon.

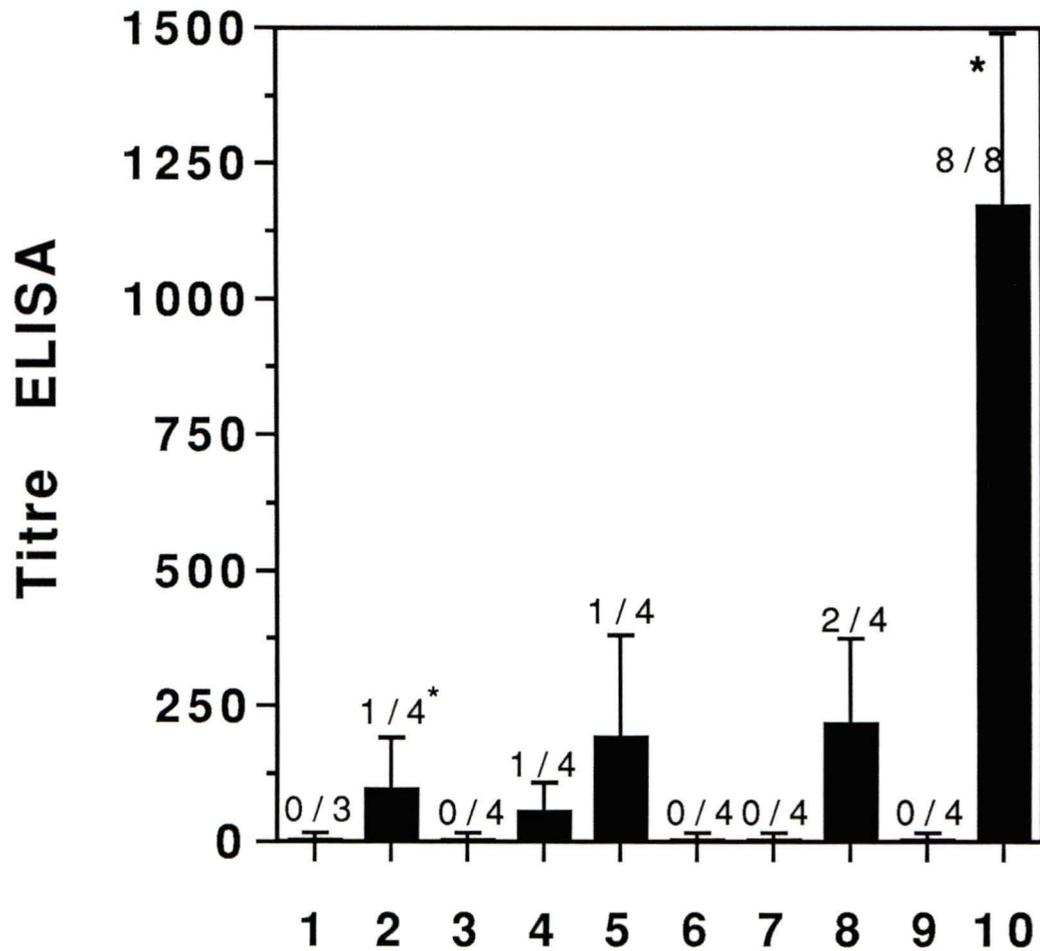
**Colonnes 3 et 6:** Puits préincubés avec 20 µg/ml de [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH dans le tampon.

**Colonne 7:** Puits préincubés avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH et sérum préincubé avec 10<sup>-6</sup> M [Sar<sup>1</sup>]Ang II.

## 2.2 Détermination de la concentration sérique d'IgG

Tous les séra de souris immunisées avec l'Ang II ont été testés en ELISA en utilisant la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH pour la détection des anticorps. Les titres en anticorps anti-Ang II de type IgG produits après deux rappels (3 injections) avec chacun des antigènes sont illustrés à la figure 13. Ces résultats résument l'ensemble des résultats obtenus après chaque rappel d'immunisation, étant donné qu'à l'exception des souris injectées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA (figure 14), le nombre de souris produisant des anticorps et les titres en anticorps n'ont pas augmenté significativement dans les rappels subséquent. On note que très peu d'IgG a été produit avec tous les antigènes employés à l'exception de la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA. Si on tient compte du nombre total d'animaux, environ 80% des souris (26 sur 32) injectées avec de l'Ang II (conjuguée ou non) ont produit peu ou pas d'IgG anti-Ang II contrairement aux souris injectées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA ou les 8 souris ont produit des anticorps anti-Ang II en grande quantité.

Étant donné le faible nombre de souris ayant produit des anticorps, aucune différence significative ne peut être observée entre le groupe de souris injectées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II et les groupes de souris injectées avec l'Ang II possédant des acides aminés pseudo-lipidiques [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8</sup>]Ang II, [Sar<sup>1</sup>,O-octadécyl-Tyr<sup>8</sup>]Ang II, [Sar<sup>1</sup>,Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>8</sup>]Ang II, [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8,9,10</sup>,Gly<sup>11</sup>]Ang II ou l'Ang II-tétramère: [(Sar<sup>1</sup>, Lys<sup>8</sup>)Ang II]<sub>4</sub>, (Lys<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, Lys<sup>10</sup>, Tdg<sup>11</sup>, Gly<sup>12</sup>. Peu d'IgG ont également été produits en utilisant l'Ang II conjuguée à la BSA à l'aide de la maléimide, ou conjuguée à la thyroglobuline par la glutaraldéhyde. Lorsque de nouveaux rappels d'immunisation ont été faits (jusqu'à 7 rappels), peu de différences dans les résultats ont été observées, le nombre de souris répondant positivement étant demeuré sensiblement le même. Seul le titre d'IgG anti-Ang II des souris injectées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA a progressé jusqu'au dernier rappel (figure 14). On note toutefois des variations individuelles importantes dans la production d'anticorps.



**FIGURE 13:** Titre ELISA correspondant aux anticorps de type IgG anti-angiotensine II évalué après le 2<sup>e</sup> rappel d'immunisation

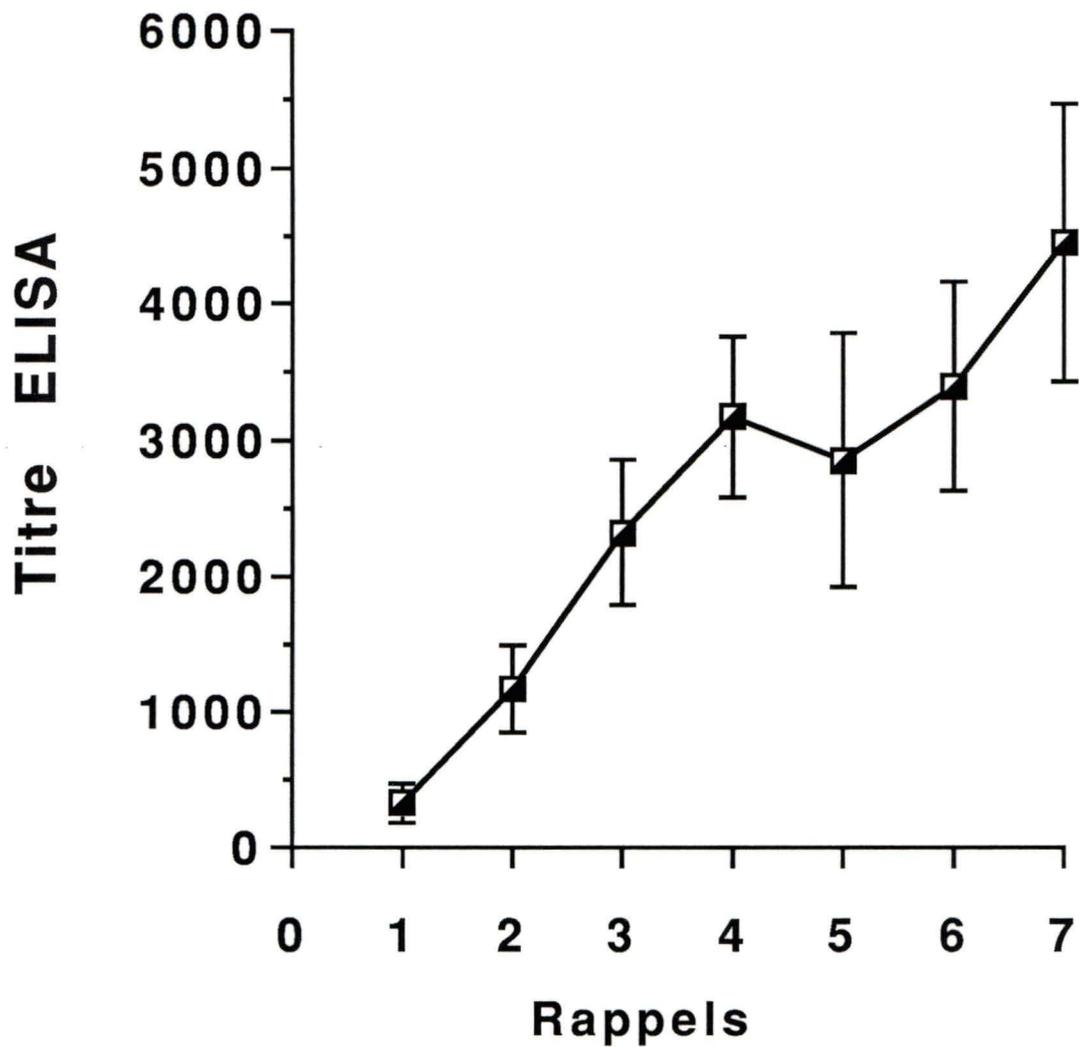
\* Rapport du nombre de souris ayant produit des anticorps anti-Ang II (i.e. avec un titre supérieur à 100).

Les écarts représentent l'écart à la moyenne (S.E.M.) de chaque groupe d'animaux.

Les tests ELISA ont été faits avec les séras de souris injectée avec:

1: BSA 2: [Sar<sup>1</sup>]Ang II 3: Ang II-tétramère 4: [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8</sup>]Ang II 5: [Sar<sup>1</sup>,O-octadécyl-Tyr<sup>8</sup>]Ang II 6: [Sar<sup>1</sup>,Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>8</sup>]Ang II 7: [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8,9,10</sup>,Gly<sup>11</sup>]Ang II 8: [Sar<sup>1</sup>,Phe<sup>8</sup>-SH]Ang II-MBSA 9: [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-Thyroglobuline 10: [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA.

\* p<0.05



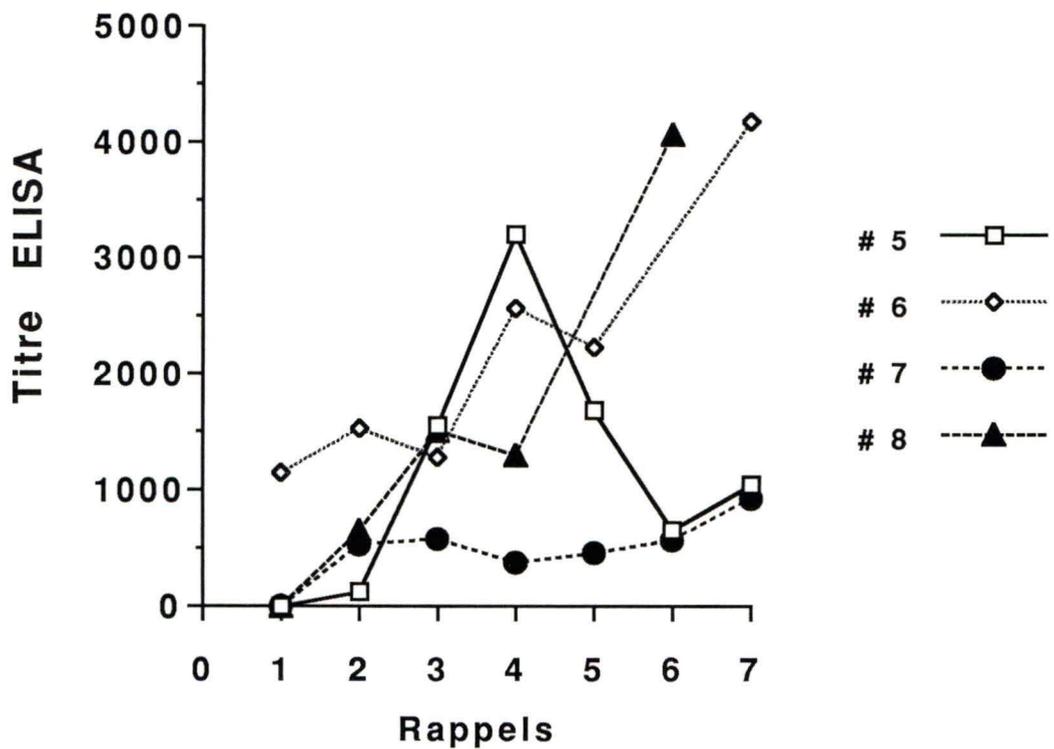
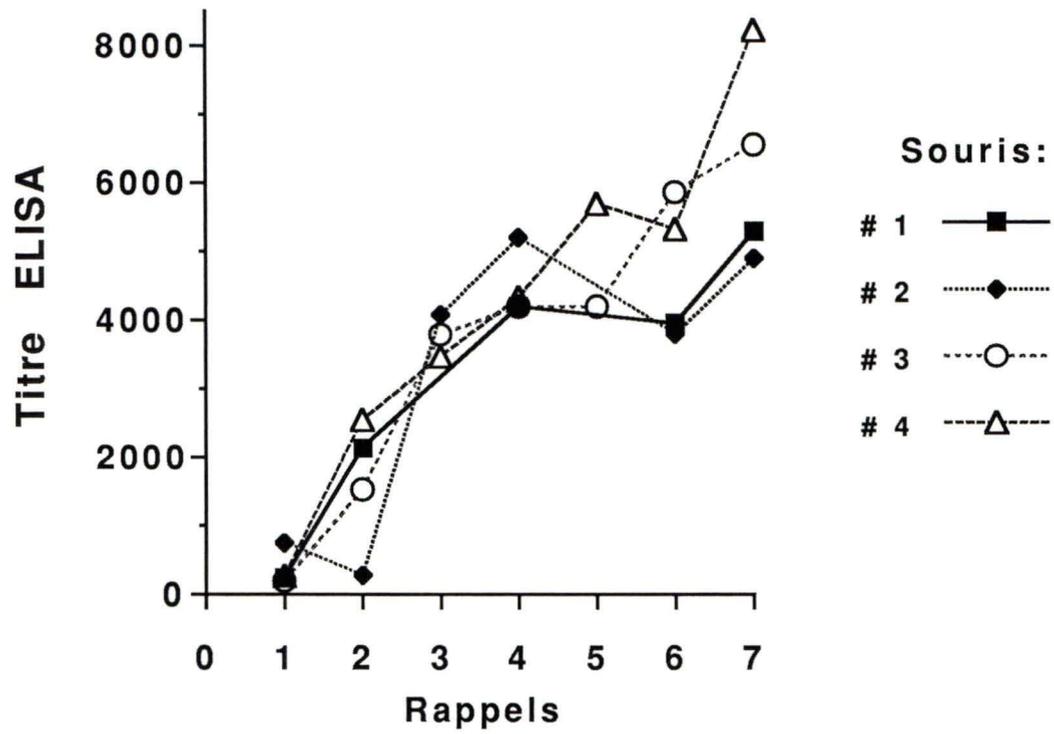
**FIGURE 14:** Évaluation par essais ELISA de la production d'anticorps anti-angiotensine II de type IgG chez des souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA.

Les résultats représentent la moyenne ± l'écart à la moyenne (S.E.M.) de sera provenant de 8 souris.

La figure 15 montre l'évolution de la production des anticorps anti-Ang II obtenues pour chacune des souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA. Chez les souris #1, 2, 3, 4, 6, et 8 le titre augmente avec chaque rappel, mais on constate que pour la souris #5 le titre diminue après le quatrième rappel, alors que pour la souris #7, le titre demeure faible pendant toute la période d'immunisation.

### **2.3 Détermination de la concentration sérique d'IgM**

La production d'anticorps de type IgM a également été déterminée à chacun des rappels d'immunisation avec les différents antigènes. Les titres obtenus après le deuxième rappel sont illustrés à la figure 16 et représentent l'ensemble des résultats obtenus à chaque rappel, c'est-à-dire que le nombre de souris productrices d'anticorps ne varie pas d'un rappel à l'autre, et les différences demeurent non significatives entre les groupes de souris injectées. Peu de souris ont produit des anticorps anti-Ang II de type IgM, mais seul le groupe injecté avec l'Ang II-tétramère (pieuvre) n'a produit aucun anticorps de type IgM ou IgG. Une des souris injectée avec la [Sar<sup>1</sup>, O-octadécyl-Tyr<sup>8</sup>]Ang II a produit un taux élevé d'IgM et d'IgG anti-Ang II, mais ce taux n'est pas différent de celui obtenu avec une des souris injectée avec l'Ang II non conjuguée dans un rappel ultérieur (résultat non montré). La majorité des souris (3 sur 4) injectées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-MBSA ont produit des anti-IgM, mais les variations observées entre les souris ne permettent pas d'établir une différence significative avec les autres antigènes injectés. Il est à noter qu'une des souris injectée avec la BSA semble posséder une faible proportion d'anticorps anti-Ang II de type IgM. Cette réponse positive a néanmoins été retrouvée chez la même souris après chacun des rappels d'immunisation. Enfin on peut remarquer que chez les souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA, contrairement à la forte production d'IgG anti-Ang II, cette antigène a initié une très faible production d'IgM spécifique.



**FIGURE 15:** Évolution individuelle de la production d'anticorps anti-angiotensine II de type IgG chez des souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA

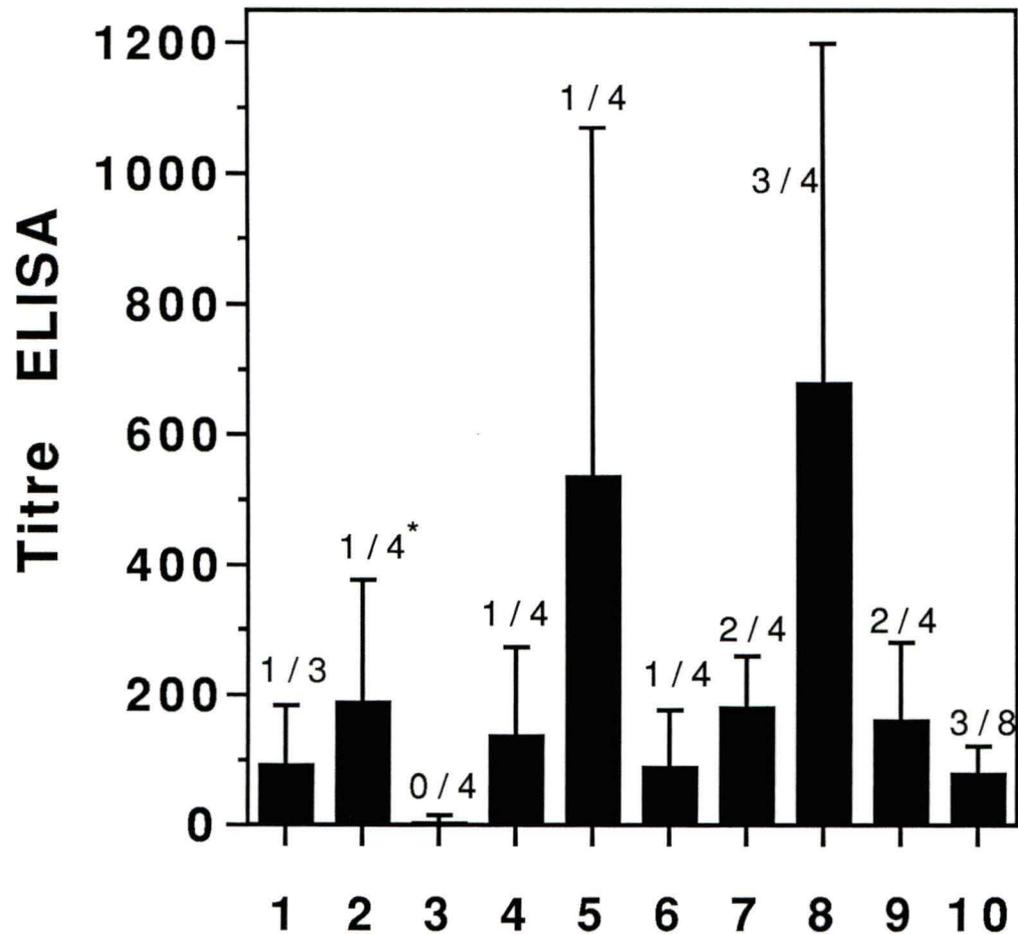


FIGURE 16: Titre en anticorps anti-angiotensine II de type IgM évalué par essais ELISA après le 2<sup>e</sup> rappel d'immunisation

\* Rapport du nombre de souris ayant produit des anticorps anti-Ang II (i.e. avec un titre supérieur à 100). Les écarts représentent l'écart à la moyenne (S.E.M.) de chaque groupe d'animaux.

Les essais ELISA ont été effectués en utilisant des sera de souris injectées avec:

1: BSA 2: [Sar<sup>1</sup>]Ang II 3: Ang II-tétramère 4: [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8</sup>]Ang II 5: [Sar<sup>1</sup>,O-octadécyl-Tyr<sup>8</sup>]Ang II 6: [Sar<sup>1</sup>,Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>8</sup>]Ang II 7: [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8,9,10</sup>,Gly<sup>1</sup>]Ang II 8: [Sar<sup>1</sup>,Phe<sup>8</sup>-SH]Ang II-MBSA 9: [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-Thyroglobuline 10: [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA.

## **2.4 Dosage des anticorps anti-angiotensine II avec la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-Glutaraldéhyde-KLH**

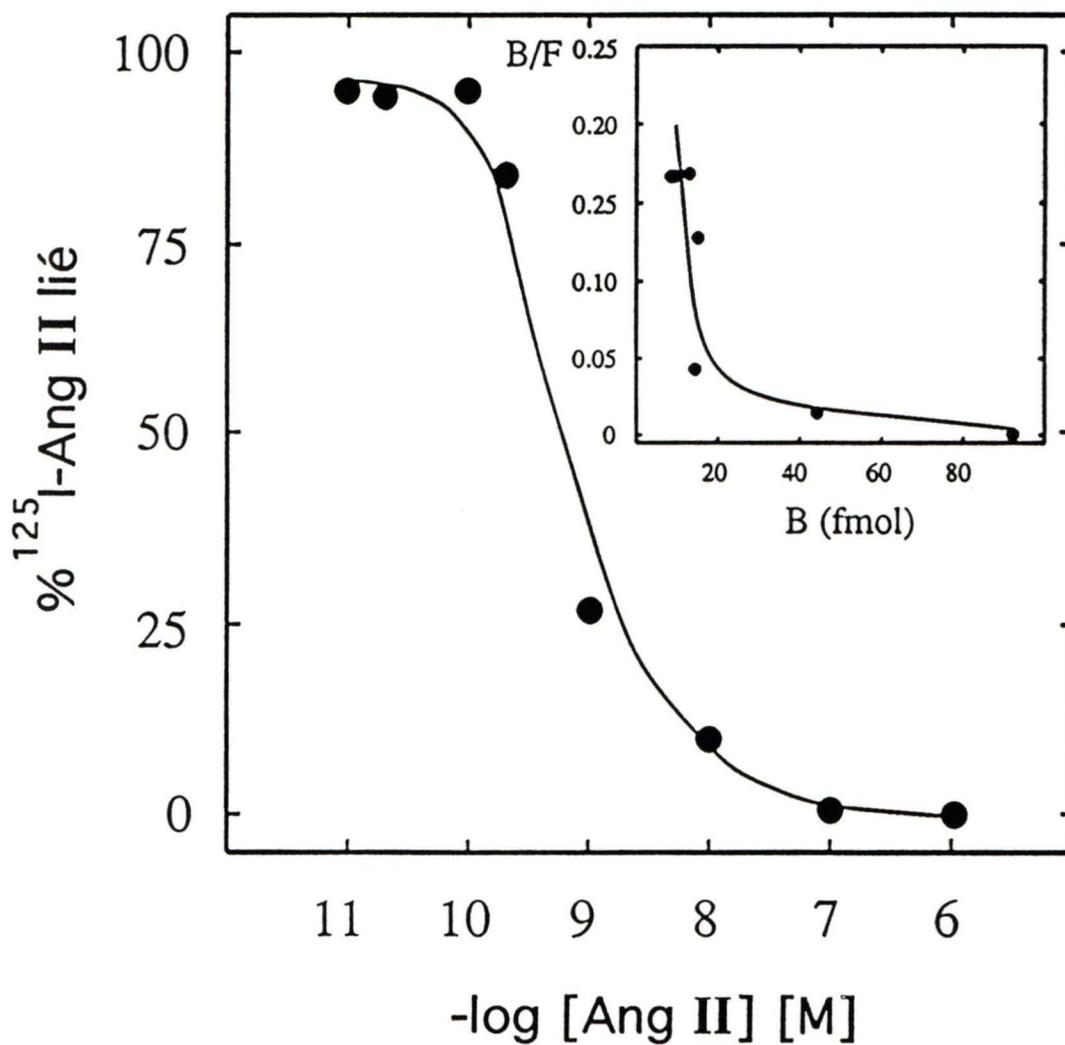
Une analyse par ELISA de tous les séra prélevés après le septième rappel, en utilisant la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-KLH pour la détection des anticorps, a montré peu ou pas de différence dans la détermination qualitative de la présence ou de l'absence des anticorps anti-Ang II par rapport à la détection faite avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH (résultats non montrés).

## **2.5 Utilisation d'autres antigènes pour le dosage des anticorps anti-angiotensine II**

En plus des essais effectués avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-décylamine, la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH et la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-KLH en ELISA, les peptides [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8</sup>]Ang II, [Sar<sup>1</sup>,O-octadécyl-Tyr<sup>8</sup>]Ang II et l'Ang II-tétramère ont également été utilisés. La méthode d'incubation des antigènes avec les plaques ELISA est décrit à la section I no. 7 du matériel et méthodes. Malheureusement, tout comme dans le cas de l'Ang II-décylamine, aucun anticorps anti-Ang II de type IgG ou IgM n'a pu être détectés en utilisant les peptides à chaînes pseudo-lipidiques ou le tétramère d'Ang II, et ce même avec les séra de souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA pourtant très positif en IgG lorsqu'on utilise la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH pour la détection des anticorps anti-Ang II.

## **2.6 Dosage des anticorps par RIA**

La présence et la spécificité des anticorps anti-Ang II a également été vérifié par RIA. Les figures 17 et 18 montrent respectivement les résultats de l'inhibition de la liaison de la <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>]Ang II aux anticorps des séra de souris #1 et #4 (injectées avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA) par l'addition de concentrations croissantes d'Ang II. Ces courbes de types sigmoïdales caractérisent la spécificité de déplacement des anticorps sur l'hormone. L'affinité moyenne des anticorps diffère légèrement avec des IC<sub>50</sub> de 7.91 x



**FIGURE 17:** Courbe de compétition de la  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>]Ang II par de la [Sar<sup>1</sup>]Ang II avec le sérum provenant de la souris #1 immunisée avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA

Inhibition de la liaison de la  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>]Ang II aux anticorps du sérum (dilution 1:1000) de la souris #1 injectée avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA (7<sup>e</sup> rappels) par des quantités croissantes de [Sar<sup>1</sup>]Ang II. La courbe Scatchard correspondante est illustrée dans la partie supérieure droite de la figure.

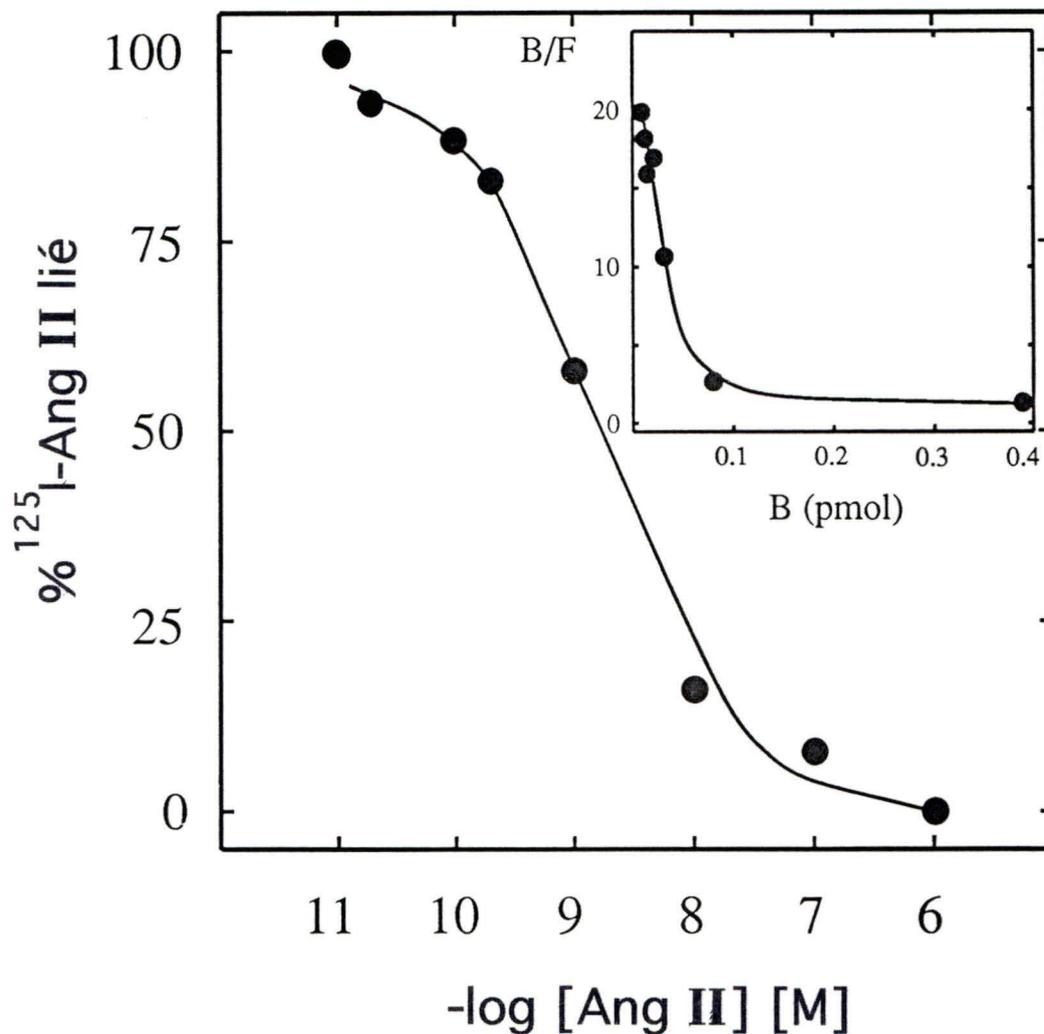


FIGURE 18: Courbe de compétition de la  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>]Ang II par de la [Sar<sup>1</sup>]Ang II avec le sérum provenant de la souris #4 immunisée avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA

Inhibition de la liaison de la  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>]Ang II aux anticorps du sérum (dilution 1:500) de la souris #4 injectée avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA (7<sup>e</sup> rappel) par des quantités croissantes de [Sar<sup>1</sup>]Ang II. La courbe Scatchard correspondante est illustrée dans la partie supérieure droite de la figure.

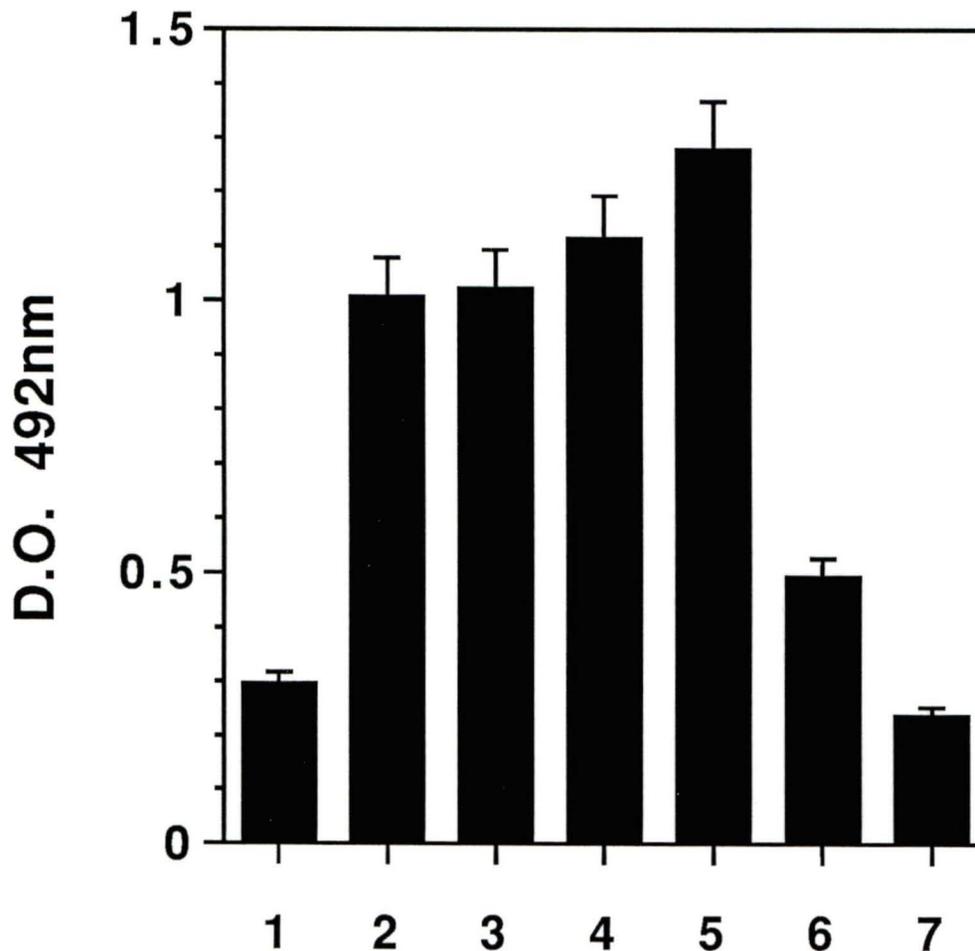
$10^{-10}$  M pour le sérum #1 et de  $1.99 \times 10^{-9}$  M pour les anticorps du sérum #4. Lorsque les résultats sont compilés de façon à obtenir des Scatchards (1949), (figures 17 et 18 coin droit supérieur), on constate que pour les deux séra on obtient des courbes, ce qui indique la présence de plusieurs groupes d'anticorps d'affinités différentes. Deux sites de liaisons principaux, l'un de faible affinité et l'autre de forte affinité, semble prédominer dans les deux séra. La capacité de liaison du sérum de la souris #4 est supérieur au sérum de la souris #1, ce qui confirme les résultats obtenus avec la méthode de dosage ELISA (figure 15).

La méthode RIA a également été utilisée pour vérifier la présence d'anticorps anti-Ang II dans tous les séra de souris après 7 rappels. Les résultats obtenus en RIA confirment ceux obtenus par ELISA. En effet, la présence d'anticorps anti-Ang II a été détecté seulement chez les souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA. La sensibilité du test RIA semble toutefois inférieure à celle de la méthode ELISA car plusieurs séra légèrement ou moyennement positifs par ELISA ont été négatifs par RIA et seuls les séra fortement positifs en ELISA se sont également révélés positifs par RIA.

### **3. Production d'anticorps anti-peptide 115-131 de la protéine rSm-28 GST de *Schistosoma mansoni*.**

#### **3.1 Spécificité de l'ELISA avec Sch-KLH**

Tout comme pour l'évaluation des anticorps anti-Ang II, la production d'anticorps anti-Sch a été principalement mesurée à l'aide de la méthode ELISA. La spécificité du test utilisant la Sch-KLH est démontrée à la figure 19. Des concentrations croissantes de cet antigène permettent d'améliorer la liaison des anticorps, et ces derniers sont spécifiquement déplacés lorsque le sérum est préincubé avec une concentration élevée [ $10^{-4}$ M] de peptide Sch (colonne 6). Aucune liaison d'anticorps n'est également observée en incubant l'antigène Sch-KLH en présence d'un sérum de souris injectée avec le [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA (colonne 7), ce qui confirme aussi



**FIGURE 19:** Spécificité de détection des anticorps anti-Sch mesuré par essais ELISA en utilisant la Sch-KLH

Le sérum de la souris #6 injectée avec Sch-ovalbumine a été testé en ELISA. Le sérum est dilué 1 :100.

1: Puits préincubés avec 50 µg/ml de KLH.

2: Puits préincubés avec 5 µg/ml de Sch-KLH.

3: Puits préincubés avec 10 µg/ml de Sch-KLH.

4: Puits préincubés avec 20 µg/ml de Sch-KLH.

5: Puits préincubés avec 40 µg/ml de Sch-KLH.

6: Puits préincubés avec 40 µg/ml de Sch-KLH et sérum préincubé avec  $10^{-4}$  M Sch.

7: Puits préincubés avec 40 µg/ml de Sch-KLH, et par la suite avec le sérum de la souris no 3 (4<sup>e</sup> rappel) immunisée avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA dilué 1 :100 (sérum témoin).

Les résultats représentent la moyenne et l'écart à la moyenne (S.E.M.) de 4 dosages.

la spécificité de liaison des anticorps anti-Sch.

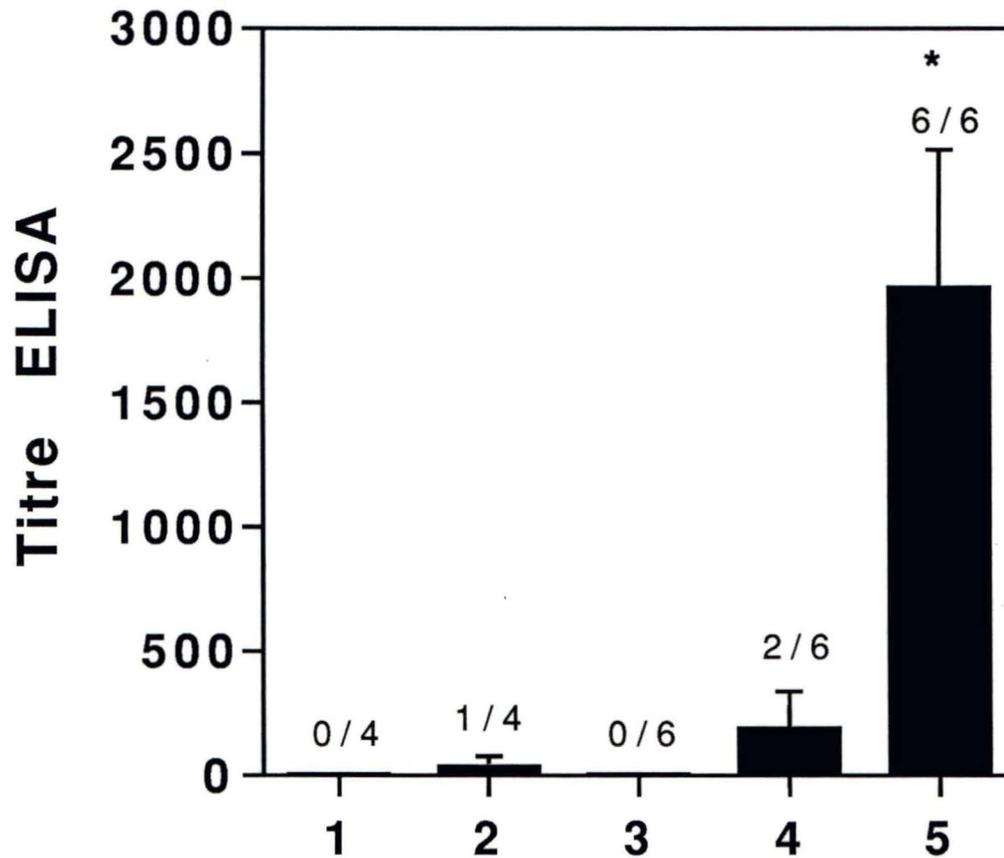
La liaison non spécifique mesurée en présence de KLH solubilisé dans le tampon de liaison (Colonne 1) est soustraite pour chacune des dilution de sérum testé. La concentration de [40µg/ml] de Sch-KLH a été utilisée dans tous les dosages subséquents pour des raisons d'efficacité.

### **3.2 Détermination de la concentration sérique des IgG anti-Sch**

Les titres en anticorps anti-Sch de type IgG obtenus après le cinquième rappel sont représentés à la figure 20. Le peptide Sch non conjugué n'induit pas plus que l'Ang II une réponse humorale à long terme (production d'IgG). L'addition d'un acide aminé pseudo-lipidique tel que la tétradécylglycine et la bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-dopa ne semble pas modifier cette faible capacité immunogénique puisque seule 2 souris sur 12 parviennent à produire des IgG spécifiques suite à ces modifications. Tout comme l'Ang II-tétramère, le tétramère du peptide Sch n'a guère été efficace pour la production d'IgG.

### **3.3 Détermination de la concentration sérique des IgM anti-Sch**

Les séra de souris injectées avec les peptides Sch ont également été dosés pour la présence d'immunoglobulines de type M, et le titre de ces anticorps est représenté à la figure 21. Suite à 2 rappels, on remarque dans tous les groupes, la présence d'IgM spécifiques au Sch. Malgré tout, la production d'IgM est relativement faible et non significative par rapport au peptide Sch non modifié (colonne 1), à l'exception du peptide conjugué à la protéine porteuse (ovalbumine), où on note une forte augmentation d'IgM qui suit le profil d'IgG. Lorsque l'on redose les IgM après 5 rappels d'immunisation, peu de différence a pu être notée dans la plupart des groupes. Cependant, on constate que chez les souris injectées avec la [Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-dopa<sup>1 8</sup>,Gly<sup>1 9</sup>]Sch plus aucun sérum ne possède



**FIGURE 20:** Titre en anticorps anti-Sch de type IgG évalué par ELISA après le 5<sup>e</sup> rappel d'immunisation

\* Rapport du nombre de souris ayant produits des anticorps anti-Sch (i.e. titre supérieur à 100).

Les essais ELISA ont été effectués avec des séras de souris injectées avec:  
 1: Le peptide Sch 2: Sch-tétramère 3: [Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>18</sup>,Gly<sup>19</sup>]Sch 4: [Tdg<sup>18</sup>,Tdg<sup>19</sup>,Gly<sup>20</sup>]Sch 5: Sch-ovalbumine.

Les résultats représentent la moyenne et l'écart à la moyenne (S.E.M.) de chaque groupe de souris injectées.

\* p<0.05

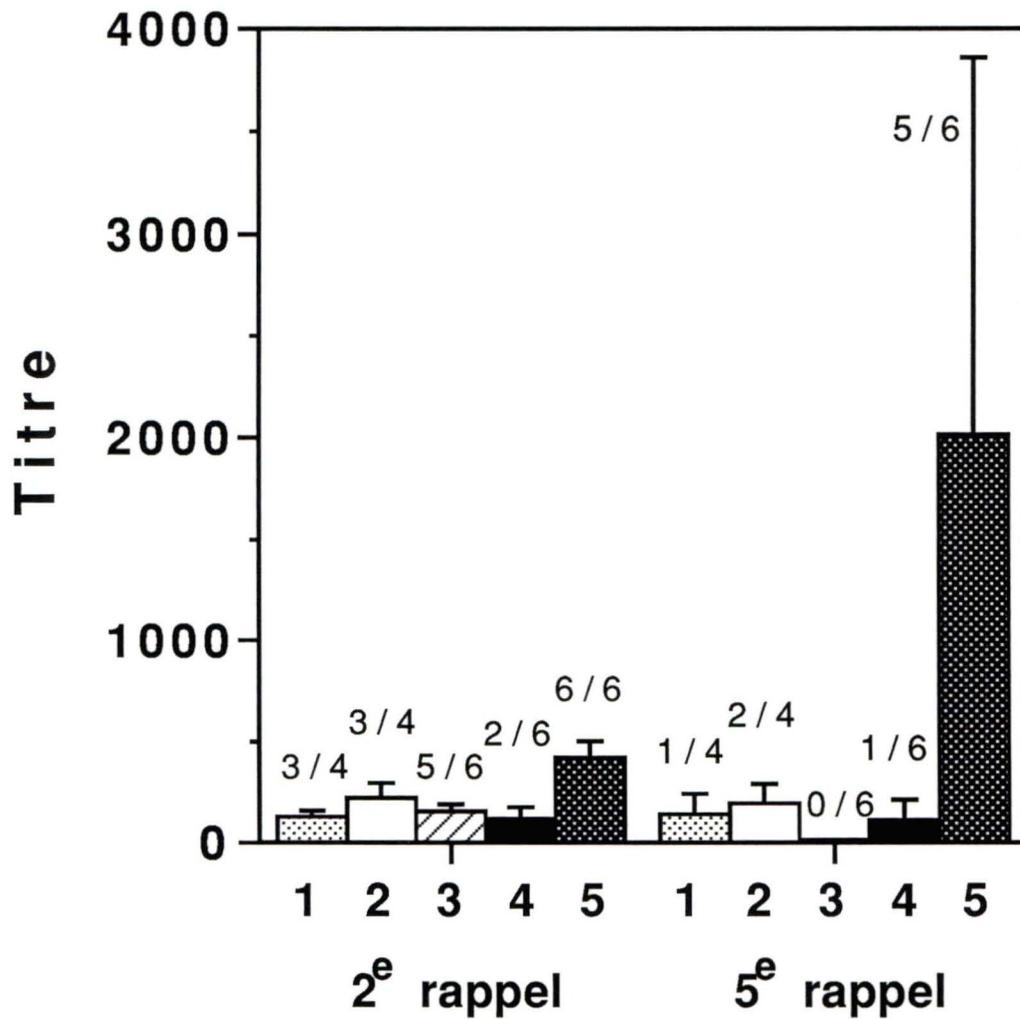


FIGURE 21: Titre en anticorps anti-Sch de type IgM évalué par ELISA

\* Rapport du nombre de souris ayant produits des anticorps anti-Sch (i.e. titre supérieur à 100).

Les essais ELISA ont été effectués avec des sera de souris immunisées avec:

1: Le peptide Sch 2: Sch-tétramère 3: [Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>18</sup>,Gly<sup>19</sup>]Sch 4: [Tdg<sup>18</sup>,Tdg<sup>19</sup>,Gly<sup>20</sup>]Sch 5: Sch-ovalbumine.

Les résultats représentent la moyenne et l'écart à la moyenne (S. E.M.) de chaque groupe de souris injectées.

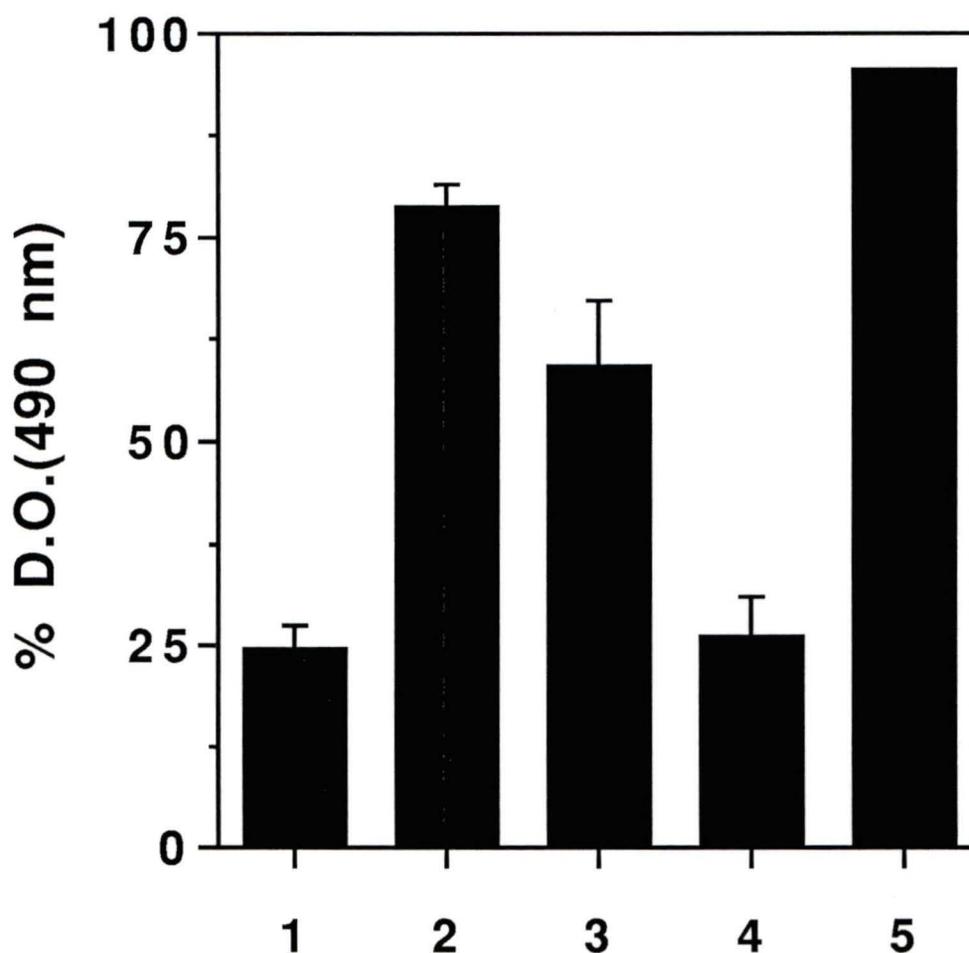
maintenant d'anticorps anti-Sch de type IgM par rapport à 5 souris sur 6 après 2 rappels. Le nombre de souris répondant positivement, mais non le titre, a également diminué légèrement dans les autres groupes. Chez les souris injectées avec la Sch-ovalbumine, le titre en anticorps anti-Sch de type IgM augmente de près de 5 fois par rapport au deuxième rappel. Ces résultats contrastent avec la production très faible d'IgM provoquée par l'Ang II conjuguée à la BSA.

### **3.4 Reconnaissance des peptides Sch par les anticorps anti-Sch**

Afin de s'assurer davantage de l'intégrité structurale des peptides dérivés de la séquence génomique de la protéine rSm-28 GST de *Schistosoma mansoni* utilisé pour l'immunisation, nous avons décidé de vérifier si les anticorps de type IgG produits à l'aide de la Sch-ovalbumine pouvaient reconnaître les peptides du Sch modifié, c'est-à-dire conjugué à des acides aminés pseudo-lipidiques ou polymérisé en tétramère (figure 22). La colonne 1 de la figure 22 montre que le peptide Sch non modifié en concentration de  $10^{-4}M$  (concentration calculé en fonction du contenu peptidique), préincubé en présence des séra, parvient à inhiber environ 75% de la D.O. obtenue en ELISA. Le même degré d'inhibition est obtenu avec la [Tdg<sup>18</sup>,Tdg<sup>19</sup>,Gly<sup>20</sup>]Sch (colonne 4). La [Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-dopa<sup>18</sup>, Gly<sup>19</sup>]Sch utilisé à la même concentration inhibe seulement 40% de la D.O., alors que le tétramère du peptide parvient à peine à inhiber 20% de la D.O.. La [Sar<sup>1</sup>]Ang II utilisée également à une concentration de  $10^{-4}M$  ne parvient pas à empêcher significativement la liaison des anticorps anti-Sch (colonne 5).

## **4. Dosage des anticorps anti-protéines porteuses**

La production d'anticorps anti-protéines porteuses a également été déterminée dans des séra de souris injectées avec l'Ang II conjuguée à la BSA ou avec le Sch conjugué à l'ovalbumine (figure 23). Bien que l'utilisation d'antigènes de natures différentes (soit



**FIGURE 22:** Reconnaissance croisée des peptides Sch par des anticorps anti-Sch produit à l'aide de la Sch-ovalbumine

Le sérum de la souris #1 immunisée avec Sch-ovalbumine a été préincubé avec 0.1mM de: 1: Sch 2: Sch-tétramère 3: [Bis-O<sub>1</sub>O-octadéyl-Dopa<sup>18</sup>,Gly<sup>19</sup>]Sch 4: [Tdg<sup>18</sup>,Tdg<sup>19</sup>,Gly<sup>20</sup>]Sch 5: [Sar<sup>1</sup>]Ang II (sérum témoin) et testé ensuite par ELISA avec Sch-KLH. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la densité optique (D.O.) obtenue en présence de la substance ajoutée par rapport à la D.O. observée en absence de cette substance. Les résultats représentent la moyenne et l'écart à la moyenne (S.E.M.) de 4 dosages.

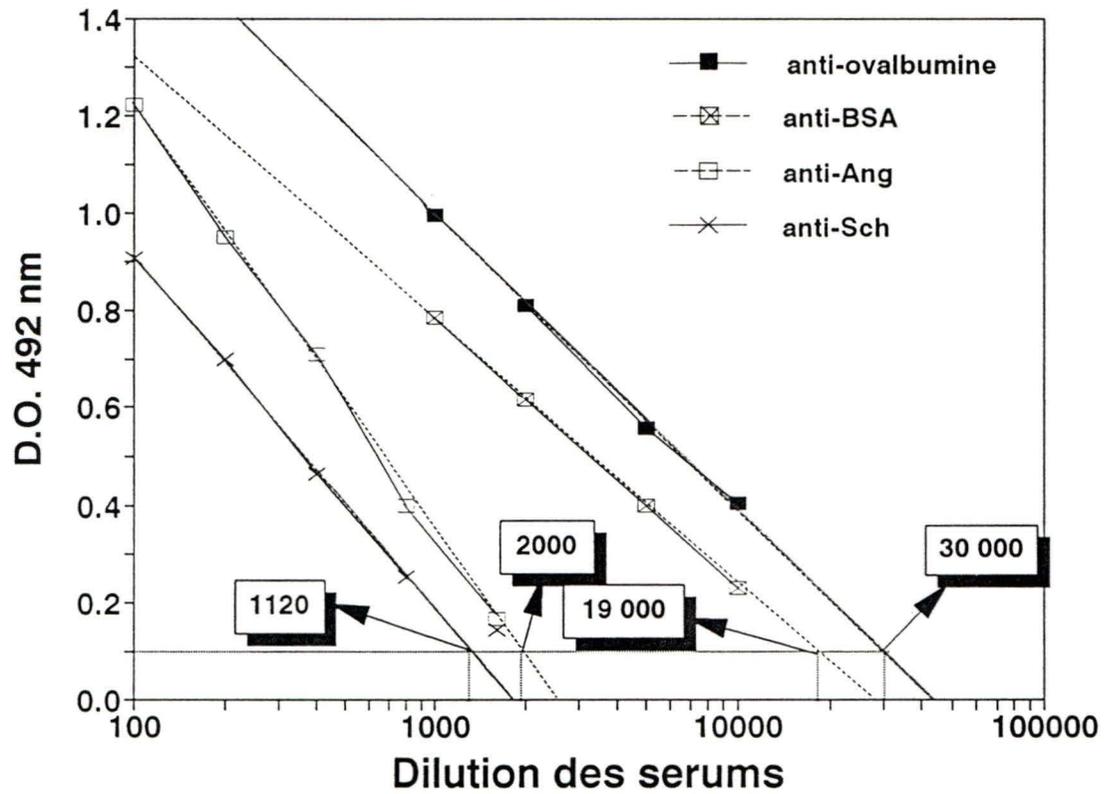


FIGURE 23: Evaluation de la production d'anticorps anti-protéines porteuses

Le sérum de la souris #4 injectée avec Sch-ovalbumine (5<sup>e</sup> rappel) (ligne pleine) a été dosé pour la présence d'anticorps anti-ovalbumine et anti-Sch de type IgG. Le sérum de la souris no 5 injectée avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA (3<sup>e</sup> rappel) (ligne pointillée) a été dosé pour la présence d'anticorps anti-BSA et anti-Ang II de type IgG.

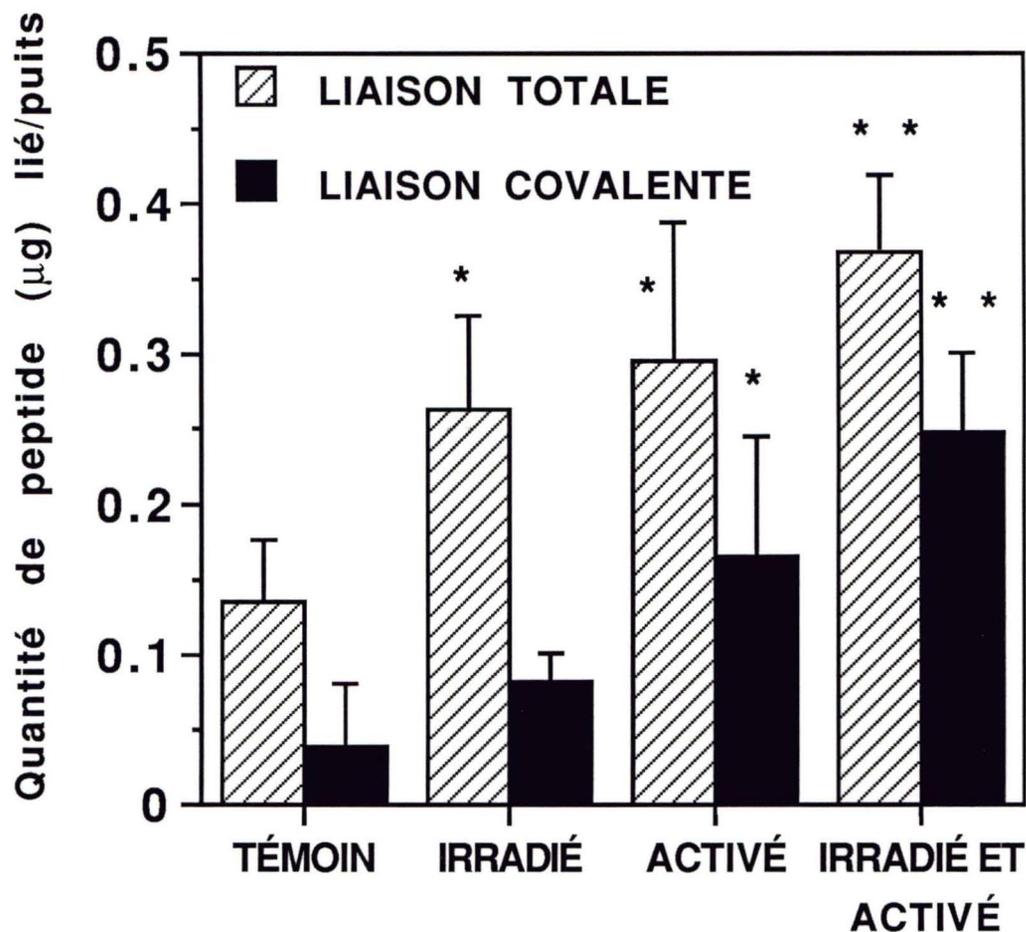
l'ovalbumine vs la Sch-KLH, et la BSA vs la (Sar<sup>1</sup>)Ang II-KLH) ne permet pas de comparer directement la valeur absolue des titres observés, on peut constater que la production d'anticorps anti-protéines porteuses (BSA et ovalbumine) est supérieure à la production d'anticorps pour les peptides qui y sont couplés (Sch et Ang II).

## **II- Liaison covalente des peptides aux plaques ELISA**

### **1. Evaluation quantitative de la liaison des peptides au polystyrène**

Pour nous permettre d'évaluer précisément l'efficacité de notre méthode de liaison, nous avons choisi d'utiliser l'Ang II car c'est avant tout la liaison de ce peptide que nous voulions améliorer pour les essais ELISA effectués dans le projet principal. Il a été démontré que ce peptide est entièrement détaché de la surface des plaques lors des étapes de lavages propres à la méthode ELISA (Sondergard-Andersen et al., 1990). La figure 24 montre que ce peptide en solution aqueuse s'adsorbe peu à la surface de polystyrène (plaque Dynatech), et aucune liaison significative n'est observée suite aux lavages avec la solution de détergent. Des essais effectués avec les tampons habituellement utilisés pour l'étape d'enrobage: soit un tampon PBS à pH 7.6 ou le tampon de liaison carbonate/bicarbonate sodique à pH 9.6 n'ont pu également augmenter significativement l'adsorption de l'Ang II (résultats non montrés).

L'irradiation des plaques ELISA augmente sensiblement le taux de liaison du peptide et une simple activation du PS avec le DCC accroît significativement ( $p < 0.05$ ) la capacité de liaison covalente et totale (liaison à la plaque avant les lavages avec SDS) de l'Ang II. Un effet additif est obtenu sur le degré de liaison covalente lorsque les prétraitements sont effectués de façon simultanée (irradiation suivie de l'activation) ( $p < 0.001$ ). Dans ce dernier cas la liaison totale



**FIGURE 24:** Effets des radiations et de l'activation de plaques de polystyrène Dynatech sur la liaison de la  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II

Des plaques ELISA Dynatech ont été soumises à une dose cummulative de 3.5 Mrad de rayons  $\gamma$  et/ou activées pendant 30 min. avec 0.1 M DCC et 0.1 M NHS dans 25  $\mu\text{l}$  de DMSO. Une concentration de 1  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  de  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II (50 mCi/mmole) dans de l'eau a ensuite été ajouté et incubé pendant une nuit à la température ambiante. La liaison totale représente la liaison du peptide obtenue suite à des lavages de la plaque avec de l'eau, alors que la liaison covalente représente la liaison du peptide observée après 4 lavages des puits avec du SDS 5% aqueux à 100°C. Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de 5 expériences. Les puits témoins (non traités) ont été incubés pendant une nuit avec 1  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  de  $^{125}\text{I}$ -Ang II en solution aqueuse.

\*  $p < 0.005$

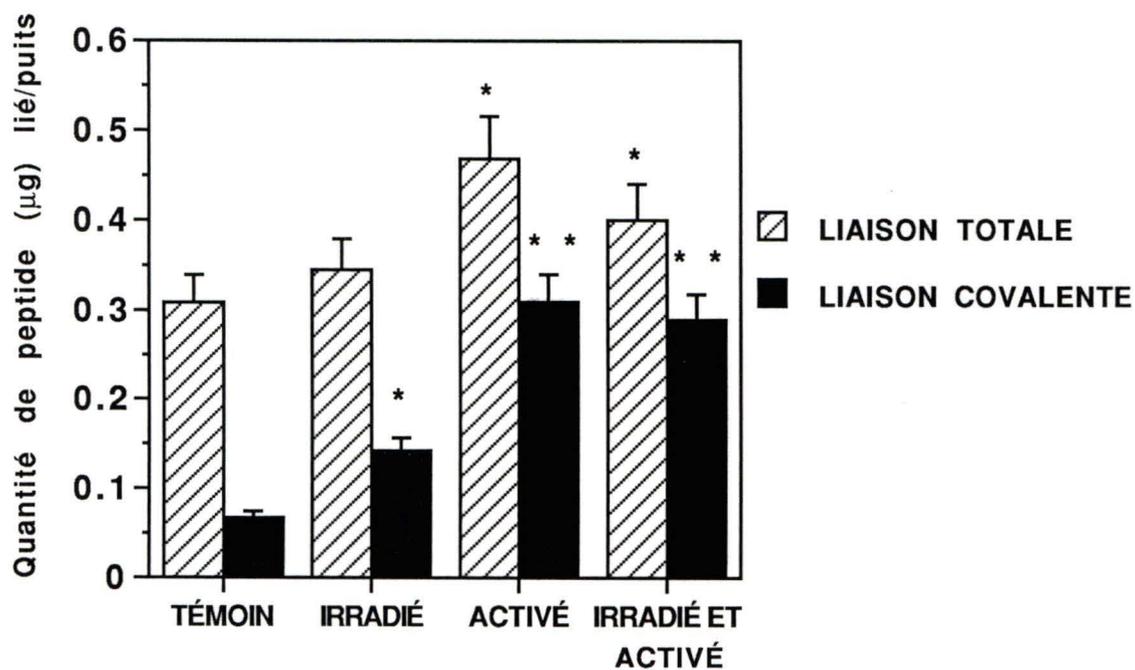
\*\*  $p < 0.001$

de l'Ang II est plus que doublée et environ les 2/3 du peptide demeure attaché à la surface de la plaque suite aux lavages au SDS. Aucun détachement subséquent du peptide n'a pu être observé malgré une augmentation du nombre et du temps des lavages au SDS (jusqu'à 5 lavages de 20 min. chacun ont été effectués), ce qui laisse supposer que les liaisons sont de nature covalente.

Des études similaires faites sur des plaques de PS d'autres fournisseurs (Nunc, Maxisorp) nous ont permis de constater des différences importantes entre les types de PS disponibles sur le marché (figure 25). Les plaques Maxisorp montrent une meilleure adhésion du peptide au départ, mais les lavages aux SDS enlèvent la grande majorité du peptide adsorbé à la surface du PS. L'activation des plaques Maxisorp avec DCC/NHS semble avoir un effet maximal sur la liaison du peptide au PS. Une préirradiation de ce type de plaques n'est donc pas nécessaires pour obtenir une meilleur liaison des peptides.

## **2. Effet du temps d'irradiation**

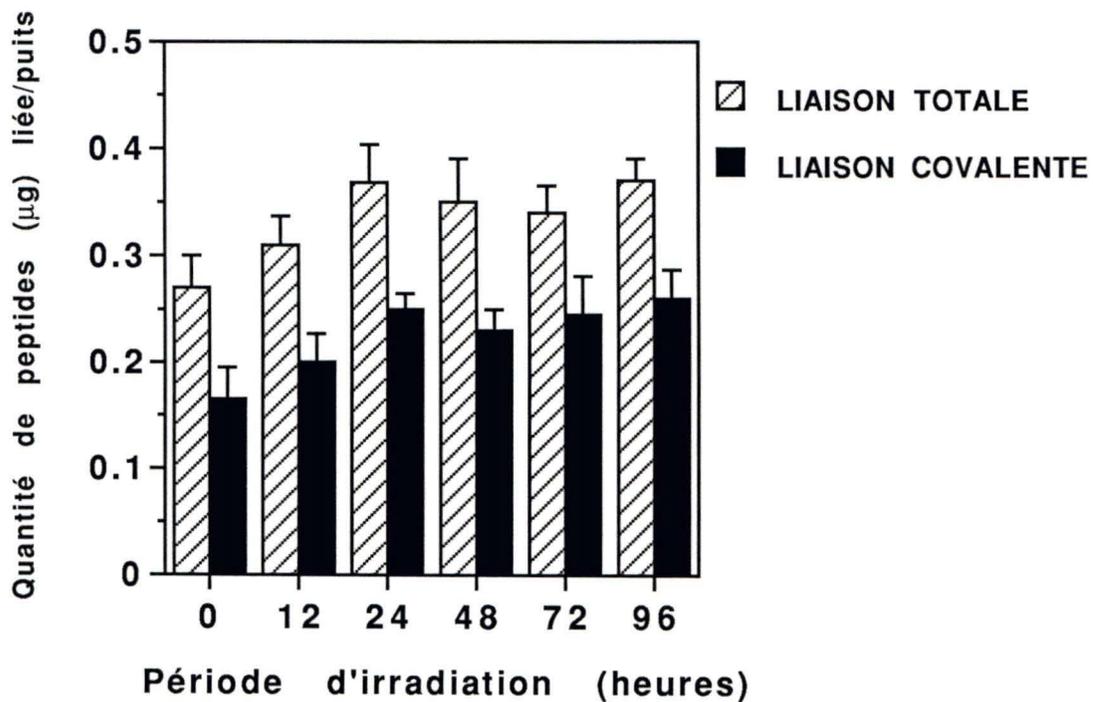
Un maximum de liaison du peptide est atteint suite à une irradiation se prolongeant sur une période de 24 h. et correspondant à une dose cumulative de 3.5 Mrad (figure 26). Une irradiation du PS pour des périodes plus longues n'a pas accentué la liaison de la <sup>125</sup>I-Ang II. L'irradiation à longue durée (plus de 48 heures) provoque un changement de coloration du plastique qui diminue sa transparence et sa qualité optique. Suite à l'irradiation, le PS conserve ses nouvelles capacités d'activation pour de très longues périodes de temps. Des taux de liaison covalente élevés ont été obtenus avec des plaques irradiées un an auparavant. Des plaques faites de PVC (Falcon) ont également été testées mais ces dernières étaient rapidement noircie suite à des doses relativement faibles d'irradiation (1Mrad). Elles ont donc été exclues de cette étude et ce malgré le fait que l'utilisation de ce matériel pour des fonctions similaires a été rapporté précédemment (Larsson et al., 1987).



**FIGURE 25:** Effets des radiations et de l'activation de plaques de polystyrène Maxisorp (Nunc) sur la liaison de la  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II

Des plaques ELISA Maxisorp ont été traitées tel qu'indiqué à la figure 24. Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de 3 expériences .

\* p<0.05  
 \* \* p<0.001



**FIGURE 26:** Effets du temps d'irradiation du polystyrène sur la liaison de la  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II.

Des plaques ELISA Dynatech ont été soumises à différentes doses de rayons gamma, puis activées et utilisées selon les conditions décrites à la figure 24.

Les résultats représentent la moyenne et l'écart à la moyenne (S.E.M.) de 4 dosages.

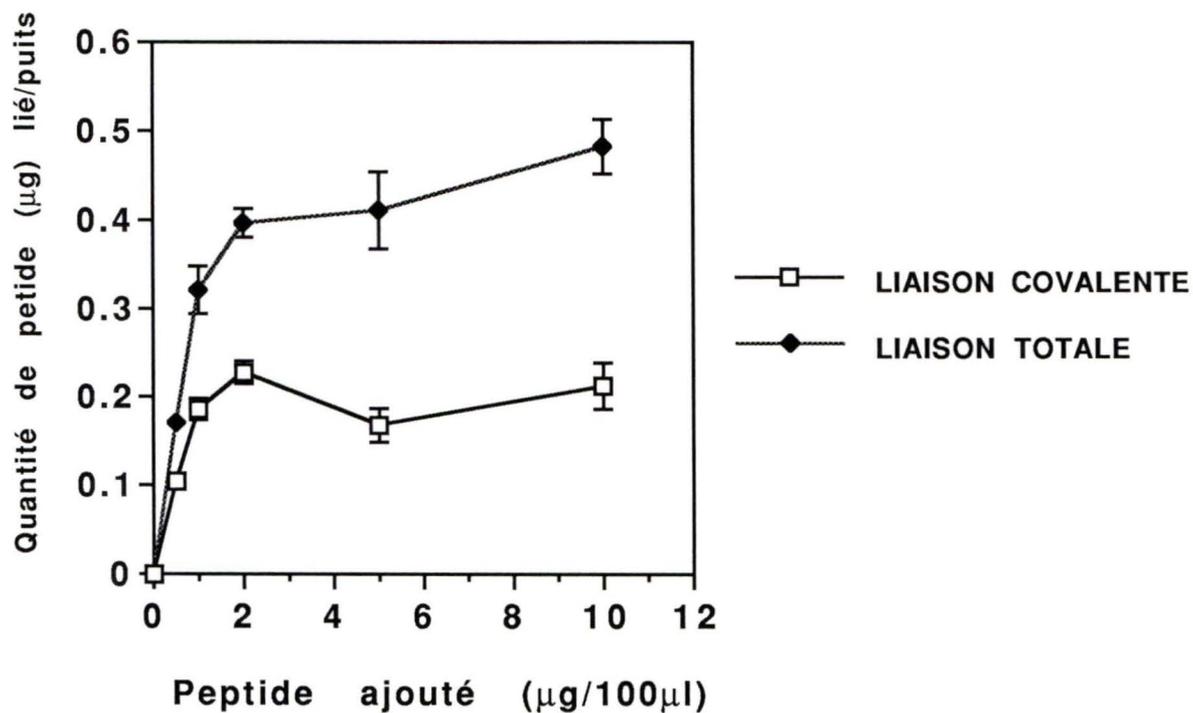
### 3. Concentration du peptide :

L'ajout d'une concentration croissante d'Ang II aux plaques ELISA a montré qu'aux conditions utilisées, les sites de liaison covalente créés par le prétraitement du PS sont saturables avec une liaison maximale de 0.2 µg de peptide/100 µl/puits (figure 27). Toutefois une légère augmentation de la liaison totale du peptide est obtenue avec une concentration beaucoup plus forte [10µg/100µl] d'Ang II ajoutée au départ. L'activation du PS avec des concentrations plus élevées d'agents de couplage permet de créer de nouveaux sites de liaison pour le peptide (figure 28), mais nous avons pu observer qu'à des concentrations supérieures à 0.1M, le DCC diminue la transparence du plastique en formant des dépôts blanchâtres. Afin de ne pas altérer la qualité optique du PS, la concentration de DCC à utiliser a été établie à 0.1M.

### 4. Effet du pH

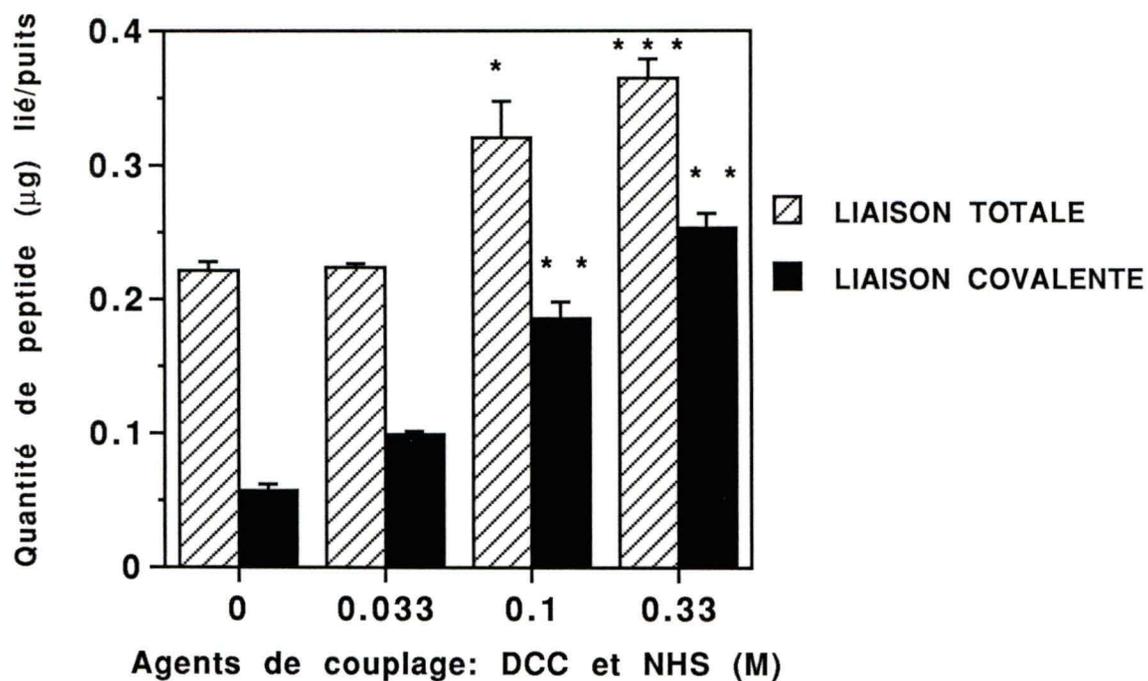
L'effet du pH du milieu d'incubation de l'antigène a été évalué entre les pH 4 à 9 (figure 29). Un pH optimal de 6.0 a été établi pour obtenir une liaison maximale du peptide aux plaques activées. Le pH optimal s'étend sur une zone plus large supérieur à pH 5 lorsque les plaques sont irradiées et activées, contrairement aux plaques uniquement activées au DCC/NHS où l'effet du pH semble plus important. Quelque soit le pH utilisé, peu de liaisons des peptides ont été observées aux plaques ni irradiées, ni activées, mais il semble que l'adsorption soit davantage favorisée à un pH voisin de la neutralité.

La liaison comparative de deux analogues de l'Ang II, soit la [Sar<sup>1</sup>]Ang II et la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II démontre l'importance de l'amine primaire libre en position 8 dans le second cas pour la liaison au PS (tableau XII).



**FIGURE 27:** Effets de la concentration de peptide ajouté sur la liaison aux plaques Dynatech irradiées et activées

Les plaques Dynatech ont été traitées tel qu'indiqué à la figure 24. Des concentrations croissantes de  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II ont été ajoutés aux puits. Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de 4 expériences.



**FIGURE 28:** Effets de la concentration de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide et de N-hydroxysuccinimide sur la liaison de la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II au polystyrène

Suite à l'irradiation  $\gamma$ , des plaques Dynatech ont été traitées avec des concentrations variables de DCC et de NHS avant d'y lier la <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II. Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de 4 expériences.

\* p<0.005; \*\* p,0.001; \* \* \* p<0.0001

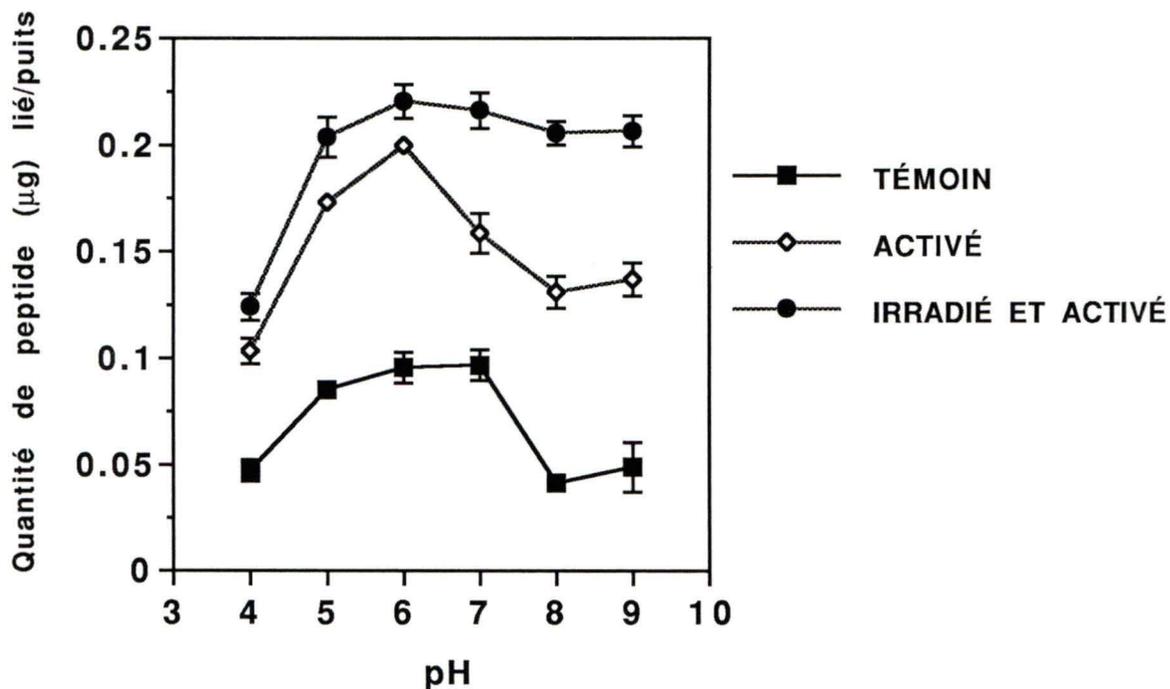


FIGURE 29: Effets du pH sur la liaison covalente de la  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II au polystyrène

Des plaques ELISA Dynatech ont été traitées tel qu'indiqué à la figure 24. De la  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II (50 mCi/mole) a été ajoutée à une concentration de 1 µg/100µl dans de l'eau dont le pH a été ajusté avec du HCl 0.1 N ou du NaOH 0.1 N. Seule la liaison covalente du peptide est indiquée, soit la liaison obtenue suite à des lavages avec du SDS 5% aqueux à 100°C. Les résultats représentent la moyenne et l'écart à la moyenne (S.E.M.) de 4 expériences.

**Tableau XII Pourcentage de liaison d'analogues de l'angiotensine II au polystyrène irradié et activé**

Analogues de l'angiotensine II	liaison totale	liaison covalente
Sar-RVYVHPF ([Sar <sup>1</sup> ]Ang II)	16.47 ± 3.13%	10.56 ± 1.24%
Sar-RVYVHPK ([Sar <sup>1</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]Ang II)	36.82 ± 5.11%*	24.70 ± 5.35%**

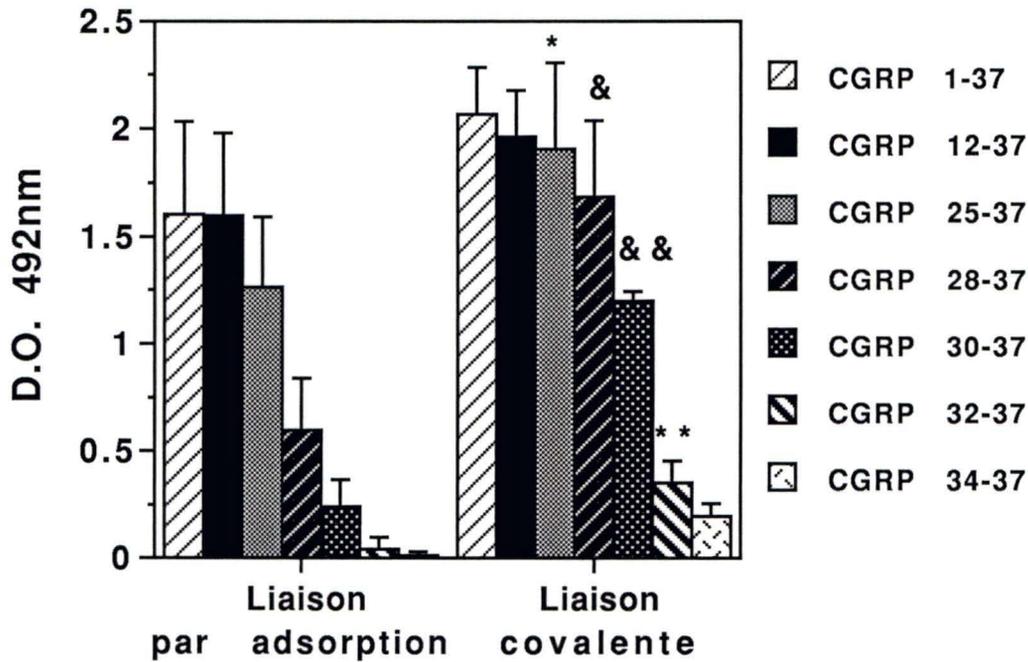
Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison de 1µg de peptide (1nmole) ajouté à chaque puits, et représente la moyenne et l'écart type de 4 expériences.

\* p<0.001; \*\* p<0.0001.

## 5. Essai ELISA

L'influence de la liaison covalente sur la reconnaissance antigénique des peptides en essai ELISA a été vérifiée en utilisant le peptide CGRP et des fragments C-terminaux de ce peptide.

Si on compare les méthodes de liaisons covalentes et l'adsorption hydrophobe (i.e. incubation dans un tampon sodique carbonate/bicarbonate à pH 9.6), la séquence complète 1-37 du peptide CGRP est reconnue de façon similaire dans les deux cas (figure 30). Nous avons vérifié si une diminution de la taille des peptides, tout en conservant leurs parties antigéniques, pouvait influencer leurs reconnaissances dans les deux méthodes de liaison aux plaques. On constate à la figure 30 qu'avec une liaison des peptides par adsorption, une diminution de leur taille occasionne rapidement une baisse proportionnelle de la reconnaissance des épitopes de courtes séquences. Les peptides les plus courts (8 acides aminés et moins) sont faiblement détectés par les anticorps. Par contre, dans le groupe des peptides liés de façon covalente, la perte de reconnaissance des courts peptides par les anticorps anti-CGRP est beaucoup moins prononcée; les séquences de 13 et de 10 acides aminés sont aussi bien reconnues que la séquence complète de 37



**FIGURE 30:** Effets de la taille des peptides sur leur reconnaissance antigénique mesuré par essais ELISA lorsqu'ils sont liés de façon covalente vs une méthode de liaison par adsorption

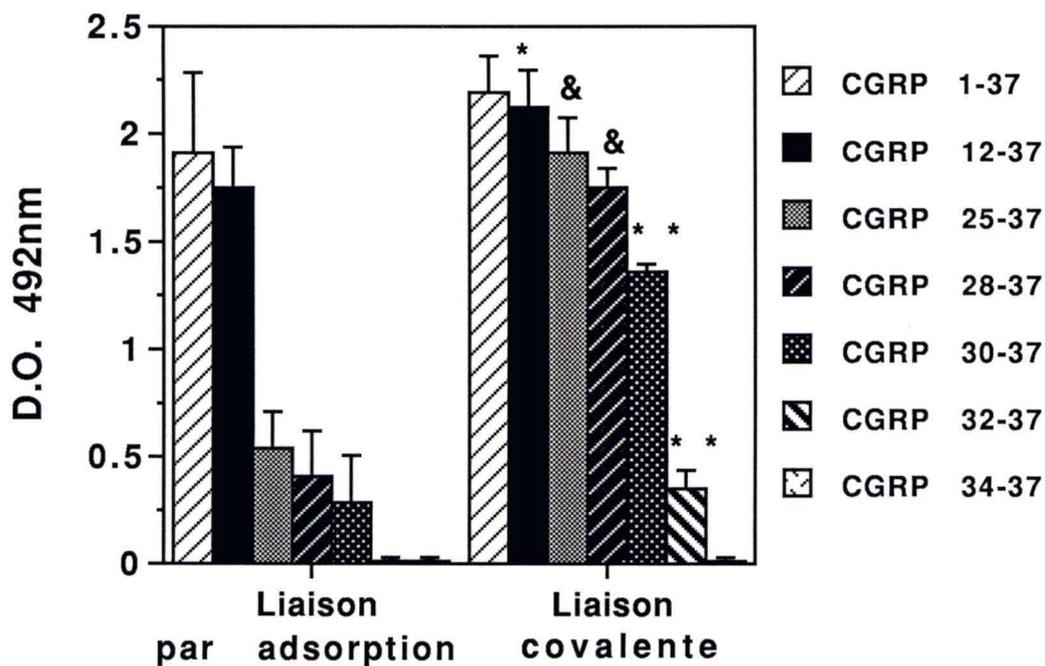
Les peptides liés par adsorption ont été incubés dans une plaque de polystyrène pendant une nuit à la température ambiante dans un tampon sodique carbonate/bicarbonate à pH 9.6. Pour la liaison covalente, les puits ont été irradiés et activés tel qu'indiqué à la figure 24 et les peptides ont ensuite été incubés dans de l'eau à pH 6. Les peptides utilisés à une concentration de 10µg/ml sont le CGRP et des fragments C-terminaux de ce peptide. Des anticorps polyclonaux anti-CGRP (Amersham) ont été utilisés à une dilution 1:1000. Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de 4 expériences.

\* p<0.05; \* \* p<0.005; & p<0.001; & & p<0.0001

acides aminés, et le peptide de 8 acides aminés est reconnu de façon non significativement différente du peptide 1-37 adsorber au PS (figure 31). Les peptides de 4 et de 6 acides aminés sont plus faiblement reconnus.

### **5.1 Réutilisation des plaques ELISA**

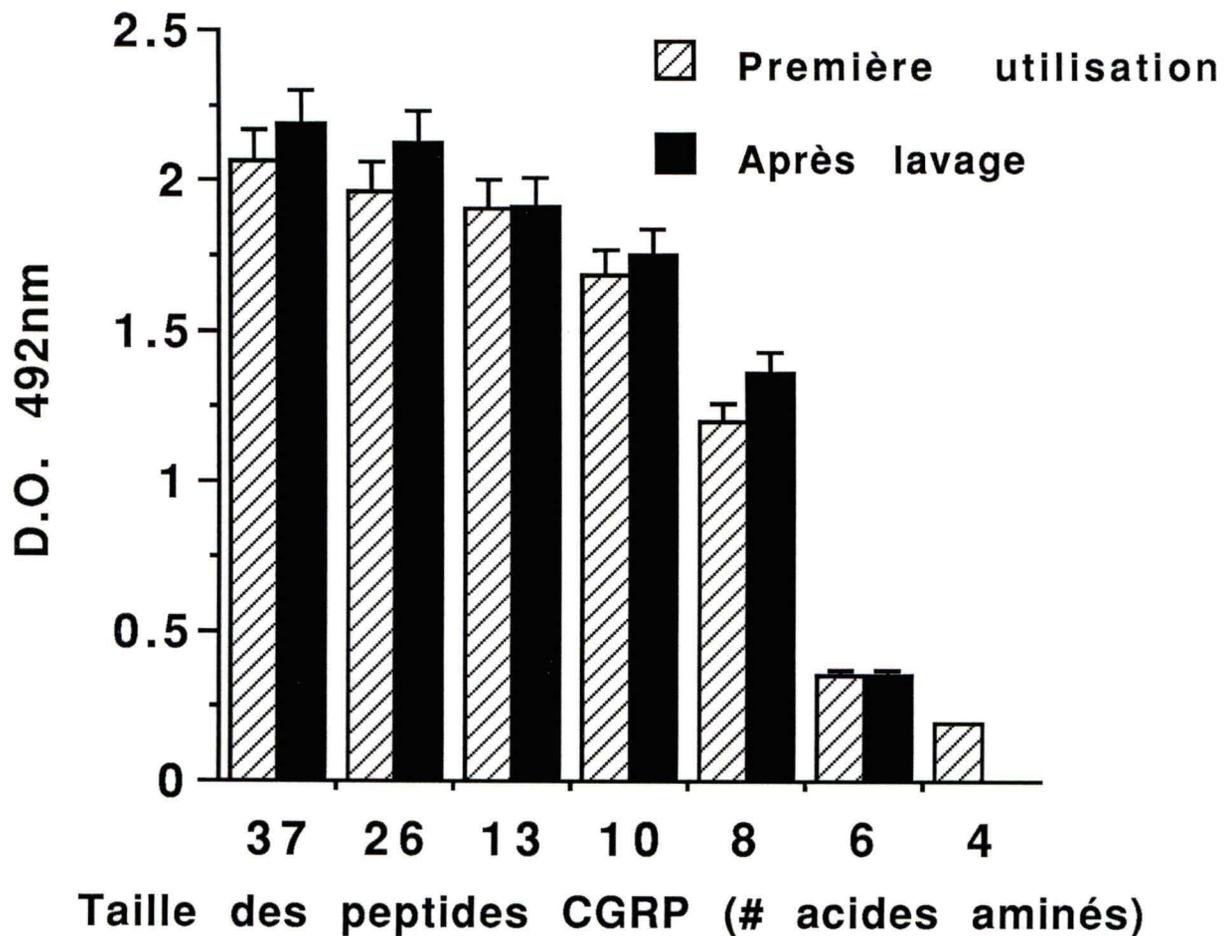
Les plaques ELISA déjà utilisées ont été lavées avec une solution de SDS 5% aqueux à 100°C, entreposées ensuite à -20°C ou à la température ambiante, puis réutilisées après certaines périodes de temps. Les peptides liés de façon covalente à la surface du PS ont été aussi bien reconnus que précédemment (figures 30, 31, 32 et 33), alors que les peptides liés par simple adhérence sont nettement affectés par les lavages avec le détergent (figures 30, 31 et 32). La reconnaissance de ces derniers a été réduite de façon inversement proportionnelle à la taille des peptides, c'est-à-dire que la reconnaissance des peptides les plus courts, 13 acides aminés et moins, a été davantage affectée que celle des peptides dont la séquence était complète ou presque complète (37 et 26 acides aminés), dont la reconnaissance n'est pas significativement modifiée. Il est à noter qu'avec les peptides liés de façon covalente les plaques traitées au SDS demeurent efficaces même avec le peptide de seulement 6 acides aminés, ce qui correspond à la longueur minimale retrouvée pour un seul épitope (Hebbes et al., 1989) (figure 32). Certaines des plaques ELISA sur lesquelles le CGRP et ses fragments ont été liés de façon covalente ont même été lavées au SDS, réutilisées jusqu'à 5 fois, et conservées pour des périodes supérieures à un an à la température ambiante, sans perte notable d'efficacité.



**FIGURE 31:** Effet de la taille des peptides sur leur reconnaissance antigénique suite à une réutilisation des plaques ELISA

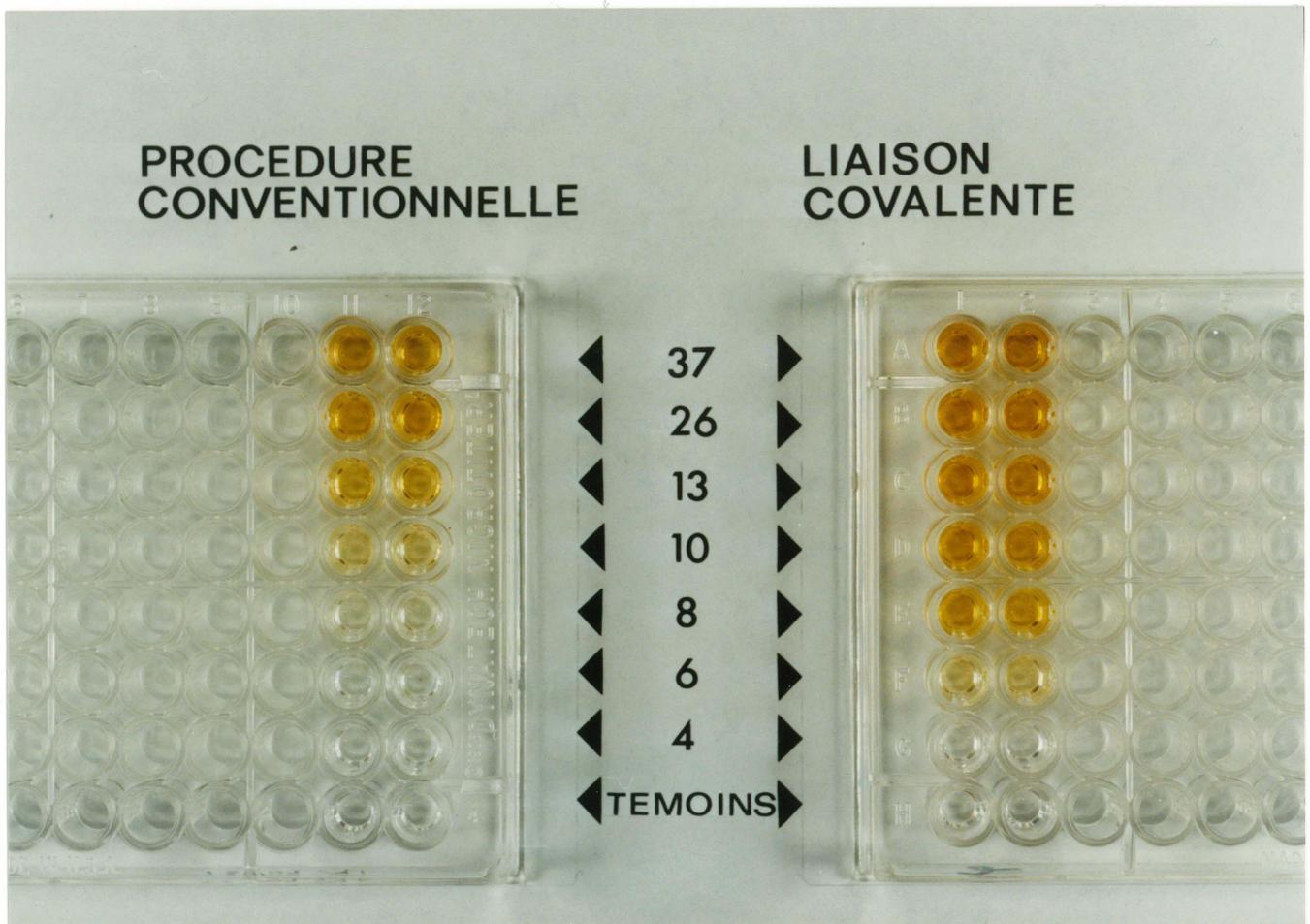
Les plaques sur lesquelles des peptides ont été liés de façon covalente ou par adsorption (tel qu'indiqué à la figure 30) ont été lavées avec du SDS 5% aqueux à 100°C et réutilisées en ELISA. Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de 4 expériences.

\* p<0.05; \*\* p<0.005; & p<0.0001



**FIGURE 32:** Reconnaissance antigénique mesuré par essais ELISA de peptides liés de façon covalente au polystyrène avant et après le lavage des plaques avec du SDS

Des plaques sur lesquelles le peptides CGRP et des fragments C-terminaux de ce peptide ont été liés de façon covalente à une concentration de 1 µg/ml, ont été testées par ELISA avec une dilution 1 :1000 d'anticorps anti-CGRP, lavées avec du SDS 5% aqueux à 100°C, et retestées. Cette figure rassemble des éléments des figures 30 et 31. Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de 4 expériences.



**Figure 33:** Effet de la taille des peptides sur leur reconnaissance antigénique lorsqu'ils sont liés de façon covalente vs par adsorption au polystyrène, suite à une réutilisation des plaques ELISA

Des plaques auxquelles le peptide CGRP et ses fragments C-terminaux ont été liés de façon covalente ou par adsorption (voir figure 30-31), ont ensuite été lavées avec du SDS 5% aqueux à 100°C, et testées en ELISA avec des anticorps polyclonaux anti-CGRP dilué 1 : 1000.

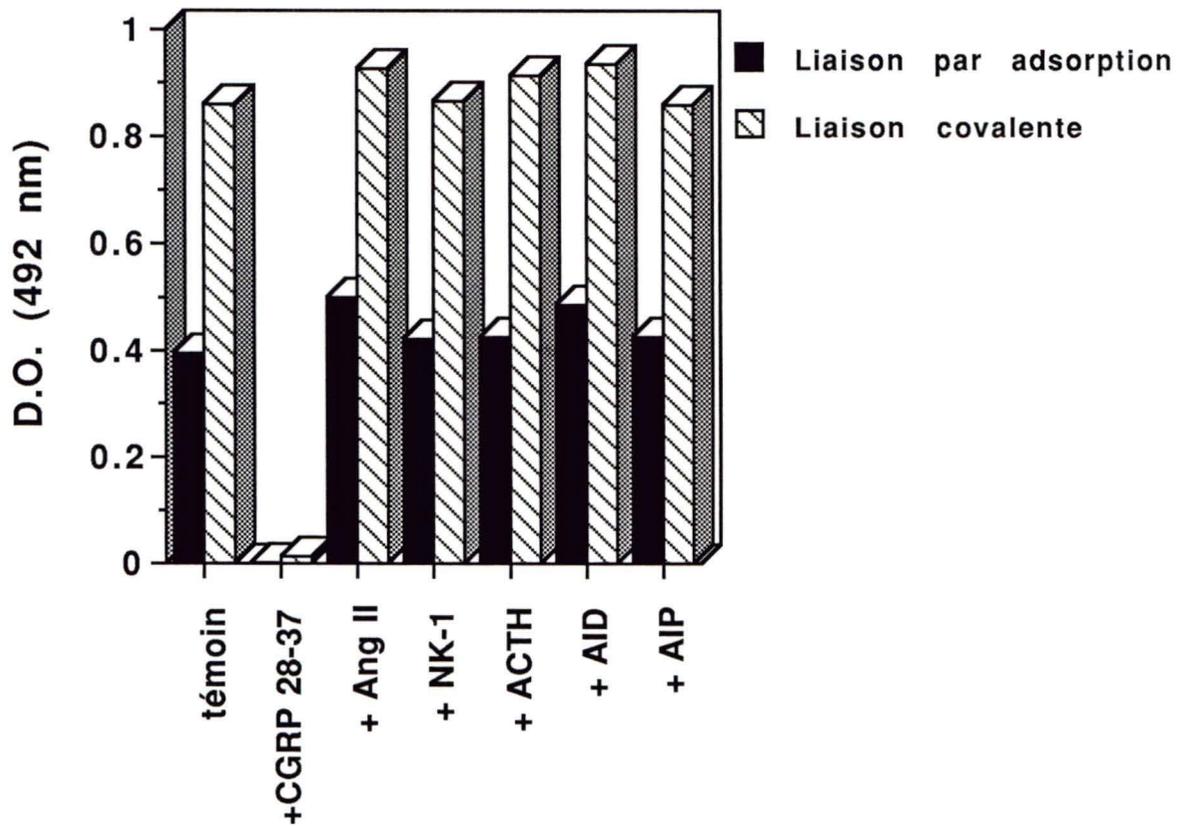
Les chiffres indiquent le nombre d'acides aminés de chacun des peptides soit 37 : CGRP 1-37; 26 : CGRP 12-37; 13 : CGRP 25-37; 10 : CGRP 28-37; 8 : CGRP 30-37; 6 : CGRP 32-37; 4 : CGRP 34-37. Les puits témoins représentent les anticorps anti-CGRP incubés en absence de peptides.

## **5.2 Spécificité des essais ELISA avec peptides liés de façon covalente**

Afin de s'assurer de la spécificité de reconnaissance des anticorps polyclonaux anti-CGRP vis-à-vis des peptides couplés de façon covalente, nous avons préincubé ces anticorps avec différents peptides avant de les ajouter aux plaques ELISA liés avec le peptide 28-37 du CGRP. La figure 34 montre que seul le peptide 28-37 du CGRP en solution parvient à inhiber efficacement la liaison des anticorps anti-CGRP, alors que les peptides témoins non reliés au CGRP soit, l'Ang II, l'AIP, l'AID, l'ACTH et le NK-1 n'interfèrent pas de façon significative même lorsqu'utilisés à des concentrations 100 fois supérieures à celle du CGRP 28-37. Par ailleurs, aucune liaison croisée des anticorps anti-CGRP n'a également été observée avec les mêmes peptides témoins, lorsqu'ils sont liés de façon covalente à la surface des plaques ELISA (résultats non montrés) .

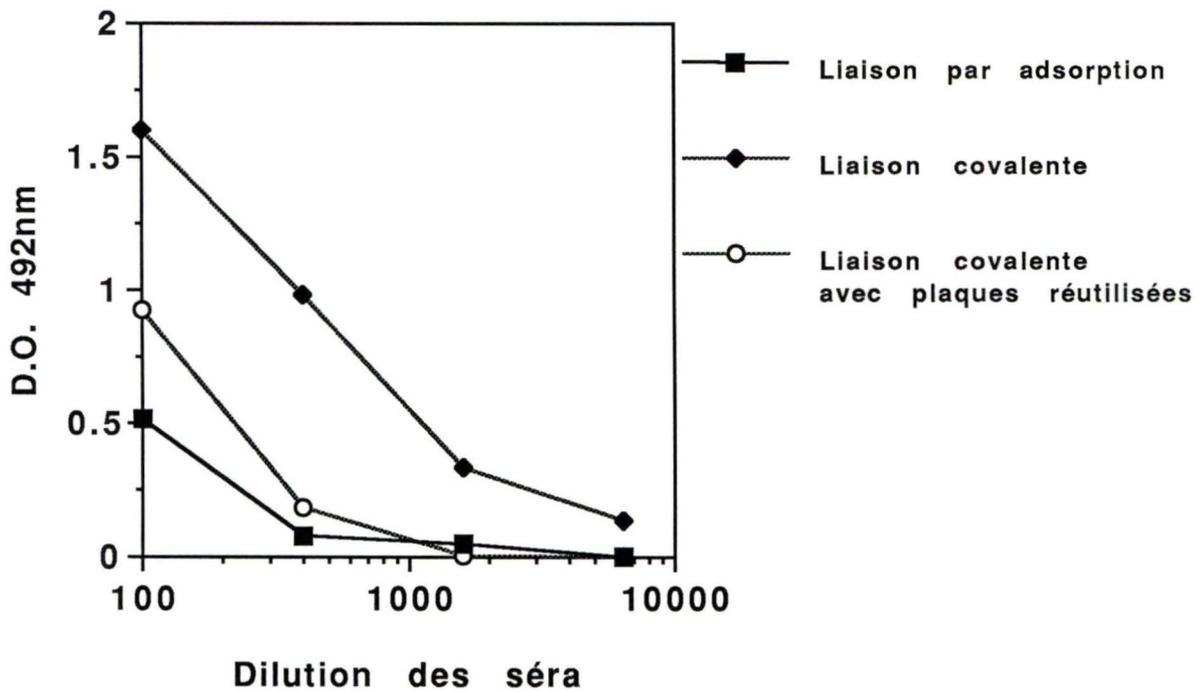
## **5.3 Utilisation de la méthode de liaison covalente pour les tests de dépistage**

La possibilité d'utiliser la méthode de liaison covalente pour améliorer la sensibilité de détection des essais ELISA, a également été vérifiée avec des séra de souris immunisées avec un peptide dérivé de l'antigène du parasite responsable de la toxoplasmose (tableau IX). Les résultats illustrés à la figure 35 montrent que cette méthode de liaison permet d'augmenter de près de 6 fois le titre évalué en anticorps reconnaissant l'épitope du parasite par rapport à la liaison par simple adsorption. Il semblerait cependant que, contrairement au CGRP, l'amélioration de la sensibilité de détection serait dans ce cas-ci davantage dû à une augmentation de la liaison totale des peptides plutôt qu'à une liaison covalente, car lorsque les puits sont lavés et réutilisés, on note une diminution importante de la reconnaissance antigénique des peptides liés par la méthode DCC/NHS.



**FIGURE 34:** Spécificité de liaison des anticorps anti-CGRP aux peptides liés de façon covalente aux plaques ELISA

Une dilution 1 :1000 d'anticorps anti-CGRP a été préincubés pendant 2 heures avec 2  $\mu$ M de peptide 28-37 du CGRP ou avec 200  $\mu$ M de différents peptides témoins. Les anticorps ont ensuite été ajoutés à des plaques ELISA auxquelles le peptide 28-37 du CGRP a été lié de façon covalente. Seule une préincubation avec le peptide 28-37 du CGRP parvient à inhiber la liaison des anticorps anti-CGRP. La figure illustre les résultats obtenus lorsque l'antigène (peptide 28-37 du CGRP) est lié de façon covalente ou par adsorption. Le témoin représente la liaison des anticorps en absence de préincubation avec un peptide.



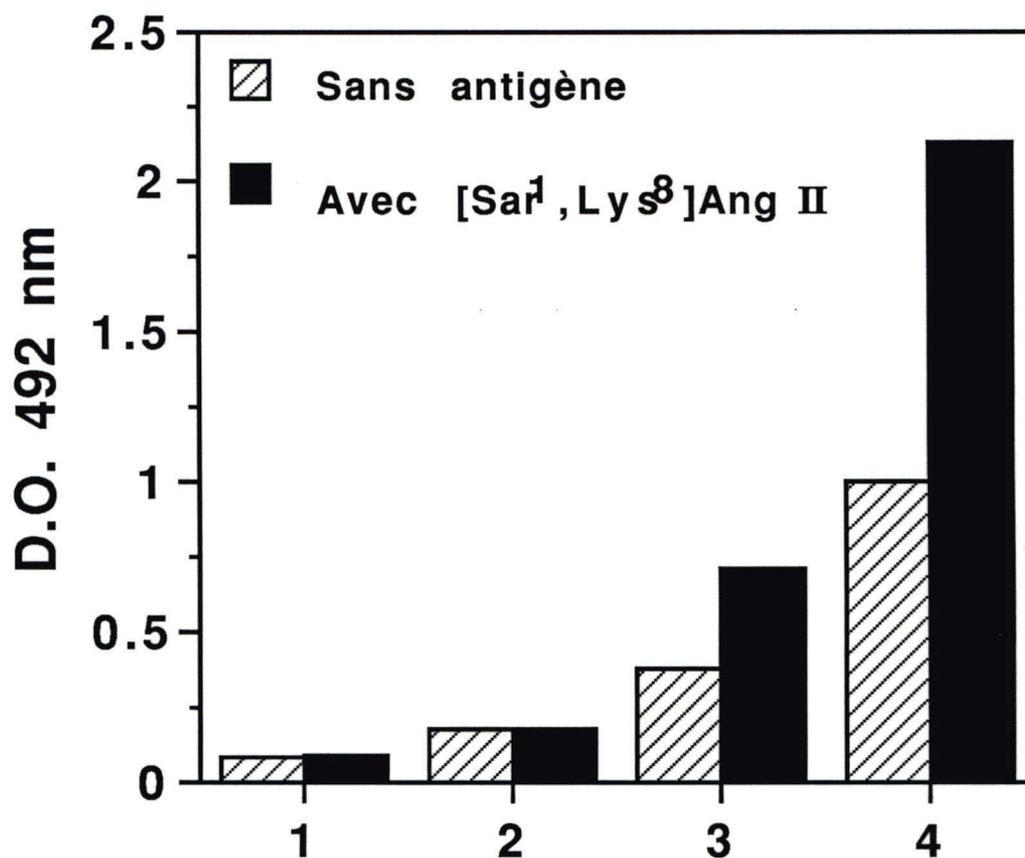
**FIGURE 35:** Effet de la liaison covalente de l'antigène peptidique aux plaques ELISA sur le dosage d'anticorps anti-toxoplasmose chez la souris

Le peptide de la toxoplasmose (voir tableau IX) a été lié à la plaque ELISA à une concentration de 10 µg/ml à l'aide de la méthode de liaison covalente, ou par adsorption (i.e. incubation dans un tampon sodique carbonate/bicarbonate à pH 9.6). Suite au dosage, les plaques ELISA auxquelles les peptides ont été liés de façon covalente ont été lavées avec du SDS 5% aqueux à 100°C et le dosage d'anticorps a été répété.

#### 5.4 Dosage ELISA d'anticorps anti-angiotensine II avec la méthode de liaison covalente

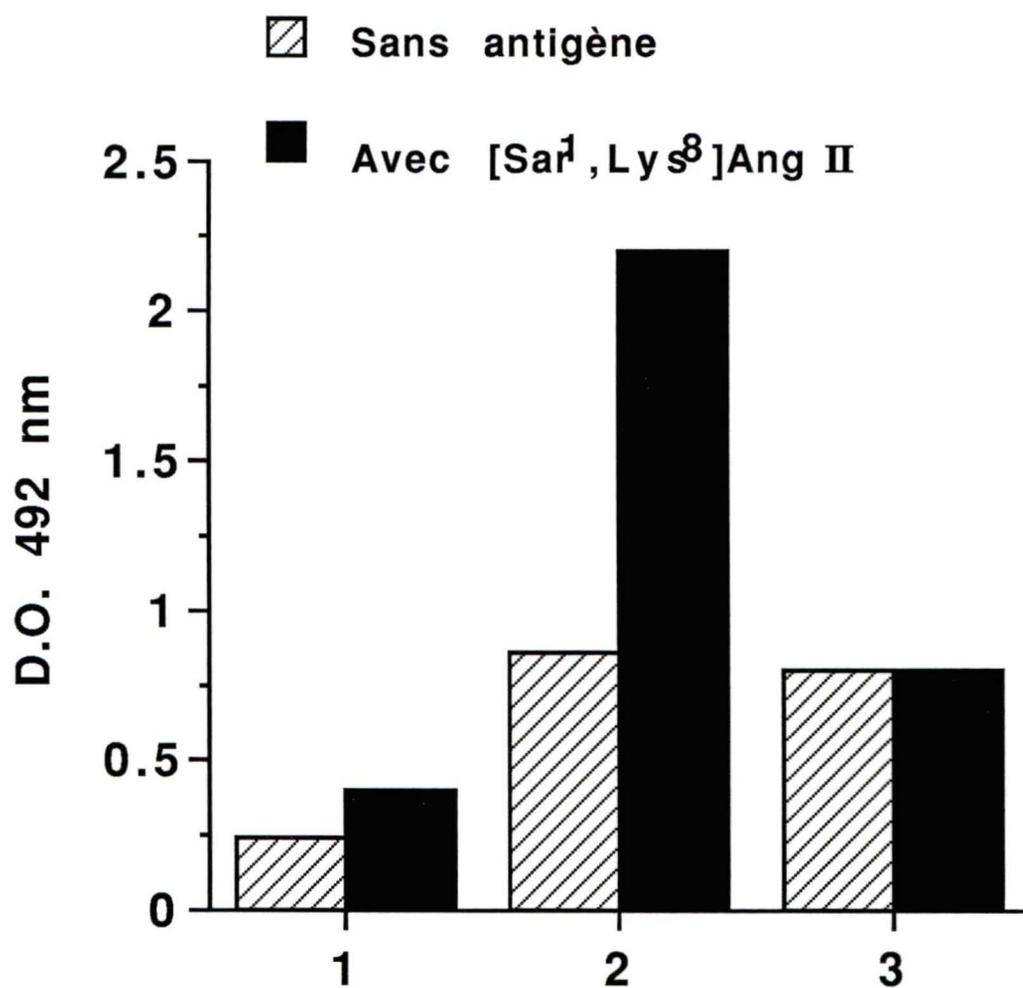
Suite aux immunisations effectuées avec les peptides comportant des acides aminés pseudo-lipidiques, des essais ELISA ont été effectués avec l'Ang II liée de façon covalente. Si on soustrait les densités optiques obtenues en absence de peptides, de celles obtenues en présence de peptides, on obtient présumément la présence d'anticorps "spécifiques" dans les séra de souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA et l'Ang II-tétramère, et l'absence de ces anticorps dans les séra de souris non immunisées ou injectées avec [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8</sup>]Ang II (figure 36). D'autres résultats obtenus par essai ELISA avec l'Ang II liée de façon covalente peuvent toutefois nous mener à d'autres conclusions. On note par exemple à la figure 37, la présence d'anticorps anti-Ang II de type IgG chez des souris immunisées avec de la BSA uniquement, et le titre en anticorps augmente avec les rappels d'immunisation. D'autre part, aucun anticorps anti-Ang II n'a été décelé chez une souris ayant reçu plusieurs rappels d'Ang II conjuguée à la BSA par la maléimide.

Afin de vérifier l'éventuelle spécificité de liaison des anticorps des séra de souris injectées avec la BSA, ces séra ont été préincubés avec une concentration saturante d'Ang II [ $10^{-4}$ ] avant d'être ajoutés aux plaques ELISA (figure 38). Cette préincubation n'est toutefois pas parvenue à baisser la D.O. observée, ce qui laisse croire que la majorité de la liaison des anticorps est probablement de nature non spécifique. Dans le but de confirmer cette hypothèse nous avons vérifié si les séra de souris injectées avec de la BSA pouvaient lier aussi d'autres types de peptides conjugués de façon covalente au polystyrène. La figure 38 montre qu'aucune liaison d'anticorps n'est retrouvée avec certains peptides tel que le AIP ou la substance K modifié, mais tel l'Ang II, une forte liaison non déplaçable est obtenue avec la substance P (4-11) modifié. Ce type de liaison non spécifique a été retrouvé seulement avec certains séra hyperimmun (i.e. dont le taux d'anticorps est élevé) et s'atténue progressivement avec le temps d'entreposage des séra, de sorte



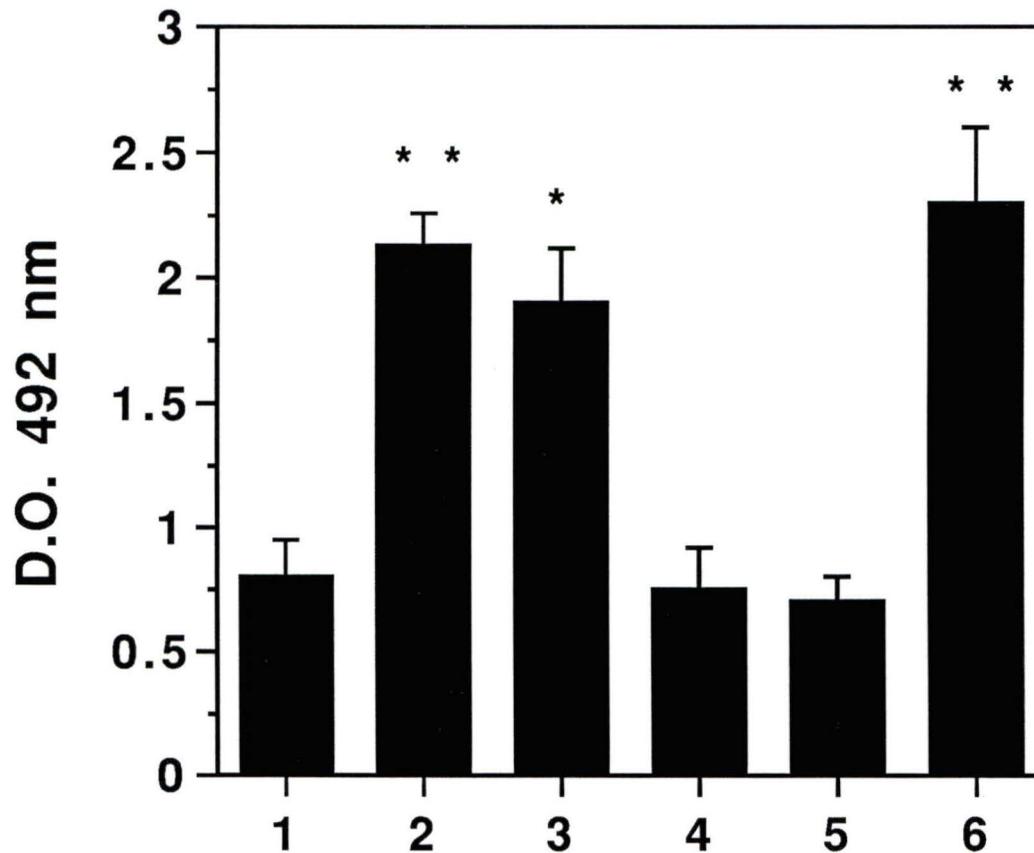
**FIGURE 36:** Essai de dosage d'anticorps anti-angiotensine II à l'aide de la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II liée de façon covalente aux plaques ELISA

La figure illustre un résultat représentatif de l'ensemble des dosages effectués. Séra testés: 1: souris non immunisées 2: souris injectée 5 fois avec le peptide [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8</sup>]Ang II 3: souris injectée 2 fois avec Ang II-tétramère 4: souris #3 injectée 6 fois avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA. Les séra ont été utilisés à une dilution finale de 1 :100.



**FIGURE 37:** Dosage d'anticorps anti-angiotensine II dans des séras de souris injectées avec la BSA

La figure illustre un résultat représentatif de l'ensemble des dosages effectués. Le peptide [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II a été lié de façon covalente aux plaques ELISA. Les séras testés, dilués 1:100, sont : 1: d'une souris injectée 1 fois avec la BSA 2: d'une souris injectée 5 fois avec de la BSA 3: d'une souris injectée 6 fois avec [Sar<sup>1</sup>,Phe<sup>8</sup>-SH]Ang II-MBSA.



**FIGURE 38:** Spécificité des dosages d'anticorps anti-angiotensine II avec l'antigène lié de façon covalente aux plaques ELISA

Des séra provenant de souris ayant été injectées 5 fois avec la BSA ont été testés en ELISA avec des plaques ayant d'abord été traitées soit 1: sans antigène 2: avec 10 µg/ml de [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II 3: avec 10 µg/ml de [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II et les séra ont d'abord été préincubés avec une concentration saturante de 10<sup>-4</sup> M de [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II 4: avec 10 µg/ml de AIP 5: avec 10 µg/ml de substance K modifié 6: avec 10 µg/ml de substance P (4-11) modifié. Les séra ont été utilisés à une dilution finale de 1:100. Les résultats représentent la moyenne et l'écart à la moyenne (S.E.M.) des dosages de 4 sera de souris.

\* p<0.001; \*\* p<0.0005.

qu'après une période d'un an la liaison non spécifique avait diminué dans certains cas de 90%. Aucune liaison spécifique des anticorps anti-Ang II n'a néanmoins pu être décelée même après la diminution de la liaison non-spécifique.

Nous avons alors supposé que la non-reconnaissance de l'Ang II liée directement au PS, pouvait être dûe à un empêchement stérique causé par la proximité du PS, qui nuirait à la liaison anticorps-antigène. Pour vérifier cette possibilité, nous avons synthétisé un nouvel analogue de l'Ang II auquel on a ajouté une séquence d'acide aminé servant à espacer le peptide de la plaque. La [Sar<sup>1</sup>,Aca<sup>8</sup>,Lys<sup>9,10,11</sup>]Ang II a donc été lié au PS en utilisant la méthode de liaison covalente, puis testée en ELISA avec les séra des souris #1 à 4 (7<sup>e</sup> rappel) riches en anticorps anti-Ang II (figure 15). Aucune amélioration de la détection n'a cependant pu être obtenue avec ce peptide (résultats non montrés), les anticorps anti-Ang II demeurant incapables de reconnaître le peptide lorsqu'il est lié directement à la surface de la plaque ELISA.

Nous avons donc, pour ces raisons, choisi d'utiliser l'Ang II conjugué à une protéine pour compléter nos études sur l'immunogénicité des peptides avec acides aminés pseudo-lipidiques.

### **III- Reconnaissance croisée des analogues non-peptidiques de l'angiotensine II par des anticorps anti-angiotensine II**

Pour réaliser ces expériences, les séra de souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA (conjugué avec EDC) ont été utilisés (tableau VIII). La première étape consistait à déterminer les dilutions de séra nécessaires pour faire les courbes de compétition, soit les dilutions donnant une D.O. de 50% de la coloration maximale obtenue en ELISA. Ces dilutions ont été déterminées comme suit, soit pour la souris #1 : 1/800; #2 : 1/740; #3 : 1/900; #4 : 1/1080; #5 : 1/620; #6 : 1/680; #7 : 1/320; #8 : 1/890 ( voir figure 15).

Des essais ELISA utilisant soit la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-KLH conjugué avec glutaraldéhyde, qui expose principalement l'extrémité

N-terminale de l'Ang II, ou la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH conjugué avec DSS, qui expose au contraire l'extrémité C-terminale du peptide, ont été réalisés avec les différents séra préincubés ou non en présence de fortes concentrations de peptides [10<sup>-4</sup>M] ou de non-peptides [10<sup>-3</sup>M] (figure 39). Une inhibition de la liaison des anticorps inférieure à 20% a été considérée non spécifique car tous les peptides ou non-peptides utilisés comme témoins dans nos essais (composés non reliés à l'Ang II, i.e.: CP-96,345, Naloxone, ACTH) ont produit une inhibition équivalente ou inférieure à 20%.

Les ligands sélectifs pour le récepteur AT<sub>2</sub>, soit le PD-123,177 et le PD-123,319 ne démontrent aucune réactivité croisée avec les anticorps anti-Ang II, tel qu'observé avec les deux antigènes utilisés pour la détection des anticorps spécifiques. Par contre, dans le cas de la saralazine, un antagoniste peptidique de l'Ang II, on obtient une inhibition hautement significative de la liaison des anticorps avec tous les séra testés (figure 39). L'Ang II elle-même, déplace entièrement et dans tous les cas, les anticorps détectés par les deux antigènes, et ce à une concentration de 10<sup>-6</sup> M (figure 12). Les inhibitions obtenues avec les antagonistes non-peptidiques du récepteur AT<sub>1</sub> se résument ainsi: premièrement, le composé ayant la plus grande affinité pour le récepteur AT<sub>1</sub> soit le L-158,809, est également celui qui montre le plus de réactivité croisée, non seulement en pourcentage d'inhibition, mais aussi avec le plus grand nombre de séra (figure 40). Le L-158,809 parvient à déplacer les anticorps anti-Ang II de 7 séra sur 8 lorsqu'on utilise l'Ang II immobilisée du côté C-terminal, et les anticorps de 4 séra sur 7 sont déplacés lorsqu'on utilise la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II pour la détection (immobilisée du côté N-terminal) (figure 40). Les séra qui sont peu ou pas affectés par l'addition du L-158,809 sont les mêmes avec les deux antigènes. Les autres antagonistes non-peptidiques AT<sub>1</sub> utilisés : le Dup 753, le Dup 532 et le Exp 3174 sont soit non reconnus, ou n'interagissent que faiblement (inhibition <30%) avec les séra avec lesquels ils ont été mis en contact, à l'exception du sérum de la souris #6. Les anticorps de ce sérum, en plus d'interagir avec le L-158,809, sont aussi inhibés fortement

Antigène liée du côté C-terminal

Antigène liée du côté N-terminal

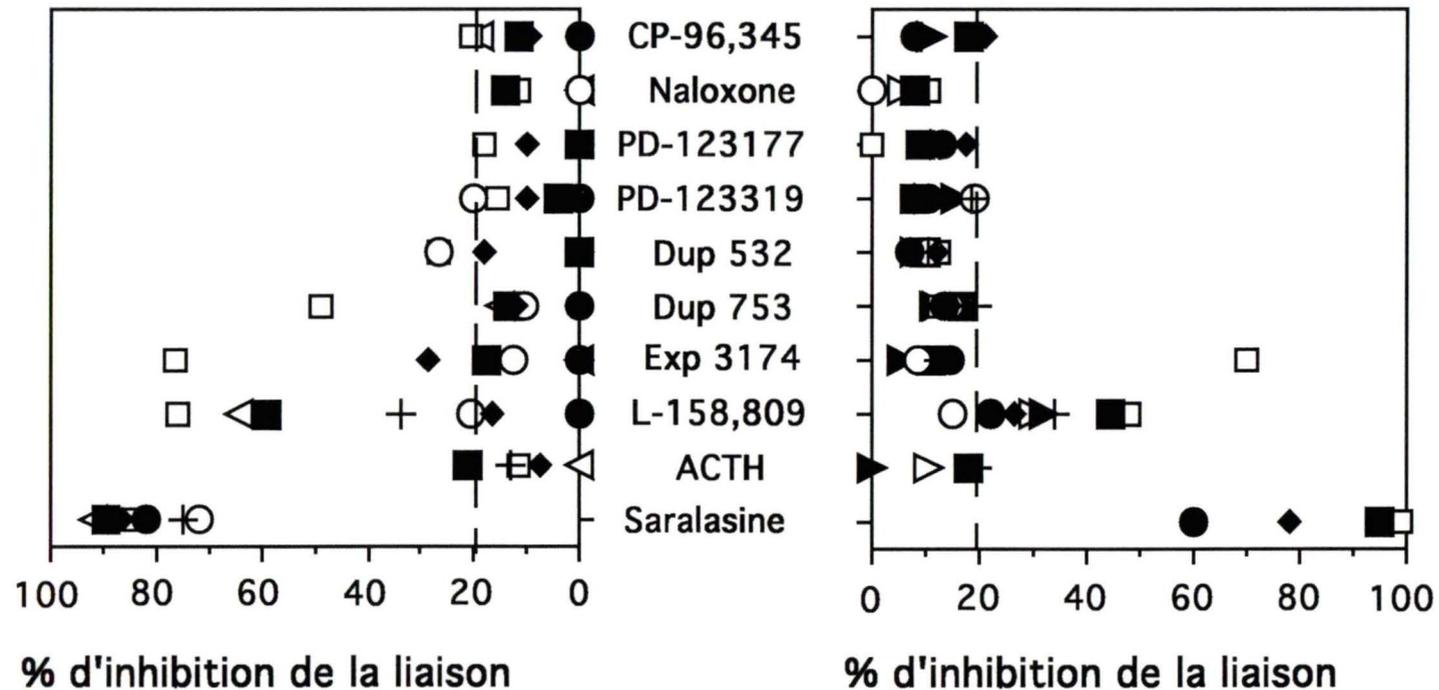
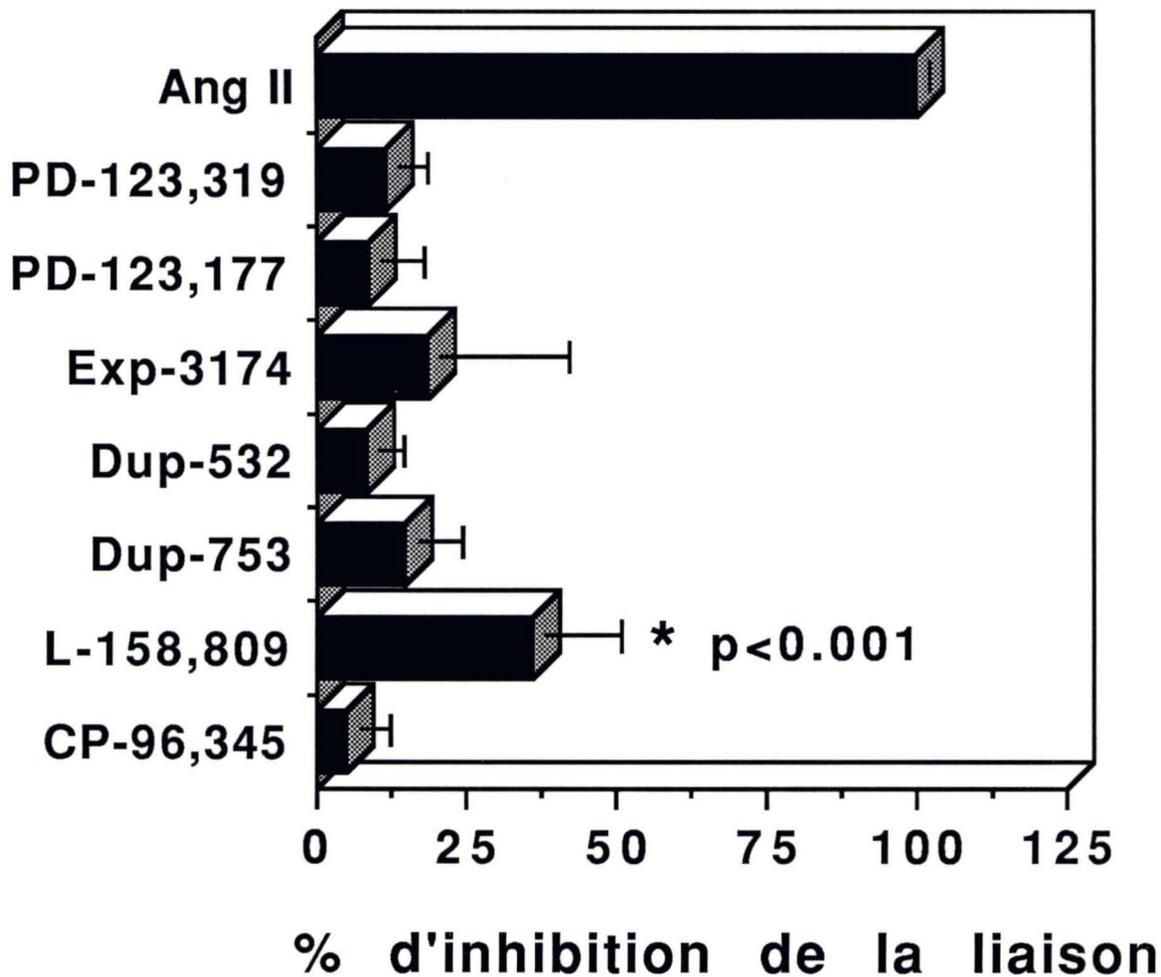


FIGURE 39: Réactivité croisée d'anticorps anti-angiotensine II

Les séras de souris immunisées avec [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA ont été utilisés à une dilution donnant 50% de la D.O. maximale obtenue par essai ELISA. Les séras ont été préincubés avec 1mM des substances de nature non-peptidique ou avec 0.1mM des substances de nature peptidique. L'inhibition de la liaison des anticorps anti-Ang II mesuré par essai ELISA est exprimé en pourcentage de liaison obtenue en absence de substances ajoutées aux séras. Les séras testés sont des souris: #1: +, #2: ◆, #3: ●, #4: ○, #5: ■, #6: □, #7: ▲, #8: △. Les antigènes utilisés sont la [Sar<sup>1</sup>]Ang II liée à la KLH à l'aide du DSS (du côté droit) et la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II liée à la KLH par la glutaraldéhyde (du côté gauche).



**FIGURE 40:** Réactivités croisées des anticorps anti-angiotensine II avec des analogues non-peptidiques de l'angiotensine II

Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de toutes les inhibitions mesurées par essai ELISA de compétition avec 8 séras de souris suite à une préincubation des séras avec 1mM des analogues non-peptidiques ou 0.1mM de [Sar<sup>1</sup>]Ang II. La [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH a été utilisée pour la détection des anticorps anti-Ang II.

(inhibition >70%) par le Exp 3174, et de moyennement (>30% et <70% d'inhibition) à faiblement par le Dup 753 et le Dup 532 respectivement. Toutefois, dans ces deux derniers cas, seulement en utilisant l'Ang II immobilisée du côté C-terminal.

Seul le sérum de la souris #6 a été utilisé par la suite pour comparer l'efficacité d'inhibition des anticorps anti-Ang II. Les expériences de compétitions ont été répétées plusieurs fois avec ce sérum (figure 41).

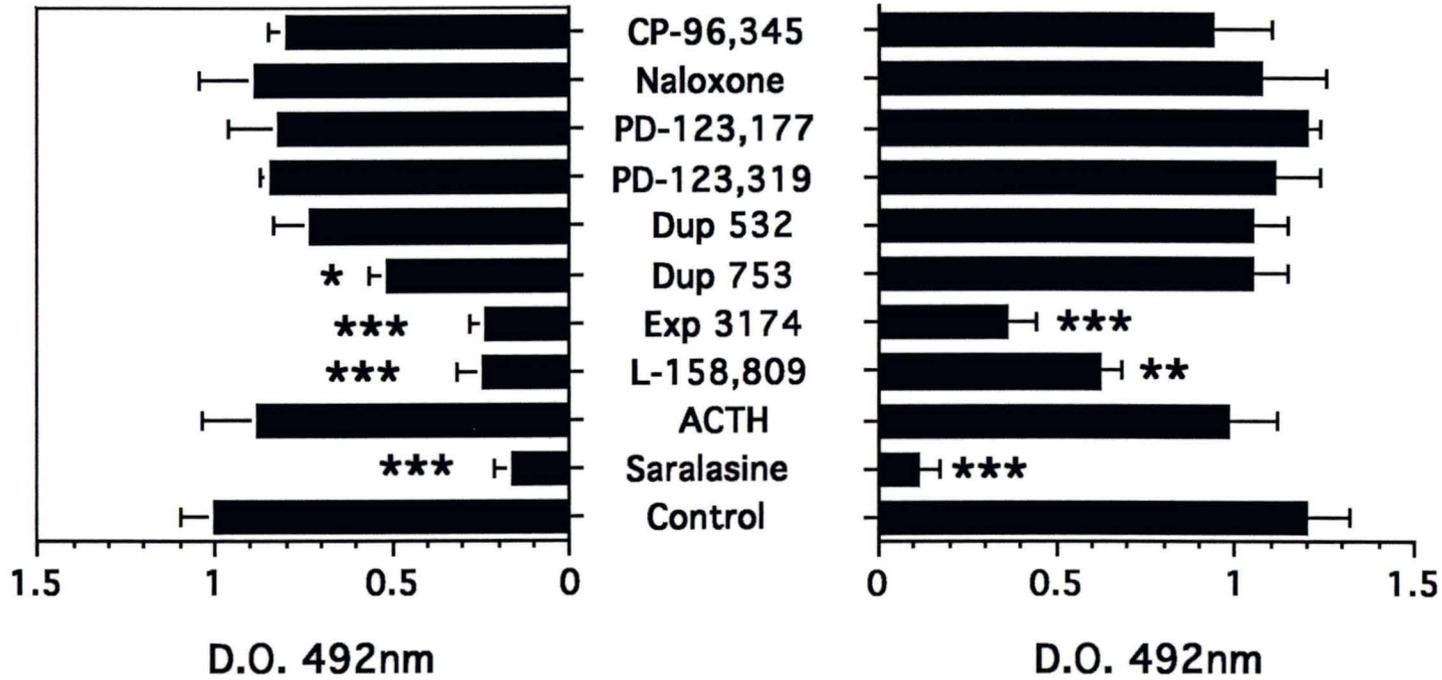
Toutes les réactivités croisées obtenues avec la saralazine et les antagonistes AT<sub>1</sub> ont été confirmées, à l'exception du faible déplacement observé d'abord avec le Dup 532 qui s'est avéré non significatif (figure 41). Les autres composés n'ont eu aucun effet inhibiteur sur la liaison des anticorps anti-Ang II du sérum de la souris #6 par rapport au témoin.

En utilisant des concentrations croissantes [ $10^{-13}$ M à  $10^{-2}$ M] de substances ajoutés aux séra, on obtient les courbes d'inhibition présentées à la figure 42. Deux antagonistes peptidiques de l'Ang II, soit la saralazine ([Sar<sup>1</sup>,Ala<sup>8</sup>]Ang II), et la [Sar<sup>1</sup>,Phe (Br<sub>5</sub>)<sup>8</sup>]Ang II, ainsi qu'un agoniste, la [Sar<sup>1</sup>]Ang II, ont été comparés avec les meilleurs compétiteurs non-peptidiques, soit les antagonistes L-158,809 et Exp 3174 en utilisant l'Ang II liée du côté N-terminal ([Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH) pour la détection des anticorps spécifiques. Les 4 antagonistes utilisés déplacent entièrement les anticorps concentration-dépendante selon un profil sigmoïdal. Les deux antagonistes peptidiques ont des IC<sub>50</sub> similaires de 0.465 mM pour la [Sar<sup>1</sup>,Phe (Br<sub>5</sub>)<sup>8</sup>]Ang II et de 0.485 mM pour la saralazine, alors que les substances non-peptidiques produisent une inhibition complète plus faible soit avec des IC<sub>50</sub> de 3.3 mM pour le L-158,809 et de 3.7 mM pour le Exp 3174. Une différence d'environ 6 unités logarithmiques sépare l'affinité de ces antagonistes de l'affinité retrouvée avec l'antigène peptidique original la [Sar<sup>1</sup>]Ang II dont le IC<sub>50</sub> est de  $9.7 \times 10^{-9}$ M.

### Antigène liée du côté C-terminal

### Antigène liée du côté N-terminal

105



**FIGURE 41:** Réactivité croisée des anticorps anti-angiotensine II du sérum de la souris #6 avec des analogues non-peptidiques de l'angiotensine II

Le sérum de la souris #6 immunisée avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA a été utilisé selon les conditions décrites à la figure 39. Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de 3 expériences .

\* :p<0.05; \* \*:p<0.005; \* \* \*:p<0.001.

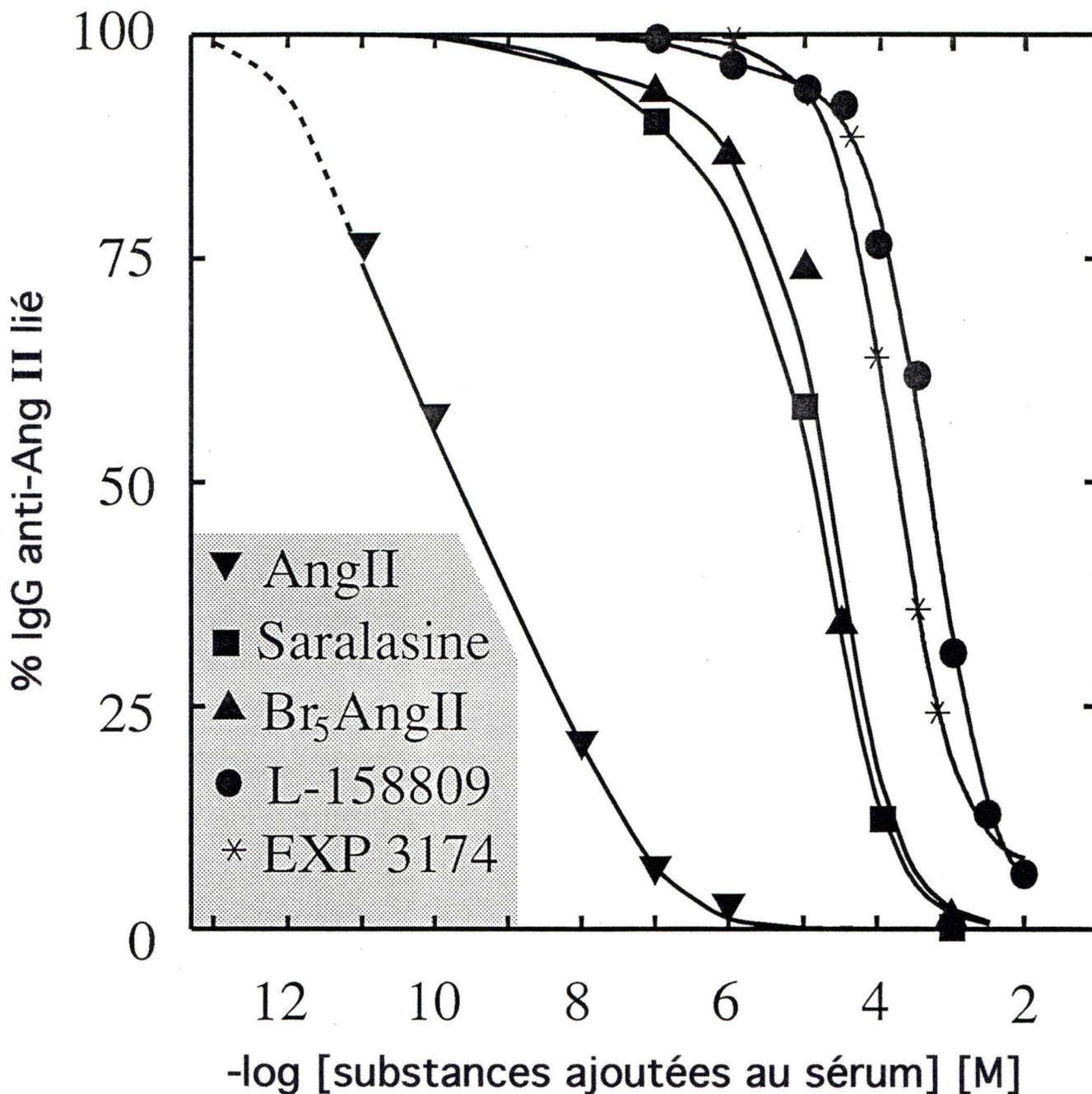
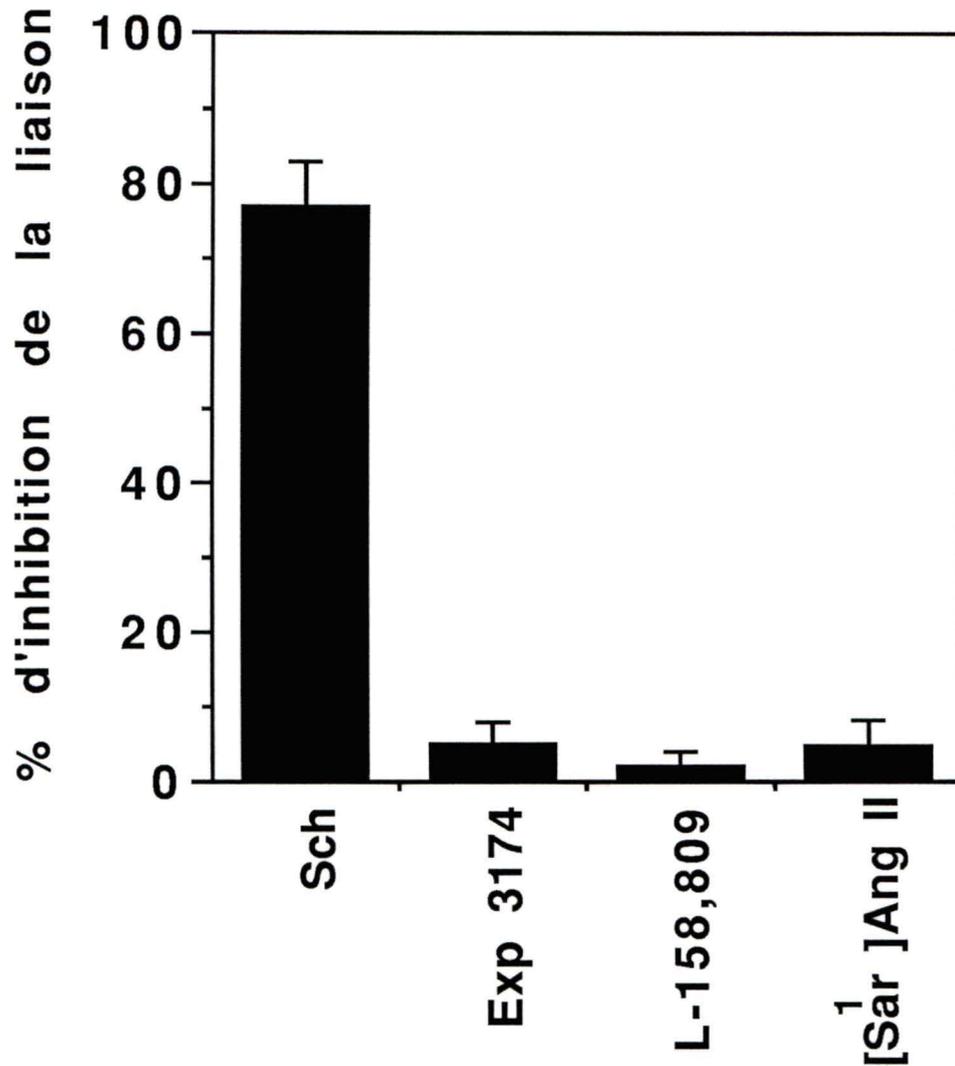


FIGURE 42: Courbe d'inhibition des complexes immuns anti-angiotensine II avec le sérum de la souris #6 testé par ELISA de compétition

Le sérum de la souris #6 injectée avec de la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA a été préincubé avec différentes concentrations de substances de nature peptidique ou non-peptidique avant d'être testé en ELISA avec la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II-KLH .

Afin de s'assurer davantage de la spécificité d'inhibition de la liaison des anticorps, l'effet inhibiteur du L-158,809 et du Exp 3174, ainsi que de la [Sar<sup>1</sup>]Ang II a été vérifié avec un sérum immun témoin non relié à l'Ang II (figure 43). Nous avons choisi pour ce faire d'utiliser un sérum de souris injectée avec le peptide du Schistosome (Sch-ovalbumine) (Voir section I des résultats). Tel que montré précédemment (figure 19), le peptide Sch produit un effet inhibiteur élevé (supérieur à 80%) sur la liaison des anticorps anti-Sch, lorsqu'ajouté au sérum à une concentration de  $10^{-4}$ M, mais aucun déplacement significatif n'est obtenu avec les antagonistes non-peptidiques ou avec l'Ang II ajoutés à une concentration 10 fois plus grande [ $10^{-3}$ M].



**FIGURE 43:** ELISA de compétition avec des séra témoins

Des séra de souris injectées avec le peptide Sch-ovalbumine ont été préincubés avec 0.1mM de peptide Sch ou avec 1mM de Exp 3174, L-158,809 ou de [Sar<sup>1</sup>]Ang II avant d'être testé en ELISA en utilisant la Sch-KLH pour la détection d'anticorps. Les résultats représentent la moyenne et l'écart type (S.D.) de 3 expériences et sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la D.O. obtenue en ELISA en absence de substances ajoutées aux séra.

## **DISCUSSION**

### **I- Propriétés immunogéniques des peptides à longues chaînes aliphatiques**

La production d'anticorps contre des antigènes peptidiques est aujourd'hui couramment utilisée, principalement dans le but d'isoler et de caractériser des produits de gènes; d'identifier, purifier, caractériser, quantifier, localiser, distinguer et pour étudier les fonctions et la structure antigénique des protéines et des polypeptides; et finalement pour fabriquer des vaccins synthétiques (Walter, 1986; Van Regenmortel et al., 1988; Wisdom, 1992). L'intérêt relié aux vaccins synthétiques est en évolution croissante étant donné les différents inconvénients associés à l'utilisation des vaccins classiques (énumérés dans l'introduction). A l'heure actuelle, l'efficacité de plusieurs vaccins à base de peptides synthétiques a déjà été évaluée dont des vaccins contre le "foot and mouth disease", l'influenza, l'hépatite B, le choléra, la malaria, etc. (Ghose et Karush, 1988; Van Regenmortel et al., 1988; Koolen et al., 1990; Salcedo et al., 1991; Trudel et al., 1991).

L'un des problèmes importants associé à l'utilisation de peptides pour la vaccination demeure toutefois le faible pouvoir immunogénique des antigènes de bas poids moléculaires. Leurs caractères souvent hapténiques oblige l'emploi de certains immunostimulateurs (par exemple : adjuvants de Freund et porteurs protéiques) qui peuvent provoquer de nombreux effets secondaires indésirables.

Plusieurs alternatives à ces adjuvants et aux protéines porteuses ont été récemment développées et sont actuellement évaluées pour leurs possibilités d'utilisation dans la vaccination ou l'immunisation animale ou humaine. Certaines de ces nouvelles méthodes ont déjà été brièvement présentées dans l'introduction (liposomes, le MAPS ou pieuvre peptidique, et les dérivés de la paroi cellulaire bactérienne), et quelques autres aussi prometteuses

seront également discutées à la fin de cette section.

L'une d'entre elles, la conjugaison à des chaînes aliphatiques, nous a paru particulièrement intéressante étant donné sa simplicité, ses avantages potentiels et le peu d'études antérieures ayant été effectuées sur le sujet. La possibilité d'ajouter des chaînes aliphatiques à différents acides aminés, pour ensuite les incorporer à des endroits stratégiques lors de la synthèse peptidique, fait partie des points d'intérêts principaux de ce travail. Le premier objectif de nos travaux a donc été d'évaluer l'effet de l'addition de chaînes aliphatiques sur la capacité immunogénique de petits peptides synthétiques modèles. Ces effets ont été vérifiés sur la réponse humorale induite chez des souris BALB/c, et les productions d'anticorps ont pu être évaluées à l'aide de la méthode de dosage ELISA.

## 1. ELISA: Spécificité

Les dosages ELISA demeurent parmi les méthodes les plus rapides, simples, efficaces et sensibles pour évaluer la présence d'anticorps spécifiques (Engvall et Perlmann, 1972; Steward et Lew, 1985; Van Regenmortel et al., 1988). La sensibilité de cet essai peut permettre de détecter des anticorps à une concentration de l'ordre du ng/ml dans le cas d'antigènes protéiques (Engvall et Perlmann, 1972). Les premières expériences réalisées avec cette méthode nous ont toutefois permis de juger des difficultés pouvant être associées à la mise au point d'un tel essai dans le cas d'antigènes ayant peu d'adhérence aux surfaces de plastique utilisées en ELISA. Nous avons pu constater par nos essais que le simple fait de préincuber les plaques ELISA de polystyrène en présence d'un tampon pouvait modifier l'adsorption à la surface de plastique, et augmenter considérablement la liaison non spécifique des anticorps, et ce malgré la présence d'une étape de saturation. La comparaison de la liaison des anticorps sériques en présence de l'antigène dans la plaque ELISA (antigène incubé dans le tampon de liaison), par rapport à la liaison des anticorps en absence de l'antigène (absence aussi du

tampon de liaison), peut alors donner l'impression de la présence d'anticorps reconnaissant spécifiquement l'antigène, alors qu'il s'agit plutôt d'une augmentation de liaison non-spécifique des anticorps.

Étant donné que la liaison non spécifique est pratiquement absente dans le cas des séra de souris non immunisées par rapport aux souris injectées avec de la BSA (conjuguée ou non), on peut supposer que la hausse de liaisons non spécifiques est due à la présence d'anticorps dirigés contre la BSA. Cette hypothèse est d'autant plus plausible du fait que la majorité des anticorps produits sont principalement dirigés contre le porteur protéique (figure 23). Il a aussi été démontré que les immunisations à l'aide FCA provoque une forte augmentation de la production des anticorps non spécifiques totaux (Kenney et al., 1989; Deeb et al., 1992). Toutefois, ces anticorps ne semblent pas être la cause de la hausse de la liaison non spécifique dans notre étude, puisque plusieurs séra de souris immunisées avec des peptides émulsionnés dans le FCA n'ont pas montré un taux élevé de liaison non spécifique par dosage ELISA.

La spécificité des essais ELISA qui ont été utilisés pour évaluer les productions d'anticorps anti-Ang II et anti-Sch a pu être vérifiée de plusieurs façons. Premièrement, afin d'éviter la liaison d'anticorps non spécifiques, il est important d'utiliser pour la détection, une protéine et même un agent de couplage qui n'ont pas été utilisés lors de l'immunisation. Il a en effet été démontré que la conjugaison peptide-protéine pouvait provoquer la présence de nouveaux déterminants antigéniques dû aux agents de couplage (Briand et al., 1985). Afin d'éviter une reconnaissance non désirée de ces nouveaux déterminants par les anticorps, la KLH conjuguée à l'aide de DSS a été utilisée pour la détection des anticorps, ces deux substances n'ayant pas été utilisées lors des immunisations avec Ang II et Sch.

Deuxièmement, pour chacune des dilutions de séra étudiées, la densité optique (D.O.) obtenue en présence de KLH seule a été

soustraite de la D.O. obtenue soit avec la Sch-KLH ou avec l'Ang II-KLH de façon à éliminer la liaison non-spécifique des anticorps à la KLH ou à la surface des plaques ELISA.

Troisièmement l'absence de liaison d'anticorps provenant de séra hyperimmuns non spécifiques (séras de souris immunisées avec des antigènes témoins sans rapport aux antigènes utilisés pour la détection) a été vérifiée pour chacun des antigènes soit a) avec des séras de souris immunisées avec la BSA pour les ELISA utilisant l'Ang II-KLH pour la détection d'anticorps (figure 13) et b) avec des séras de souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA pour les essais ELISA utilisant la Sch-KLH pour la détection (figure 19).

Enfin, quatrièmement, la méthode la plus sûre pour s'assurer de la spécificité de liaison des anticorps en ELISA, demeure la compétition ou le déplacement des anticorps, par une préincubation des séras avec une concentration saturante de l'antigène peptidique utilisé pour l'immunisation (Engvall et Perlmann, 1972). On constate à la figure 13 que lorsque les séras de souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA sont préincubés avec [10<sup>-6</sup>M] de [Sar<sup>1</sup>]Ang II, on obtient une absence de liaison des anticorps à la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-KLH dans l'essai ELISA. Au contraire, lorsque le peptide n'est pas ajouté au sérum, la D.O. observée en ELISA est élevée (figure 13, colonne 6), ce qui confirme que les anticorps dosés sont spécifiques à l'Ang II. La même spécificité de liaison a également été démontrée en utilisant la Sch-KLH pour la détection des anticorps (figure 19).

## **2. Dosage des anticorps sériques**

Après s'être assuré de la spécificité des essais ELISA, le dosage des anticorps anti-peptide peut être entrepris. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser comme titre, la dilution maximale de sérum donnant une D.O. de 0.1 supérieur à l'absorbance mesurée avec les puits témoins (KLH seul). La D.O. de 0.1 constitue donc la limite choisie pour une réponse positive. Cette limite relativement peu élevée permet de détecter les anticorps de fortes et de faibles affinités (Peterfy et al., 1983; Lehtonen et Eerola, 1982). Malgré tout, les titres déterminés en ELISA ne constituent qu'une méthode

semi-quantitative pour comparer les taux d'anticorps spécifiques retrouvés dans chaque sérum. Afin de comparer adéquatement les titres obtenus, il est donc important de toujours utiliser des conditions standardisées avec tous les séra dosés (plaques, antigènes, réactifs, temps d'incubation, etc) .

### **3. Évaluation de l'affinité des anticorps**

Dans les essais ELISA que nous avons effectués, l'affinité des anticorps n'a pas été déterminée. Il est possible d'évaluer qualitativement l'affinité par ELISA en comparant simplement les D.O. obtenues à faibles dilutions de séra (Steward et Lew, 1985), mais nous avons jugé qu'une telle détermination pouvait être superflue, étant donné a) que très peu de séra d'intérêts (i.e. séra de souris immunisées avec peptides comportant des acides aminés pseudo-lipidiques) possédaient des taux appréciables d'anticorps, b) que l'affinité mesurée pour des anticorps polyclonaux ne représente qu'une moyenne d'affinités d'une multitude d'anticorps différents.

### **4. Efficacité des porteurs protéiques pour la production d'anticorps anti-peptides**

Afin d'obtenir une production d'anticorps spécifiques, les antigènes de natures protéiques doivent être reconnus par des immunoglobulines de surface de lymphocytes B, internalisés, fragmentés, puis représentés sous forme de différents déterminants antigéniques liés aux complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II des lymphocytes B ou de d'autres cellules présentatrices d'antigènes (APC) (Abbas et al., 1991). Pour provoquer une réponse immunitaire complète, l'antigène doit donc être au moins reconnu par les lymphocytes B et T, et l'un des facteurs qui affecte cette reconnaissance peut être la taille de l'antigène. Les peptides de petites tailles ont souvent tendance à jouer un rôle d'haptène lors de l'immunisation. La taille ou le poids moléculaire ne sont toutefois pas les seuls facteurs qui influence l'antigénicité des peptides, puisqu'il a été démontré qu'il est possible d'induire une production

d'anticorps dirigés contre des peptides non conjugués de seulement 6 ou 7 acides aminés (Young et Atassi, 1985). Par ailleurs, certains polypeptides de plus de 30 acides aminés sont non-immunogènes (Loleit et al., 1990). Cependant puisque les petits peptides sont rarement immunogènes, la méthode la plus souvent utilisée pour produire des anticorps consiste à les conjuguer à des porteurs qui sont souvent de nature protéique (Briand et al., 1985; Van Regenmortel et al., 1988).

#### **4.1 Anticorps anti-angiotensine II**

Les conjugués peptides-protéines que nous avons utilisés, nous ont servi de témoins positifs pour comparer les productions d'anticorps dirigés contre des peptides modèles choisis. Le premier peptide modèle utilisé a été l'angiotensine II (Ang II), un peptide de 8 acides aminés reconnu pour sa faible immunogénicité (Abruzzini et Thomas, 1983). Les essais ELISA nous ont permis de constater qu'effectivement peu d'anticorps ont pu être produits contre l'Ang II non conjuguée utilisée pour l'immunisation (figure 13 et 16). Une seule souris sur 4 a développé quelques anticorps de type IgG et IgM alors que chez les 3 autres, aucun anticorps anti-Ang II n'a pu être décelé à aucun moment, et ce malgré 8 injections du peptide. Au contraire, en utilisant l'Ang II conjuguée à la BSA à l'aide d'un carbodiimide, le peptide a induit une production d'anticorps spécifiques de type IgG qui a persisté à long terme. Comme un rapport de 5 à 10 moles d'Ang II par mole de BSA a été utilisé pour immuniser les souris (tableau VIII), si on compare avec l'Ang II non conjuguée, des doses 10 à 20 fois moins élevées du peptide conjugué sont parvenues à provoquer une réponse immunitaire (3.75 à 7.5 nmoles d'Ang II conjuguées vs 70 nmoles d'Ang II non conjugué). Selon Van Regenmortel et coll. (1988), des rapports de 5 à 20 moles de peptides par mole de protéine sont suffisants pour induire une production d'anticorps, alors qu'une densité de peptides trop élevée par protéine peut provoquer un effet de tolérance et un arrêt de la production d'anticorps.

Une très grande hétérogénéité a été noté dans l'importance des

réponses immunes et dans l'évolution de ces réponses par chacune des souris (figure 14 et 15). De telles différences dans la production d'anticorps polyclonaux ont déjà été observées même avec des lignées de races pures telles que les souris BALB/c (Couraud, 1986; Deeb et al., 1992; Marguerite et al., 1992).

Afin d'évaluer l'importance de la méthode de conjugaison sur la capacité immunogénique des conjugués peptides-protéines, l'Ang II a aussi été conjuguée à la BSA en utilisant la maléimide succinimide caproïque comme agent de couplage. Dans ce dernier cas, un groupement thiol a d'abord été ajouté à l'extrémité C-terminale du peptide (en position 8 de l'Ang II) pour permettre sa liaison à la BSA activée par la maléimide. Contrairement à l'Ang II conjuguée à la BSA à l'aide de la méthode au carbodiimide, le peptide conjugué par la méthode à la maléimide a été très peu efficace pour produire des anticorps de type IgG spécifique à l'hormone, mais a été supérieure pour induire la production d'IgM. Cette différence d'immunogénicité entre les deux antigènes peut être le résultat de la présentation différente du peptide au système immunitaire, ou encore de différences dans les doses de peptides utilisées (taux peptides-protéines). Le taux de peptide conjugué à la BSA par la méthode à la maléimide n'a toutefois pas été déterminé et ne peut donc être comparé au taux d'Ang II conjuguée à la BSA par la méthode au carbodiimide (tableau VIII). Des anticorps anti-Ang II ont cependant pu être produits chez la majorité des souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-MBSA suggérant que suffisamment de peptides ont été conjugués aux protéines. La spécificité des deux méthodes de conjugaisons utilisées peut alors probablement expliquer en grande partie les divergences de résultats obtenus avec les deux antigènes. La conjugaison à la maléimide est spécifique aux groupements thiols (SH) (Van Regenmortel et al., 1988). L'Ang II n'a donc pu se lier à la protéine que par son extrémité C-terminale (Phe<sup>8</sup>) où le groupement thiol avait été ajouté. Dans l'autre cas, le carbodiimide réagit davantage avec les groupements carboxyliques (COOH) et les amines primaires (NH<sub>2</sub>), mais il peut tout de même interagir aussi avec les amines secondaires (NH) (Goodfriend et al., 1964). Il est possible que

l'Ang II couplée par la méthode au carbodiimide, soit donc en partie liée par son extrémité C-terminale, tandis qu'une autre fraction du peptide serait plutôt liée par l'amine secondaire de la sarcosine en position 1 aux fonctions carboxyliques de la BSA. Ce dernier conjugué (i.e. : l'Ang II liée par son extrémité N-terminale) pourrait être important pour la production d'anticorps anti-Ang II, car il a été fréquemment démontré que l'extrémité carboxylique de l'Ang II est la partie la plus immunogénique de l'hormone (Abruzzini et Thomas, 1983; Vallotton, 1970; Hermann et al., 1986; Couraud, 1986; Reilly et al., 1987; Nussberber et al., 1983). De plus, il est plus facile de produire des anticorps contre les sites antigéniques qui sont éloignés du porteur (Sela et al., 1962).

La thyroglobuline a également été utilisée comme porteur protéique pour l'Ang II, mais très peu d'anticorps anti-Ang II ont pu être produit à l'aide de cette protéine. Ce conjugué s'est aussi montré inefficace comme antigène en ELISA. La thyroglobuline a déjà été utilisée avec succès comme porteur protéique pour produire des anticorps contre l'Ang II (Hermann et al., 1986). Comme notre conjugué n'est pas reconnu par les anticorps anti-Ang II, et ce malgré le haut taux de liaison du peptide à la protéine (démonstré à l'aide de la [ $^{125}$ I-Tyr $^4$ ]Ang II), on peut supposer que la structure antigénique du peptide a pu être modifiée ou partiellement camouflé par la liaison covalente créée par la conjugaison à la glutaraldéhyde. De tels phénomènes peuvent se produire lors des conjugaisons peptides-protéines, surtout lors de l'utilisation d'agents de conjugaison peu spécifiques tels que la glutaraldéhyde (Briand et al., 1985). La glutaraldéhyde réagit surtout avec les groupements amines de la lysine, mais peut aussi lier les fonctions sulfhydryles, phénoliques et imidazoles (Van Regenmortel et al., 1988).

Les anticorps anti-Ang II ont d'abord été déterminés par essai ELISA en utilisant l'Ang II conjuguée à la KLH par son extrémité N-terminale (à l'aide du DSS), ce qui permettait d'exposer l'extrémité C-terminale du peptide: (KLH lien DSS [Sar $^1$ ]Ang II). L'Ang II conjuguée par son extrémité C-terminale ([Sar $^1$ ,Lys $^8$ ]Ang II

glutaraldéhyde KLH) a également été utilisée pour vérifier la présence d'anticorps anti-Ang II, et les résultats obtenues avec ce second antigène (non montrés) sont en corrélation avec les premiers dosages effectués. Il est donc possible de détecter les anticorps anti-Ang II en utilisant le peptide conjugué par l'une ou l'autre de ses terminaisons. Il a été démontré que l'Ang II possédait au moins 3 épitopes distincts (Picard et al., 1986; Couraud, 1986), ce qui explique que des épitopes seraient disponibles pour former des complexes immuns peu importe que l'Ang II soit liée par l'une ou l'autre de ses terminaisons.

La présence des anticorps anti-Ang II a enfin aussi été confirmée par RIA en utilisant de faibles dilutions de chaque sérum. Bien que cette méthode soit considérée aussi sensible que l'ELISA (Steward et Lew, 1985), le RIA ne nous a pas permis de vérifier la présence d'anticorps spécifiques dans tous les séra positifs en ELISA. Une optimisation de la méthode suffirait probablement à augmenter la sensibilité de notre essai RIA. Pour ce faire, on pourrait tenter d'augmenter l'activité spécifique de l'hormone radioactive ou les périodes d'incubations, ou encore de diminuer le degré de liaison non spécifiques. Contrairement à l'ELISA, la méthode RIA que nous avons utilisée ne nous permet pas de distinguer entre les différents types d'immunoglobulines dosées (IgG ou IgM). Cette méthode semble inappropriée pour doser les IgM puisqu'elle s'est montrée incapable de révéler la présence de cette immunoglobuline dans des séra ayant un titre élevé en IgM évalué par ELISA. Le principe du test RIA que nous avons choisi repose sur la précipitation du peptide non conjugué à l'aide de charbon activé (enrobé de dextran), suite à la formation des complexes antigènes-anticorps (Haber et al., 1969). Une proportion des antigènes (peptides) liés aux anticorps est radioactive et peut donc être quantifié par comptage gamma. Il est possible que lors de l'étape de centrifugation du sérum, pour permettre la précipitation du charbon, les IgM aient également été précipités dû à leurs poids moléculaires et à leurs tailles plus élevées que les IgG. Des méthodes de dosages RIA différentes utilisant par exemple du polyéthylène glycol, ou des

protéines A ou G pour précipiter le complexe antigène-anticorps plutôt que l'antigène non conjugué, pourraient être utiles pour vérifier cette hypothèse (Kapp et Strayer, 1978).

#### 4.2 Anticorps anti-Sch

Tout comme pour l'Ang II, le deuxième peptide modèle que nous avons choisi, soit la séquence 115-131 de la protéine rSm-28 GST de *Schistosoma mansoni*, est également un peptide qui peut induire une réponse immunitaire complète (réponse humorale et à médiation cellulaire). Il possède les épitopes reconnus par les lymphocytes B et T notamment chez la souris BALB/c, l'espèce animale que nous avons choisie d'utilisée (Wolowczuk et al., 1989; Wolowczuk et al., 1990). Les anticorps produits contre ce peptide sont importants cliniquement puisqu'ils peuvent aider à combattre la croissance du parasite, un agent infectieux responsable d'une maladie répandue dans les régions tropicales et sub-tropicales (Capron et al., 1992).

L'antigène protéique P-28 (Wolowczuk et al., 1990) ou rSm-28 GST (Marguerite et al., 1992) induit une forte immunité protectrice lorsqu'injecté chez différents animaux (Balloul et al., 1987a; Balloul et al., 1987b). Le peptide 115-131 de cette protéine parvient aussi, lorsque conjugué à un porteur, à induire *in vitro* la prolifération des lymphocytes T de rats présensibilisés avec la protéine ou avec le parasite *S. mansoni*, ce qui fait de ce peptide un bon candidat pour la production d'un nouveau vaccin synthétique (Wolowczuk et al., 1990; Wolowczuk et al., 1991; Marguerite et al., 1992). Néanmoins, le peptide utilisé non couplé ne parvient pas à induire une réponse humorale ou à médiation cellulaire (Wolowczuk et al., 1990, Wolowczuk et al., 1991., Marguerite et al., 1992). Ces mêmes résultats ont aussi été obtenus dans nos expériences par l'injection du peptide non conjugué en présence d'adjuvant. Aucun anticorps de type IgG spécifique au peptide n'a pu être décelé dans les séra de souris injectées, alors qu'une souris sur quatre a développé des IgM anti-Sch. De même, l'immunisation des souris avec le peptide conjugué à l'ovalbumine a provoqué la production d'un taux élevé

d'anticorps spécifiques de types IgG et IgM. La présence d'une proportion considérable de cette dernière immunoglobuline contraste avec la faible tendance de l'Ang II conjuguée à induire la formation de ce type d'anticorps.

Les peptides d'un poids inférieur à 1 500 daltons adhèrent généralement peu au polystyrène, et peuvent difficilement être utilisés comme antigène en ELISA (Briand et al., 1985). Le peptide 115-131 (Sch) composé de 22 acides aminés et dont le poids moléculaire est d'environ 2 000 daltons, ne s'est également pas avéré efficace pour la détection d'anticorps dans nos essais ELISA. L'inefficacité de ce peptide non conjugué pour le dosage ELISA d'anticorps spécifiques a également déjà été noté précédemment (Marguerite et al., 1992).

## **5. La pieuvre peptidique ou MAPS**

Une autre méthode a été évaluée comme moyen de mettre en évidence la production d'anticorps anti-peptide, soit le système de polymérisation des peptides MAPS ou "Multiple Antigen Peptide System". Tel que décrit dans l'introduction, le MAPS consiste en plusieurs copies d'un même peptide liés par leur extrémité C-terminale à un réseau de lysine. Il a été démontré fréquemment que ce type de polymère accroît nettement la capacité immunogénique des peptides simples (Posnett et al., 1988; Tam, 1989; McLean et al., 1991; Wolowczuk et al., 1991; Baleux et Dubois, 1992; Marsden et al., 1992; Marguerite et al., 1992) et ce à un niveau parfois même supérieur aux conjugués peptides-protéines (McLean et al., 1991; Marsden et al., 1992). Les MAPS ont aussi pour avantage que la grande majorité des anticorps produits sont dirigés contre l'antigène peptidique étant donné l'absence d'un porteur et la faible proportion du réseau de lysines par rapport au poids total de l'antigène (Posnett et al., 1988).

En général l'octamère peptidique constitué de 7 lysines et de 8 copies du peptide est le plus utilisé et le plus efficace (Tam, 1989;

Tam et Zavala, 1989; Marguerite et al., 1992), mais les MAPS composés de 2, 4 ou 16 copies du peptide produisent également des résultats satisfaisants (Tam, 1989; Tam et Zavala, 1989; Marguerite et al., 1992).

### **5.1 Anticorps anti-angiotensine II**

Dans cette étude nous avons d'abord évalué l'efficacité d'un tétramère constitué de 4 copies d'Ang II pour produire des anticorps. Aucune immunoglobuline de type G ou M n'a été produite contre le peptide avec le MAPS. Le tétramère d'Ang II a même été le seul antigène incapable d'induire une réponse anticorps contre ce peptide. A notre connaissance aucune autre étude n'a jusqu'à présent utilisé l'Ang II pour évaluer l'efficacité du MAPS. Il a toutefois déjà été noté dans des études précédentes que d'autres peptides injectés sous forme multimère se soient également avérés peu efficaces pour la production d'anticorps (Posnett et al., 1988; Briand et al., 1992).

### **5.2 Anticorps anti-Sch**

Le MAPS a été aussi testée avec le peptide 115-131 du Schistosome. Une réponse relativement faible en IgM a été obtenue avec le tétramère de Sch, et ce dernier est parvenu à induire la production d'IgG spécifiques chez une seule des souris immunisées. Il a pourtant été récemment montré que ce même peptide polymérisé sous forme d'octamère ou de dimère parvient à induire la production d'anticorps spécifiques chez le singe, le rat Fischer, et chez la souris BALB/c (Wolowczuk et al., 1991; Marguerite et al., 1992). Trois injections du dimère par rapport à 2 pour l'octamère ont été nécessaires pour obtenir une bonne production d'anticorps chez le rat Fischer (Marguerite et al., 1992). Dans notre cas, très peu d'anticorps ont été produits chez la souris BALB/c malgré 6 injections du tétramère de Sch.

### 5.3 Utilisation du MAPS pour la détection d'anticorps spécifiques

Les MAPS seraient également, semble-t-il, d'une grande utilité pour la détection d'anticorps spécifiques par la méthode ELISA. Une grande variété de peptides a été utilisée à cet effet dont le peptide 115-131 du Schistosome (Marguerite et al., 1992), des copies subséquentes de courts peptides de 4 à 8 acides aminés faisant partie des épitopes de *Plasmodium malariae* (Tam et Zavala, 1989; Tam, 1989; Habbuetzl et al., 1991), et plusieurs autres peptides d'une taille de 12 à 17 acides aminés (Marsden et al., 1992). Des améliorations de sensibilité de 100 fois (Tam, 1989) et même de 10 000 fois (Marsden et al., 1992) ont été obtenues en utilisant le MAPS plutôt que le peptide non conjugué pour la détection d'anticorps spécifiques. Il existe diverses théories expliquant l'efficacité du MAPS pour cette fonction, mais en général on pense que le MAPS améliore la disponibilité des peptides pour l'anticorps en adhérant à la surface de plastique par seulement quelques unes des copies du peptide, tandis que les autres restent accessibles aux anticorps (Tam et Zavala, 1989; Marguerite et al., 1992; Marsden et al., 1992). Dans le cas de peptides simples non conjugués, l'adhérence au plastique peut cacher certains déterminants antigéniques, ou encore faire adopter au peptide une conformation non reconnue par les anticorps (Tam et Zavala, 1989; Marguerite et al., 1992). Le dimère du peptide Sch a également été montré capable d'améliorer la sensibilité de détection des anticorps spécifiques (Marguerite et al., 1992).

En utilisant des conditions identiques aux études précédemment rapportées (i.e. type de plaque, tampon de liaison, temps et température de liaison, etc.), nous ne sommes pas parvenu à répéter ces résultats avec le tétramère du peptide Sch, ce dernier n'étant pas reconnu par les anticorps anti-Sch, même dans les séras les plus positifs avec Sch-KLH (utilisé pour la détection).

L'inefficacité du tétramère du peptide 115-131 du Schistosome tant pour la production que pour la mise en évidence

d'anticorps spécifiques demeure en partie difficile à expliquer dans notre étude. Les résultats obtenus ne peuvent être imputables à la méthode d'immunisation (préparation de l'émulsion, voie d'injection, etc.), puisque les peptides conjugués aux protéines se sont avérés efficaces. Il est peu probable que le fait d'avoir utilisé quatre copies des peptides plutôt que 2 ou 8 (Marguerite et al., 1992) soit responsable de l'inefficacité du composé. On pourrait alors supposer que l'une des étapes de production du peptide (i.e. : au niveau de la synthèse ou de la purification) en serait la cause. Suite à la purification du peptide, l'analyse HPLC a montré un niveau de pureté supérieur à 90% (tableau V). Ce niveau serait suffisant pour produire des anticorps spécifiques selon Van Regenmortel et coll. (1988) qui recommandent une purification supérieure à 80%. L'analyse en acides aminés du composé a par ailleurs permis de confirmer la présence de chacun des acides aminés du peptide (tableau VI). Seul le séquençage permettrait toutefois de vérifier l'ordre respectif de chacun de ces acides aminés. La compétition par ELISA montre néanmoins que des anticorps spécifiques aux Sch produits à l'aide de la Sch-ovalbumine reconnaissent peu le tétramère de Sch.

Une analyse tardive par spectrophotométrie de masse du produit final (TOF-MS, Klaus Klankov, Belgique) a finalement permis de confirmer la présence de nombreux composés de masses moléculaires variés dans notre échantillon du tétramère de Sch (annexe 16), ainsi que dans un octamère d'Ang II synthétisé à la suite de cette étude (annexe 17).

Ces dernières données nous suggèrent que la structure des peptides synthétisés sous forme de MAPS est inadéquate dans cette étude. La difficulté d'obtenir des composés pure ayant une structure uniforme avec la méthode du MAPS nous a également été rapporté par le groupe du Dr A. Tartar (Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur de Lille, France). Des modifications dans la méthode de synthèse de ces composés seront donc nécessaire pour une utilisation future appropriée de cette nouvelle façon de produire des anticorps anti-peptides.

## **6. Propriété immunogéniques des peptides à longues chaînes aliphatiques**

Un certain nombre d'études a permis d'établir au cours des années 1970, que l'addition d'acides gras à des protéines pouvait influencer leurs propriétés immunogéniques (Coon et Hunter, 1973; Heatley et Stark, 1975; Dailey et Hunter, 1977; Singh et Leskowitz, 1978; Stark et al., 1980a et b). Avec l'avènement des vaccins synthétiques, la conjugaison d'acides gras à des peptides synthétiques a été étudiée (Hopp, 1984; Jacob et al., 1985). Les résultats obtenus ont été encourageants, les chaînes aliphatiques étant en mesure d'augmenter la production d'anticorps anti-peptides. L'utilisation d'une telle stratégie pourrait être avantageuse à plusieurs niveaux pour la conception de nouveaux vaccins, ou pour la production d'anticorps anti-peptides au laboratoire. Elle pourrait servir de méthode alternative aux méthodes couramment utilisées qui sont associées à divers inconvénients. Les acides gras sont non toxiques, sont d'une composition chimique bien définie et n'induisent pas à priori la formation d'anticorps (Hopp, 1984). L'étude de Hopp (1984) suggère l'utilisation d'une telle méthode, toutefois les possibilités associées à l'ajout de chaînes aliphatiques sur différents acides aminés d'un peptide synthétique restait à étudier. Nous avons adapté la synthèse des acides aminés pseudo-lipidiques (avec chaînes aliphatiques) de façon à pouvoir les incorporer à la synthèse peptidique en phase solide. Nous avons ainsi été en mesure de vérifier l'efficacité immunogénique de peptides comportant des "adjuvants intrinsèques". Cette méthode avait entre autre pour particularité la possibilité de pouvoir positionnés ces acides aminés pseudo-lipidiques à n'importe quel niveau à l'intérieur des peptides.

### **6.1 Synthèses des acides aminés pseudo-lipidiques**

Deux chaînes aliphatiques saturées, l'une de 14 carbones et l'autre de 18 carbones, ont été ajoutées à trois acides aminés différents soit la tyrosine, la glycine et la L-dopa ou la dihydroxy-phénylalanine, que nous avons ensuite incorporées dans deux

peptides modèles, l'Ang II et le peptide 115-131 de la protéine rSm-28 GST de *Schistosoma mansoni*. Une ou deux chaînes aliphatiques ont été ajoutées aux acides aminés, soit une chaîne sur la tyrosine et la glycine et deux sur la L-dopa, et jusqu'à trois chaînes ont été ajoutées sur le peptide [Sar<sup>1</sup>,Tdg<sup>8,9,10</sup>,Gly<sup>11</sup>]Ang II. En général les peptides modèles ont été choisis pour leurs caractères immunogéniques bien connues, et parce qu'ils possédaient des épitopes reconnus par les lymphocytes B et T.

La synthèse des acides aminés pseudo-lipidiques comporte plusieurs étapes de synthèses et de purifications qui peuvent parfois s'avérer ardues. La préparation des acides aminés avec chaînes aliphatiques ne peut toutefois être considérée comme une étape limitante à la production des peptides, car ces acides aminés peuvent être synthétisés en très grande quantités.

## **6.2 Incorporation d'acides aminés pseudo-lipidiques dans des peptides synthétiques**

Suite à la synthèse des peptides, les étapes de purification de ces derniers ont apporté leur part de difficulté. On peut constater par analyse HPLC, que le peptide Sch auquel a été ajouté la bis-O<sub>1</sub> O-octadécyl-dopa constitue un mélange complexe (graphique en annexe 5). Plusieurs difficultés, non détaillées dans la section des méthodes, ont été rencontrées lors de la purification des peptides avec longues chaînes aliphatiques. Le caractère hydrophobe de ces peptides diminue leur solubilité dans tous les solvants aqueux, et ils ont tendance à adsorber de façon non spécifique aux gels de chromatographie. Cette situation peut mener à la perte de quantités importantes du peptide dû aux nombreuses étapes de purification, à une perte de temps considérable, et à l'utilisation d'un peptide qui n'est pas suffisamment homogène pour la production d'anticorps. Ces facteurs peuvent être des inconvénients à considérer pour établir l'utilité des peptides à longues chaînes aliphatiques pour la production d'anticorps anti-peptides.

Les peptides avec acides aminés pseudo-lipidiques ont été injectés avec des adjuvants de Freund pour vérifier en premier lieu si les chaînes aliphatiques pouvaient remplacer l'effet des porteurs protéiques sur la production d'anticorps. Si tel avait été le cas, une nouvelle série d'injections en absence d'adjuvant aurait été effectuée pour déterminer si les conjugués pouvaient vraiment jouer le rôle d'adjuvant intrinsèque.

Nous avons étudié l'effet des acides aminés pseudo-lipidiques sur l'induction de la réponse humorale. La réponse à médiation cellulaire (effet sur la prolifération des lymphocytes T) aurait aussi été importante à étudier si les résultats avaient été positifs dans le premier cas.

Contrairement aux résultats rapportés précédemment (Hopp, 1984; Jacob et al., 1985), l'ajout de longues chaînes aliphatiques à des peptides a été peu efficace dans notre étude pour augmenter la réponse immunitaire humorale envers ces peptides. Seul le peptide Sch auquel avait été ajouté deux tétradécylglycine est à induit une augmentation significative d'IgG spécifique par rapport au peptide non conjugué, mais seulement deux souris sur six ont répondu positivement à l'injection de cet antigène. Certaines conditions méthodologiques pourraient être responsables de la faible efficacité de nos composés. On pourrait supposer que le peptide [Bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-Dopa<sup>1 8</sup>,Gly<sup>1 9</sup>]Sch est insuffisamment homogène pour induire une bonne production d'anticorps (tableau V), mais la présence d'un faible pourcentage de peptide pur devrait néanmoins suffire pour une bonne production d'anticorps spécifiques, car ce peptide possède tout de même de nombreux épitopes (Marguerite et al., 1992). Par ailleurs, le peptide [Tdg<sup>1 8</sup>,Tdg<sup>1 9</sup>,Gly<sup>2 0</sup>]Sch qui possède un niveau de pureté similaire aux peptides non conjugués (tableau V) et qui est très bien reconnu par les anticorps anti-Sch (figure 22), ne parvient pourtant pas non plus à induire une bonne production d'anticorps. Un taux relativement élevé de cet antigène a été injecté aux souris (83 µg = 30 nmoles de peptides) par rapport au conjugué peptides-protéines (83 µg = 1 nmole de peptides).

Ces mêmes résultats ont aussi été obtenus en ajoutant des acides aminés pseudo-lipidiques à l'Ang II. Bien que ce peptide soit reconnu comme peu immunogène, il est relativement facile de produire des anticorps contre l'Ang II lorsque celui-ci est conjugué à un porteur protéique (Goodfriend et al., 1964; Vallotton, 1970; Abruzzini et Thomas, 1983; Nussberger et al., 1984; Picard et al., 1986; Hermann et al., 1986; Couraud, 1986). Étant donné que la phénylalanine en position 8 du peptide est un acide aminé très important dans le caractère immunogène de l'Ang II (Vallotton, 1970; Abruzzini et Thomas, 1983; Nussberger et al., 1983; Couraud, 1986), il est possible que le fait d'avoir remplacé cet acide aminé par nos acides aminés pseudo-lipidiques soit responsable de la non production d'anticorps anti-Ang II. Dans au moins un des cas cependant, la phénylalanine n'a pas été vraiment remplacée par un autre acide aminé, mais a plutôt été modifiée par l'ajout de deux groupements alkyles éthers.

Les théories expliquant le mode d'action de l'induction de la réponse immune par l'addition de chaînes aliphatiques aux antigènes sont nombreuses. Il a été noté par exemple que les acides gras favorisaient une relocalisation systémique de l'antigène protéique (Coon et Hunter, 1973; Dailey et Hunter, 1977; Stark et al., 1980a), permettaient d'augmenter la demi-vie métabolique de l'antigène (Heatley et Stark, 1975; Singh et Leskowitz, 1978; Stark et al., 1980a), favorisaient l'attachement de l'antigène aux membranes des cellules immunocompétentes (i.e. APC, lymphocytes B et T) (Dailey et Hunter, 1977; Singh et Leskowitz, 1978; Stark et al., 1980a), et surtout dans le cas de longues chaînes aliphatiques ajoutés aux peptides, Hopp a suggéré que la formation d'agrégats et de micelles, due à l'insolubilité des conjugués, était probablement la cause de leurs potentiels immunogènes (Hopp, 1984).

Nous avons également remarqué la faible solubilité des peptides comportant des acides aminés pseudo-lipidiques, qui a d'ailleurs contribué aux difficultés de purification de ces peptides. Cette faible solubilité en milieu aqueux, nous a parfois forcé à dissoudre l'antigène dans l'adjuvant (huile) plutôt que dans le tampon

phosphate, pour permettre une distribution plus homogène de l'antigène dans le liquide d'immunisation. Le peptide à longues chaînes aliphatiques étant plus soluble dans l'huile, cette procédure de préparation de l'antigène pourrait alors avoir été néfaste à l'effet immunogène des conjugués, puisqu'elle empêche probablement la formation d'agrégats.

Une étude réalisée par Råde et coll. (1971) permet toutefois de remettre en question le rôle des agrégats dans l'effet immunogène des chaînes aliphatiques. Cette étude, une des premières réalisée sur le sujet, avait démontré que l'incorporation de glycolipides sur un peptide polymérisé (à l'aide de poly-L-lysine) permettait d'augmenter la production d'anticorps de ce peptide. La formation d'agrégats, provoquée par la présence d'une partie lipophile dans l'antigène, avaient également été notée. Toutefois, ils ont aussi observé une absence de production d'anticorps lorsque les chaînes aliphatiques étaient directement liées aux peptides plutôt qu'à la partie glucidique de l'antigène, et ce malgré la formation d'agrégats.

Dans une autre étude, Dailey et Hunter ont aussi clairement démontré que la formation d'agrégats n'était pas un des mécanismes responsables de l'augmentation de la réponse immunitaire avec la BSA acylée (Dailey et Hunter, 1977). A la lumière de ces études, on peut donc difficilement supposer que la non formation d'agrégats soit responsable de l'inefficacité de nos peptides avec acides aminés pseudo-lipidiques.

Dans les études traitant de l'effet des acides gras sur la capacité immunogéniques des protéines, il a été fréquemment mentionné qu'une trop grande densité d'acides gras sur la protéine pouvait provoquer une diminution de la production d'anticorps, dû à un masquage des déterminants antigéniques (Coon et Hunter, 1973; Heatley et Stark, 1975; Stark et al., 1980a; Stark et al., 1980b). Il est peu probable qu'un tel effet soit provoqué par les chaînes aliphatiques dans nos peptides, car dans plusieurs cas, une seule chaîne a été ajoutée aux peptides. D'autre part, il a aussi été mentionné qu'un taux trop faible d'acide gras par antigène pouvait diminuer l'efficacité des conjugués (Stark et al., 1980a). Hopp

(1984) et Jacob et coll. (1985) sont néanmoins parvenus à induire une réponse immunitaire satisfaisante contre les peptides en ajoutant seulement deux chaînes d'acide gras par peptide.

Les acides aminés pseudo-lipidiques ne sont pas parvenu dans cette étude à induire la production d'anticorps anti-peptides. Ces résultats suggèrent que dans certaines circonstances, la conjugaison à de longues chaînes aliphatiques pourrait s'avérer inefficace pour produire des anticorps contre des peptides. Ces circonstances demeurent pour l'instant inconnues. La voie d'injection, l'espèce animale injectée, le choix des peptides utilisés, la méthode de préparation de l'antigène pourraient être différents facteurs ayant affecté la réponse immunitaire. D'autres études seront nécessaires pour déterminer si dans certaines conditions l'ajout d'acides aminés pseudo-lipidiques à des antigènes peptidiques peut favoriser la production d'anticorps anti-peptides. Toutefois, étant donné les difficultés reliées à la purification des peptides à longues chaînes aliphatiques, et étant donné la faible efficacité de ces peptides dans notre étude, on peut conclure pour l'instant que l'utilisation d'acides aminés pseudo-lipidiques ne peut être suggérée comme étant une voie appropriée et prioritaire pour le développement de nouveaux vaccins synthétiques.

## **7. Méthodes prometteuses pour les vaccins synthétiques**

Les études qui montrent que les adjuvants (complet et incomplet) de Freund demeurent parmi les meilleurs immunostimulateurs sont encore nombreuses (Johnston et al., 1991; Deeb et al., 1992; East, 1992). Plusieurs alternatives efficaces ont toutefois été récemment développées et sont régulièrement mises à l'essai. Outre les méthodes que j'ai déjà présentées, quelques unes d'entre elles doivent aussi être mentionnées.

Dans le même ordre d'idée que la conjugaison à des chaînes aliphatiques, certains chercheurs ont testé les effets de la conjugaison des peptides à des polysaccharides (Arnon et al., 1983;

Okawa et al., 1992; Rde et al., 1992). L'efficacité immunogénique de ces conjugués semble toutefois surtout reliée aux effets mitogènes naturels de certains de ces composés (par exemple : polysaccharide extrait de paroi cellulaire bactérienne) (Arnon et al., 1983; Okawa et al., 1992).

Une des procédures les plus prometteuses est l'injection de cytokines comme adjuvant d'immunisation. Ces substances synthétisées par les cellules sont les régulateurs naturels de la réponse immunitaire (Partidos et al., 1992). L'interleukine-4 (IL-4) et l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) peuvent par exemple, lorsqu'injectés, contrôler la production ou la suppression de l'immunité à médiation cellulaire, ainsi que la production des différents isotypes d'IgG (Gustafson et Rhodes, 1992). Il a aussi été montré que l'injection d'un fragment d'IL-1 permet d'avoir l'effet adjuvant de cette cytokine sans en avoir les effets toxiques (Tagliabue et al., 1992).

Un produit conçu expressément pour remplacer les adjuvants de Freund, possède semble-t-il, toutes les caractéristiques désirées pour être une alternative valable à ces adjuvants. Le TiterMax mis en marché par la compagnie Cyt-Rx Corporation a été mis au point par le Dr R.L. Hunter, qui est l'un des chercheurs à avoir tudi l'effet stimulateur de la conjugaison des acides gras à des protéines (Coon et Hunter, 1973; Dailey et Hunter 1977).

Le TiterMax consiste en une émulsion eau dans l'huile (tel le FCA) stabilisée par des microparticules de silice sur lesquelles ont été liés des copolymères non ioniques. Ces derniers, faits d'un mélange de polyoxypropylène et polyoxyéthylène, de nature respectivement hydrophobe et hydrophile, servent à bien retenir les antigènes pour leurs présentations au système immunitaire (Bennett et al., 1992).

Les résultats obtenus avec ce nouvel adjuvant sont fort intéressants car en plus d'être dépourvus d'effets toxiques, il semblerait que le TiterMax soit le premier adjuvant à avoir vraiment un effet immunostimulateur similaire ou supérieur au FCA sur l'induction de la réponse humorale (Hunter et al., 1991; Bennett et

al., 1992). De plus, une seule injection du produit serait souvent suffisante pour obtenir une bonne production d'anticorps pendant une période prolongée. A l'exception du groupe de Hunter, peu d'études ont jusqu'à présent rapporté l'efficacité de l'utilisation du TiterMax, mais ce produit pourrait devenir très populaire dans un avenir rapproché, étant donné les effets secondaires provoqués par le FCA.

Le SAF-1 (Synthex Adjuvant Formulation) est un adjuvant dont la composition est similaire au TiterMax et auquel a été ajouté du muramyl dipeptide (MDP). Il a été développé par la compagnie Synthex Research (Allison et Byars, 1986; Allison et Byars, 1992; Claasen et Boersma, 1992). Le MDP aurait été ajouté pour induire la production de cytokines (Cleason et Boersma, 1992). Ces substances sont présentement testées pour leurs applications médicales (Verheul et Snippe, 1992).

## **II- Liaison covalente des peptides aux plaques ELISA**

Une des premières difficultés rencontrées lors de mes travaux a été de mettre au point un essai ELISA sensible et efficace pour doser des anticorps spécifiques à de petits peptides tel que l'Ang II. Les méthodes de dosages ELISA conventionnelles sont basées sur l'adhérence de l'antigène sur une surface de plastique. Les forces d'attractions typiques permettant l'adsorption de l'antigène sont de nature relativement faibles tels que la formation de paires d'ions ou les interactions de types hydrophobes (Briand et al., 1985). Il a été démontré que les petits antigènes offrent moins de possibilités d'interactions, et se détachent plus aisément des surfaces de plastiques que les composés de poids moléculaire élevé (Rotmans et Delwel, 1983; Verschoor et Visser, 1990). Il est d'ailleurs reconnu que le problème le plus important affectant l'efficacité des essais ELISA est la faible capacité des petits antigènes d'adhérer solidement aux surfaces de plastiques (Engvall et Perlmann, 1972; Tam et Zavala, 1989; Van Regenmortel et al., 1988; Wisdom, 1992).

Suite aux essais infructueux réalisés avec le conjugué Ang II-décylamine, nous avons décidé de tenter de développer une méthode qui permettrait de lier de façon stable et permanente les antigènes de nature peptidique aux plaques ELISA.

Notre hypothèse était basée sur le fait qu'il est possible de lier certains composés sur des polymères tel que le polystyrène, en soumettant les deux matières en présence à des radiations ionisantes pour une périodes prolongées (Garnett, 1979). Nous avons donc d'abord tenté d'irradier le polystyrène avec un acide insaturé de façon à créer un lien entre l'acide et le polystyrène à partir du double lien de l'acide, de façon à rendre disponible des terminaisons carboxyliques à la surface des plaques pour pouvoir y coupler des peptides à l'aide d'agents de couplages (i.e. DCC/NHS).

Les résultats de ces expériences préliminaires nous ont permis de découvrir, que le fait d'irradier et d'activer les plaques au carbodiimide était suffisant pour assurer la liaison covalente du peptide. L'ajout d'un acide insaturé avant l'irradiation n'a pas eu d'effets supplémentaires sur cette liaison.

## **1. Effets des radiations**

La première étape de la méthode consistait à soumettre des plaques ELISA de PS à des radiations Gamma de haute énergie pour des périodes prolongées. Il a été démontré que l'irradiation du PS avec du cobalt 60 pouvait permettre d'incorporer des composés aromatiques dans la matière plastique (Varga et Fritsch, 1990); pouvait augmenter l'adsorption de divers antigènes au PS (Zieglmaier, 1988); pouvait induire la formation de nouvelles fonctions chimiques et des sites actifs (radicaux libres) sur ces polymères (Garnett, 1979; Varga et Fritsch, 1990; Varga et al., 1990); et pouvait permettre de lier divers composés aux polystyrènes (Garnett, 1979; Larsson et al., 1987). L'irradiation des plaques ELISA en PS avec de la lumière ultra-violet a également été utilisée pour augmenter la liaison des antigènes peptidiques (Boudet

et al., 1991). L'effet des radiations sur l'augmentation de liaison des antigènes au PS est donc déjà bien documenté.

Dans notre étude, l'irradiation Gamma du PS ne s'est montré que partiellement efficace. La liaison totale de la <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II est presque doublée dans les plaques Dynatech suite à l'irradiation, mais cette liaison est de nature non covalente car les lavages aux détergents parviennent à enlever la majorité du peptide lié sur la plaque (figures 24 et 25).

Nous avons établi qu'une dose cumulative de 3.5 Mrad constitue la dose optimale de radiation permettant d'augmenter la liaison totale de l'antigène (figure 26). Ce chiffre correspond aux résultats rapportés précédemment (Zigelmaier, 1988; Varga et Fritsch, 1990). L'irradiation des plaques pour des périodes plus longues provoque une diminution de la qualité optique du plastique et parfois aussi une diminution de la capacité totale de liaison du peptide. Ces observations ont également été faites par Larsson et coll. (1987), et par Varga et coll. (1990).

Suite à l'irradiation des plaques de polystyrènes, l'augmentation de liaison du peptide est maintenue sur de très longues périodes de temps, ce qui démontre que les nouveaux groupements formés à la surface du plastique sont très stables (Garnett, 1979; Varga et Fritsch, 1990; Varga et coll., 1990).

En 1990 Varga et coll. ont réalisé une étude exhaustive sur les possibilités d'incorporation et de liaison de substances de faibles poids moléculaires sur du PS à l'aide d'irradiation  $\gamma$  (Varga et Fritsch, 1990; Varga et al., 1990). Ils ont d'abord déterminé que l'irradiation permettait surtout d'incorporer des composés aromatiques dans le PS (Varga et Fritsch, 1990). Pour ce faire, le PS doit toutefois être irradié en présence des composés. Cette méthode pourrait être risquée pour des applications dans des dosages ELISA, car les radiations peuvent provoquer une destruction partielle ou des modifications dans la structure de l'antigène qui est ainsi attaché aux plaques.

Dans les même études, Varga et coll. (1992) ont aussi noté que lorsque les plaques sont irradiées en présence d'eau, il y a création de groupements nucléophiles actifs sur le PS, qui sont suffisants pour ensuite y lier des acides aminés à l'aide d'un agent de couplage. Toujours selon cette étude, les plaques irradiées en présence d'air seulement peuvent également être efficaces, en autant que l'irradiation a lieu dans un atmosphère ayant un taux d'humidité approprié. Aucune liaison covalente n'a put être obtenue avec des plaques de PS non irradiées (Varga et al., 1992). Ces résultats diffèrent des nôtres, où un taux élevé de liaison covalente à été obtenu avec du PS non irradié. On peut donc suggérer que la pré-incorporation d'eau par irradiation n'est possiblement pas nécessaire pour tout les PS pour permettre par la suite une liaison covalente. Néanmoins, il aurait pu être intéressant de vérifier si l'irradiation en présence d'eau, permet d'augmenter davantage la liaison du peptide dans notre méthode, mais les travaux de Varga et al. (1992) furent publié après la conclusion de notre propre étude.

## **2. Effet de l'activation avec DCC/NHS**

L'activation chimique des plaques avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en combinaison avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) constitue l'étape principale pour augmenter la liaison covalente des peptides au PS. Ces réactifs permettent la formation d'esters actifs qui réagissent avec des fonctions carboxyliques libres (Goodfriend et al., 1964; Van Regenmortel et al., 1988). Puisqu'il a été possible de lier des peptides de façon covalente au PS à l'aide de ces substances, on peut donc supposer que des carboxylates sont déjà présent à la surface du polymère. Les fonctions carboxyliques peuvent avoir été formées lors de la fabrication du plastique, et/ou peuvent aussi avoir été induites par les radiations  $\gamma$ . Selon nos résultats, ces deux possibilités sont plausibles, car un taux élevé de peptide peut être lié de façon covalente sur le polystyrène non irradié, et une augmentation de liaison est aussi obtenue lorsque les plaques Dynatech sont préirradiées avant d'être traitées chimiquement (DCC

/NHS). L'irradiation à long terme est probablement responsable de la formation de radicaux libres (Garnett,1979), qui une fois oxydés en présence d'air et d'humidité, sont ensuite hydrolysés en carboxylates. Ces derniers peuvent ensuite être activés pour y lier des peptides par leurs fonctions amines.

Dans le cas des plaques Maxisorp (figure 25), le fait de préirradier le PS n'induit pas d'augmentation supplémentaire de la liaison covalente, ce qui laisse supposer qu'un niveau élevé de fonctions carboxyliques est déjà disponibles à la surface de la plaque. Des différences importantes dans les caractéristiques de liaison des plaques provenant de diverses compagnies ont également été noté dans une étude de Larsson et al., (1987).

L'hypothèse selon laquelle le peptide serait lié de façon covalente par la formation d'un lien amide est supporté par la liaison comparative de deux analogues de l'Ang II. L'un des analogue possède un amine secondaire ([Sar<sup>1</sup>]Ang II), tandis que l'autre possède un amine primaire et un amine secondaire ([Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II). Le fait que ce dernier peptide se lie d'une façon significativement plus élevée, nous suggère que le mécanisme de liaison proposé est probablement celui qui est le plus approprié, car les amines primaires réagissent plus rapidement avec les fonctions esters actives que les amines secondaires.

Larsson et coll. (1987) ont rapporté la liaison covalente de peptides en ajoutant d'abord au PS un acide insaturé, tel que nous l'avions d'abord entrepris. Cette approche ne nous a pas permis d'augmenter le degré de liaison du peptide. Des différences dans les méthodes utilisées pourraient expliquer la divergence des résultats obtenus (par exemple l'irradiation est faite en absence d'oxygène dans la méthode de Larsson), toutefois il n'a pas été clairement démontré dans cette dernière étude que l'augmentation de liaison était bien due à la présence de l'acide, et non à l'activation chimique du PS.

La simplicité de la méthode que nous avons utilisée demeure l'une de ses principales caractéristiques. Les procédures de liaison covalente utilisées précédemment nécessitaient souvent des modifications chimiques importantes et ardues de la surface de PS (Reimer et al., 1978; Phillips et al., 1980; Rotmans et Delwel, 1983), ou l'utilisation d'une surface déjà prémodifiée par la compagnie de fabrication, et donc plus chère à l'achat (Sondergard-Anderson et al., 1990; Gibbs et al., 1992). Dans ce dernier cas des fonctions carboxyliques ou amines sont déjà préajoutées par la compagnie, ce qui permet de conjuguer le peptide par l'une ou l'autre de ces extrémités.

### **3. Sites de liaison disponibles sur la plaque**

L'addition de concentrations croissantes d'Ang II, nous a permis de déterminer que les sites de liaison disponibles pour le peptide sur le PS sont saturables (figure 27). Cependant en augmentant la concentration de l'agent de couplage, on parvient aussi à augmenter le taux de liaison du peptide. Il faut donc en déduire que la liaison n'est pas limitée par le nombre de sites disponibles sur la plaques, mais plutôt par l'agent de couplage. Ce dernier utilisé à une concentration plus élevée devient toutefois dommageable pour le PS et diminue sa transparence.

Des essais ont été faits pour tenter de remplacer le DCC par un agent de couplage plus approprié, mais malheureusement les substances qui ont été testées (BOP, Diisopropylcarbodiimide, EDC) se sont avérées moins efficaces que le DCC (résultats non montrés).

### **4. Effet du pH**

Le pH du milieu d'incubation est un autre facteur dont les effets ont été vérifiés sur la capacité de liaison covalente de l'antigène peptidique. Cette étude nous a permis de constater qu'outre le fait d'accentuer la liaison du peptide, l'irradiation des plaques permet aussi de diminuer l'effet du pH sur la liaison. Un niveau stable et élevé de liaison est obtenu à divers pH si les

plaques sont préirradiées, tandis que lorsque les plaques sont seulement activées chimiquement et non irradiées, le pH joue un rôle plus important sur la liaison. Dans ce dernier cas, un effet optimal est obtenu à pH 6. Cette différence de résultats entre les plaques irradiées et non irradiées peut indiquer que la liaison sur ces plaques passe probablement par des mécanismes différents, ou du moins que pour les plaques irradiées, une partie de la liaison covalente est obtenue par un mécanisme indépendant du pH du milieu aqueux.

## **5. Utilisation de la méthode de liaison covalente pour les essais ELISA**

Les essais ELISA effectués avec les peptides CGRPs permettent de démontrer plus concrètement certains avantages de notre méthode de liaison covalente. Nous avons d'abord été en mesure de vérifier que la reconnaissance antigène-anticorps n'est pas altérée par le couplage covalent de l'antigène, et que cette reconnaissance est hautement spécifique tel que démontré par les tests de compétitions (figure 34). La liaison covalente permet par ailleurs d'augmenter significativement la sensibilité de reconnaissance des petits antigènes peptidiques par les anticorps. La difficulté de doser ces anticorps dans les ELISA conventionnels n'est donc pas provoquée par la non reconnaissance des petits peptides, mais bien par leurs faibles adsorptions aux surfaces de plastiques.

Les avantages d'utilisation des petits peptides pour la détection d'anticorps spécifiques sont indéniables. Les peptides de plus grandes tailles possèdent une structure antigénique plus complexe et un plus grand nombre d'épitopes. Ils vont donc lier un éventail d'anticorps plus vaste, dont plusieurs ne sont pas nécessairement désirés. Les chances d'obtenir des faux-positifs sont alors augmentées. L'utilisation d'un antigène de détection composé d'un seul épitope permet d'éviter ce problème.

## **5.1 Réutilisation des plaques**

Les résultats obtenus suite aux nombreux lavages des plaques ELISA avec un détergent, permettent de confirmer qu'il est possible de conserver et de réutiliser les plaques sur lesquelles les antigènes ont été lié de façon covalente. Un avantage similaire avait aussi été noté avec la méthode de Geysen et al., (1984), où les peptides sont synthétisés directement sur la surface du polystyrène. Nous avons été en mesure de conserver à la température de la pièce, et pendant plusieurs mois, des plaques préutilisées et lavées sans affecter leur efficacité.

## **5.2 Utilisation de la méthode de liaison covalente pour le dosage d'anticorps sériques**

Les essais effectués avec le CGRP ont permis de démontrer les possibilités de reconnaissance de peptides liés de façon covalente par des anticorps purifiés. Nous avons également vérifié la spécificité et la sensibilité de notre méthode pour le dosage d'anticorps sériques.

### **5.2.1 Anticorps anti-toxoplasmose**

Les essais ELISA réalisés avec des anticorps de souris produits contre un épitope de la toxoplasmose démontrent les variations qui peuvent exister entre les taux de liaison covalente obtenus avec différents peptides. Notre méthode de liaison permet d'augmenter considérablement la sensibilité de détection des anticorps anti-toxoplasmose, mais contrairement aux peptides CGRP, les plaques lavées et réutilisées sont moins efficaces. L'augmentation de la liaison totale du peptide de la toxoplasmose est donc responsable de l'augmentation de sensibilité de l'essai. La structure du peptide de la toxoplasmose est cependant moins favorable que celles des CGRPs à la formation de lien covalent par les terminaisons amines, car il ne comporte qu'une seul amine terminale par rapport à plusieurs terminaisons carboxyliques

disponibles. La présence de plusieurs résidus arginine dans le peptide de la toxoplasmose peut de plus expliquer la forte interaction non-covalente obtenue avec le PS. Un peptide à charge élevé peut adhérer plus aisément au plastique dont les charges en surface ont été augmentées par les pré-traitements (irradiation + DCC/NHS).

Il serait important de vérifier dans des essais futurs le nombre de fonctions aminées des peptides que l'on désire coupler, ainsi que leurs charges totales, de façon à pouvoir déterminer s'il est avantageux d'utiliser la méthode de liaison covalente pour conserver et réutiliser les plaques sur lesquelles les peptides ont été liés.

### **5.3 Anticorps anti-angiotensine II**

La méthode de liaison covalente des peptides aux plaques ELISA de polystyrène avait d'abord été développée dans le but de parvenir à réaliser des essais ELISA en utilisant l'Ang II, sans avoir à conjuguer d'abord ce peptide à une protéine porteuse. Il a été démontré que notre méthode de liaison covalente permettait d'augmenter considérablement la liaison de l'Ang II sur des plaques ELISA, toutefois cette technique s'est avérée insuffisante pour permettre la reconnaissance de ce peptide par des anticorps sériques. La quantité de peptide pouvant être liée aux plaques par la liaison covalente surpasse pourtant celle obtenue avec le conjugué Ang II-KLH utilisé avec succès pour la détection d'anticorps anti-Ang II. Dans ce dernier cas, si on considère qu'un taux maximal de 108 mole d'Ang II a été conjugué à chaque mole de KLH, on peut calculer qu'environ 0.1 nmole d'Ang II/puits a été suffisante pour détecter les anticorps. Comparativement, il a été déterminé qu'environ 0.2 µg soit 0.2 nmole d'Ang II pouvait être lié de façon covalente à chaque puits.

La non-reconnaissance de l'Ang II lié directement au polystyrène peut être dû à la non accessibilité des régions antigéniques du peptide, ou au fait que le peptide lié par l'une de ses extrémité peut adopter des conformations non reconnues par les

anticorps (Van Regenmortel et al., 1988; Tam et al., 1989; Marguerite et al., 1992). Pour éviter ces situations, quelques acides aminés sont parfois ajoutés aux peptides qui sont liés directement à des surfaces solides, de façon à les espacer de leurs supports (Rotmans et Delwel, 1983; Sondergard-Andersen et al., 1990). Nous avons donc ajouté 3 acides aminés à l'extrémité C-terminale de l'Ang II, mais de nouveau le peptide n'a pas été reconnu. Les raisons de l'insuccès de la méthode demeure inconnues, et seuls des essais avec de nombreux peptides pourraient possiblement permettre de déterminer s'il s'agit d'un cas d'exception.

Un autre problème apparu lors des essais ELISA effectués avec l'Ang II lié de façon covalente a été le haut taux de liaison non spécifique des anticorps retrouvé avec certains séra hyperimmuns. Cette non spécificité a pu être démontrée par

- 1) la liaison des anticorps à des peptides autres que l'Ang II
- 2) l'obtention d'un taux élevé de liaison des anticorps avec des séra de souris non immunisées avec l'Ang II
- 3) l'incapacité d'inhiber la liaison des anticorps avec une concentration élevée d'Ang II ajoutée au sérum
- 4) les différences de résultats obtenues en utilisant l'Ang II-KLH pour la détection d'anticorps spécifiques par rapport à l'Ang II lié de façon covalente.

Contrairement aux essais effectués avec l'Ang II-décylamine, il est important de noter que dans ce cas-ci, la liaison non spécifique n'a pas lieu sur la surface du PS, mais bien sur le peptide qui est lié au PS. En absence de peptide ou avec certains peptides tels que l'AIP, l'AID, ou la substance K, on observe aucune liaison non spécifique, alors qu'avec l'Ang II et la substance P (4-11), un taux élevé de liaison non spécifique est obtenu avec certains séra (figure 38). Cette liaison pourrait être due à la présence d'interactions électrostatiques créées par la conjugaison de certains peptides au

PS. Au moins une autre étude a déjà rapporté des problèmes semblables en utilisant des peptides liés directement sur le PS (Pressentini et al., 1989).

En résumé, l'objectif de développer une méthode efficace pour doser des anticorps anti-Ang II, en conjugant simplement le peptide sur la plaque, n'a pu être réalisé. Cette étude nous a cependant permis de découvrir une nouvelle façon d'améliorer la sensibilité des tests ELISA effectués avec certains antigènes peptidiques de petites tailles. Il s'agit de plus d'une méthode simple, peu coûteuse, et qui permet la conservation et la réutilisation de plaques usagées sur lesquelles les peptides ont déjà été liés. Une étude plus exhaustive serait toutefois nécessaire pour déterminer les séquences peptidiques les plus prometteuses afin d'utiliser cette méthode pour le développement d'un nouvel outil diagnostique.

### **III- Anticorps anti-angiotensine II réagissant avec les antagonistes non-peptidiques du récepteur AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II: récepteur modèle de l'hormone**

La possibilité d'utiliser des protéines cristallisables imitant la surface moléculaire de reconnaissance des récepteurs hormonaux serait importante pour la conception future des nouvelles drogues. Nous avons pensé que de telles protéines pourraient être accessibles de façon naturelle sous forme d'anticorps. De fortes homologies ont par exemple déjà été notées entre la liaison de certains anticorps produits contre une hormone par rapport à la liaison de la même hormone pour son récepteur. (Talwar et al., 1985; Couraud, 1986, Reilly et al., 1987). Quoique la structure tertiaire d'un récepteur soit nécessairement très différente de la région FAB hypervariable d'un anticorps, il est possible que la cavité de contact du récepteur soit identique à celle d'un anticorps si cet anticorps exprime une relation structure-activité identique à celle du récepteur.

Nous avons donc exploré la possibilité de produire un récepteur modèle de l'Ang II, en identifiant un anticorps anti-Ang II,

qui serait capable de reconnaître différents ligands des récepteurs AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub>, dont des analogues non-peptidiques de l'Ang II.

Afin d'identifier un tel anticorps, les séra de souris immunisées avec la [Sar<sup>1</sup>]Ang II-BSA ont été préincubés en présence de concentrations élevées de différentes substances reliées ou non reliées à l'Ang II. Dans la plupart des séra, seul l'Ang II et la saralazine ont été reconnues spécifiquement par les anticorps anti-Ang II. Néanmoins, des liaisons croisées significatives ont aussi été obtenues avec les antagonistes non-peptidiques du récepteur AT<sub>1</sub> de l'Ang II. En générale ces inhibitions ou réactivités croisées suivent deux profils soit: a) la majorité des séra interagissent avec le L-158,809 et b) le sérum de la souris #6 a démontré un niveau de réactivité croisé significatif avec l'ensemble des analogues peptidiques et non-peptidiques utilisés. Ce fut le seul sérum à être testé plus à fond par la suite.

Le fait que l'antagoniste non-peptidique ayant le plus d'affinité pour le récepteur AT<sub>1</sub>, le L-158,809, soit également celui qui interagit le plus avec les anticorps anti-Ang II, ne nous permet tout de même pas de suggérer qu'il y a vraiment une corrélation entre l'affinité des antagonistes pour le récepteur et le profil de réactivité croisé obtenu, car les antagonistes non-peptidiques utilisés ont eu en général trop peu d'affinité pour les anticorps testés.

Les antagonistes non-peptidiques spécifiques au récepteur AT<sub>2</sub>, et ceux non relié à l'Ang II (la naloxone: un antagoniste des opioïdes, et le CP-96,345: un antagoniste spécifique à la substance P (Rouissi et al., 1991)), n'ont aucune interaction significative avec les anticorps anti-Ang II.

Le sérum de la souris #6 est particulièrement intéressant dû au fait que ces anticorps anti-Ang II interagissent avec la plupart des ligands sélectifs AT<sub>1</sub> (figure 41), et ce avec des courbes de déplacement qui sont d'un profil sigmoïdale (figure 42). Ces courbes

suggèrent qu'il s'agit d'un seul et même site de liaison pour tous les analogues (peptidiques et non-peptidiques), ce qui implique que les anticorps de ce sérum sont hautement similaires dans leur propriété de liaison. Cette homogénéité dans les anticorps anti-Ang II est aussi mise en évidence par le fait que les antagonistes non-peptidiques Dup 753 et L-158,809 parviennent à déplacer presque entièrement les anticorps. Un sérum plus hétérogène, avec des anticorps reconnaissant différentes parties de l'Ang II n'aurait pu être déplacé qu'en partie par de petites molécules tels les antagonistes non-peptidiques. Le peu de réactivité croisée retrouvée avec les autres séras peut donc être en partie causé par la plus grande variété d'anticorps anti-Ang II présent dans ces séras.

Une grande différence d'affinité est observée entre la [Sar<sup>1</sup>]Ang II et ses analogues peptidiques, [Sar<sup>1</sup>,Ala<sup>8</sup>]Ang II et [Sar<sup>1</sup>,Phe(Br<sub>5</sub>)<sup>8</sup>]Ang II pour les anticorps. De telles différences dans les valeurs de IC<sub>50</sub> de différents analogues peptidiques de l'Ang II ont aussi été notées précédemment dans une étude sur la réactivité croisée d'anticorps monoclonaux anti-Ang II (Vallotton, 1970).

Il est bien connu que la position 8 de l'Ang II est très importante car elle confère la propriété d'agoniste ou d'antagoniste (Aumelas et al., 1985). Le récepteur AT<sub>1</sub> accepte cependant avec peu de différences d'affinités aussi bien un acide aminé aliphatique tel que l'alanine qu'un acide aminé aromatique modifié encombré tel que la Phe(Br<sub>5</sub>) (Bossé et al., 1990). Ce profil se retrouve dans notre modèle, puisqu'il y a très peu de différences entre les IC<sub>50</sub> de ces deux antagonistes peptidiques (saralaline et [Sar<sup>1</sup>, Phe(Br<sub>5</sub>)<sup>8</sup>]Ang II).

Le sérum de l'animal numéro 6 possède plusieurs caractéristiques propre au récepteur AT<sub>1</sub> mais apparemment aucune du récepteur AT<sub>2</sub> car:

1- Les antagonistes peptidiques de l'Ang II sont bien reconnus par les anticorps de ce sérum.

2- Les antagonistes non-peptidiques du récepteur AT<sub>1</sub> les plus sélectifs et les plus puissants sont également bien reconnus (L-

158,809, Exp 3174).

3- Les ligands sélectifs AT<sub>2</sub> ne sont pas reconnu du tout (PD-123177, PD-123319).

4- Les ligands peptidiques témoins non associés à l'Ang II (ACTH) et les antagonistes non-peptidiques non associés à l'Ang II (naloxone et CP-96,345) sont non reconnus.

5- Les analogues peptidiques et non-peptidiques des récepteurs de l'Ang II n'interfèrent aucunement dans un autre système antigène-anticorps non-relié à l'Ang II (Sch et anti-Sch).

Pour caractériser davantage les réactions croisées obtenues, nous avons utilisé deux antigènes pour la détection des anticorps, l'un exposant l'extrémité N-terminale de l'Ang II, et l'autre l'extrémité C-terminale. Dans ce dernier cas, la [Sar<sup>1</sup>,Lys<sup>8</sup>]Ang II a été utilisé de façon à pouvoir lier le peptide préférentiellement par l'amine primaire à l'aide de la glutaraldéhyde (Avrameas et Terninck, 1969). L'importance relative des extrémités de l'Ang II pour la détection des anticorps a ainsi pu être évaluée. Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec les deux antigènes se ressemblent, même si l'inhibition est en moyenne plus élevée avec l'Ang II immobilisé par son extrémité C-terminale. Étant donné que la partie immobilisée d'un antigène peptidique est habituellement peu accessible à la liaison anticorps (Van Regenmortel et al., 1988), on peut suggérer que les extrémités de l'Ang II ne sont donc pas directement impliquées dans la réactivité croisée des anticorps avec les antagonistes non-peptidiques. Les acides aminés impliqués dans cette réaction croisée sont alors probablement des acides aminés intermédiaires accessibles aux anticorps dans les deux antigènes utilisés pour la détection. Ces acides aminés, imités par les antagonistes non-peptidiques, seraient vraisemblablement aussi ceux qui se lient directement avec le récepteur de l'Ang II. L'histidine en position 6 de l'Ang II pourrait être l'un de ces acides aminés, car il a été démontré qu'il s'agit d'un acide aminé essentiel à

la liaison et à l'activité biologique de l'Ang II (Hsieh et al., 1979). L'histidine est aussi un déterminant antigénique important de l'Ang II (Couraud, 1998; Hermann et al., 1986; Abruzzini et Thomas, 1983); et enfin elle possède, par son groupement imidazole, une homologie structurale importante avec les antagonistes non-peptidiques (Dudley et al., 1990).

En résumé, on peut déduire de ces résultats qu'il est possible de produire des anticorps capables d'imiter la structure d'un récepteur hormonal. Néanmoins, la faible affinité observée avec la plupart des analogues de l'Ang II, laisse supposer qu'une étude d'analyse beaucoup plus importante serait nécessaire pour arriver à trouver un anticorps approprié qui se lierait à l'hormone exactement comme le récepteur. Un tel anticorps deviendrait un outil important pour l'analyse de la structure du récepteur AT<sub>1</sub>, et pourrait servir à la production de nouveaux ligands pour ce récepteur.

Enfin cette étude nous permet aussi de suggérer qu'effectivement, une homologie structurale existe entre les antagonistes non-peptidiques de l'Ang II et l'Ang II elle-même.

## CONCLUSION

La conjugaison de longues chaînes aliphatiques sur certains acides aminés des petits antigènes peptidiques pourraient être une façon simple d'améliorer l'efficacité des vaccins synthétiques. Peu d'études ont jusqu'à présent rapporté les possibilités d'une telle méthode pour la production d'anticorps anti-peptides, mais l'introduction d'acides aminés de nature "pseudo-lipidiques" lors de la synthèse de peptides en phase solide, pourrait être une nouvelle façon de produire des immunogène synthétiques dont la structure chimique pourrait être modifiée selon l'emplacement des déterminants antigéniques.

L'addition d'une ou de plusieurs chaînes aliphatiques n'est pas parvenu à augmenter la production d'anticorps face à deux peptides modèles que nous avons choisis, et ce contrairement à la méthode de conjugaison à une protéine qui s'est avérée fort efficace.

Étant donné l'inefficacité apparente des peptides avec acides aminés pseudo-lipidiques dans notre étude et les difficultés associées à leurs purifications, le couplage des peptides à des chaînes aliphatiques ne peut être suggéré comme étant une voie de choix pour produire des anticorps anti-peptides. Des études ultérieures pourraient néanmoins peut-être parvenir à délimiter plus précisément les possibilités immunogéniques des acides aminés pseudo-lipidiques.

Dans le but de faciliter le dosage d'anticorps spécifiques à des petits antigènes peptidiques, nous avons développé une méthode permettant la liaison covalente des peptides à des plaques ELISA. Les dosages par la méthode ELISA sont souvent difficiles à réaliser avec des antigènes peptidiques très courts qui adhèrent peu aux surfaces de plastique. Notre méthode qui consiste à soumettre le polystyrène à des radiations gamma suivie d'une activation chimique avec un agent de couplage, permet l'attachement des peptides synthétiques par leur extrémité N-terminale, sur les plaques ELISA. La sensibilité des essais ELISA effectués avec cette méthode est nettement améliorée par rapport aux méthodes de liaison

conventionnelle (adsorption hydrophobe), et ce surtout avec des antigènes peptidiques courts (12 acides aminés et moins). Les plaques sur lesquelles les peptides sont liés de façon covalente sont de plus réutilisables, et peuvent être conservées pour de longues périodes (plusieurs mois) sans besoin de réfrigération.

Ces caractéristiques nous laisse suggérer que cette méthode relativement simple pourrait être facilement utilisée pour des dosages à plus grandes échelles. Des expériences témoins devront cependant être effectués avec chaque peptide utilisé, car un taux élevé de liaison non spécifique et l'absence de liaison spécifique des anticorps a pu être observés avec un peptide telque l'Ang II.

La possibilité de concevoir un récepteur modèle pour l'Ang II, à partir d'anticorps polyclonaux anti-Ang II a également été vérifiée en examinant les réactions croisées entre des anticorps anti-Ang II et différents analogues peptidiques et non-peptidiques de l'hormone.

Au moins un des huit séra examinés possédait des anticorps capables de reconnaître faiblement, mais spécifiquement, l'ensemble des antagonistes non-peptidiques AT<sub>1</sub>, ainsi que les analogues peptidiques de l'Ang II.

Il est donc possible de produire des anticorps polyclonaux ayant des sites de liaison imitant la stucture de reconnaissance d'un récepteur de l'Ang II. Une étude d'analyse de grande envergure pourrait alors probablement permettre de localiser des anticorps ayant une meilleure affinité pour les ligands sélectifs au récepteur AT<sub>1</sub>, ou encore capables de reconnaître les analogues du récepteur AT<sub>2</sub>. De tels anticorps cristallisables et produits de façon monoclonale pourraient devenir des modèles appropriés pour l'étude structurale des sites de liaison de récepteurs peptidergiques.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier le Dr Emanuel Escher pour ses conseils judicieux, sa disponibilité, et son intérêt constant porté à l'égard des projets entrepris.

Je remercie le Dr Marek Rola-Pleszczynski, le Dr Gilles Dupuis, le Dr Pierrette Gaudreau et le Dr Emanuel Escher pour la correction de cette thèse.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler au laboratoire, et qui ont su y maintenir une ambiance très agréable.

Je remercie enfin ma femme et meilleure amie Chantal, ainsi que mon père et ma mère qui ont su m'appuyer et m'encourager de plusieurs façons.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Abbas, A.K., Litchman, A.H. et Pober, J.S. B-cell activation and antibody production. Dans : Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphie (1991) p. 187-192.

Abruzzini, A.F. et Thomas, D.W. (1983). Fine specificity of guinea pig antibodies to angiotensin II. A comparison with Ir control of T lymphocyte responses. Eur. J. Immunol. 13 : 51-56.

Allison, A.C. et Gregoriadis, G. (1974). Liposomes as immunological adjuvants. Nature. 252 : 252-255.

Allison, A.C. (1979). Mode of action of immunological adjuvants. J. Reticulo-endothel. Soc. 26 : 619-630.

Allison, A.C. et Byars, N.E. (1986). An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. J. Immunol. 95 : 157-158.

Allison, A.C. et Byars, N.E. (1992). Syntex adjuvant formulation. Res. Immunol. 143 : 519-525.

Alving, C.R. et Richards, R.L. (1990). Liposomes containing lipid A : potent nontoxic adjuvant for a human malaria sporozoite vaccine. Immunol. lett. 25 : 275-279.

Alving, C.R. (1991). Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. J. Immunol. 140 : 1-13.

Anderer, F.A. et Schlumberger, H.D. (1965) Properties of different artificial antigens immunologically related to tobacco mosaic virus. Biochim. Biophys. Acta 97 : 503-509.

Arnon, R., Sela, M., Parant, M. et Chedid, L. (1980). Antiviral response elicited by a completely synthetic antigen with built-in adjuvancity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 6769-6772.

Arnon, R., Shapira, M. et Jacob, C.O. (1983). Synthetic vaccines. *J. Immunol.* 61 : 261-273.

Aumelas, A., Sakarellos, C., Lintner, K., Fermandjian, S., Khosla, M.C., Smeby, R.R. et Bumpus, F.M. (1985). Studies on angiotensin II and analogs : impact of substitution in position 8 on conformation and activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 : 1881-1885.

Avrameas, S. et Ternynck, T. (1969). The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochem.* 6 : 53-66.

Baleux, F. et Dubois, P. (1992). Novel version of a multiple antigenic peptide allowing incorporation on a cysteine functionalized lysine tree. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 40 : 7-12.

Ballou, W.R., Sherwood, J.A., Neva, F.A., Gordon, D.M., Wirtz, R.A., Wasserman, G.F., Diggs, C.L., Hoffman, S.L., Hollingdale, M.R., Hockneyer, W.T., Schneider, T., Young, J.F., Reeve, P., Chulay, D.D. (1987). Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet* 1 : 1277-1281.

Balloul, J.M., Grzych, J.M., Pierce, R.J. et Capron, A. (1987a). A purified 28,000 daltons protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138 : 3448-3453.

Balloul, J.M., Sondermayer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvalho, D., Lecocq, J.P. et Capron, A. (1987b). Molecular cloning of protective antigen of schistosomes. *Nature* 326 : 149-153.

Barbeau, D., Guay, S., Neugebauer, W. et Escher, E. (1992). Preparation and biological activities of potential vasopressin photoaffinity labels. *J. Med. Chem.* 35 : 151-157.

Baschang, G. (1989). Muramylpeptides and lipopeptides: studies towards immunostimulants. *Tetrahedron* 45 : 6331-6360.

Bennett, B., Check, I.J., Olsen, M.R. et Hunter, R.L. (1992). A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J. Immunol. Methods* 153 : 31-40.

Bessler, W.G. et Ottenbreit, B.P. (1977). Studies on the mitogenic principle of the lipoproteine from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 76 : 234-246.

Bessler, W.G., Suhr, B., Bühring, H.J., Müller, C.P., Wiesmüller, K.H., Becker, G. et Jung, G. (1985a). Specific antibodies elicited by antigen covalently linked to a synthetic adjuvant. *Immunobiol.* 170 : 239-244.

Bessler, W.G., Cox, M., Lex, A., Suhr, B., Wiesmüller, K.H. et Jung, G. (1985b). Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J. Immunol.* 135 : 1900-1905.

Bossé, R., Gerold, H., Fischli, W., Holck, M. et Escher, E. (1990). An angiotensin antagonist with prolonged action and antihypertensive properties. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16 : S50-S55.

Boudet, F., Thèze, J. et Zouali, M. (1991). U.V.-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J. Immunol. Methods* 142 : 73-82.

Boyd, G.W. et Peart, W.S. (1968). The production of high titre antibody against free angiotensin II. *Lancet* 2 : 129-133.

Brewer, J.M. et Alexander, J. (1992). The adjuvant activity of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) on the BALB/c humoral response to bovine serum albumin. *Immunol.* 75 : 570-575.

Briand, J.P., Müller, S. et Van Regenmortel, M.H.V. (1985). Synthetic peptide as antigens : Pitfalls of conjugation methods. *J. Immunol. Methods* 78 : 59-69.

Briand, J.P., Barin, C., Van Regenmortel, M.H.V., Muller, S. (1992). Multiple antigen peptide (MAP) system : detailed study of immunogenic and antigenic properties. In *Peptides, proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium*. M. I. T. Boston, J.A. Smith & J.E. Rivier eds., Escom publ. Leyden, Netherlands, p. 893-894.

Broderson, J.R. (1989). A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab. Anim. Sci.* 39 : 400-405.

Cantarero, L.A., Butler, J.E. et Osborne, J.W. (1980). The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Anal. Biochem.* 105 : 375-382.

Capponi, A.M. et Catt, K.J. (1979). Angiotensin II receptors in adrenal cortex and uterus. Binding and activation properties of angiotensin analogues. *J. Biol. Chem.* 254 : 5120-5127.

Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M. et Torpier, G. (1982). Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. *Immunol. Rev.* 61 : 41-66.

Capron, A., Dessaint, J.P. (1992). Immunologic aspects of Schistosomiasis. *Annu. Rev. Med.* 43 : 209-218.

Catt, K. et Abbott, A. (1991). Molecular cloning of angiotensin II receptors may presage further receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 12 : 279-281.

Chang, R.S.L., Siegl, P.K.S., Clineschmidt, B.V., Mantlo, N.B., Chakravarty, P.K., Greenlee, W.J., Patchett, A.A. et Lotti, V.J. (1992). In vitro pharmacology of L-158,809 a new highly potent and selective angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp.*

Therap. 262 : 133-138.

Check, I.J., Bennett, B. et Hunter, R.L. Hunter's TiterMax research adjuvant. Technical background. Revue d'information de la compagnie CytRx. 150 technology parkway, Atlanta, Norcross, GA 30092.

Chen, T.B., Lotti, V.J., et Chang, S.L. (1992). Characterization of the binding of [<sup>3</sup>H]L-158,809: a new potent and selective nonpeptide angiotensin II receptor (AT<sub>1</sub>) antagonist radioligand. Mol. Pharmacol. 42 : 1077-1082.

Chiu, A.T., Herblin, W.F., McCall, D.E., Ardecky, R.J., Carini, D.J., Duncia, J.V., Pease, L.J., Wong, P.C., Wexler, R.R., Johnson, A.L. et Timmermans, P.B.M.W.M. (1989). Identification of angiotensin II receptors subtypes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165 : 196-203.

Chiu, A.T., Carini, D.J., Duncia, J.V., Leung, K.H., McCall, D.E., Price, W.A., Wong, P.C., Smith, R.D., Wexler, R.R. et Timmermans, P.B.M.W.M. (1991). Dup532 : a second generation of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177 : 209-217.

Christen, Y., Waeber, B., Nussberger, J., Porchet, M., Borland, R.M., Lee, R.J., Maggon, K., Shum, L., Timmermans, P.B.M.W.M. et Brunner, H.R. (1991a). Oral administration of Dup 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers : inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II. Circulation 83 : 1333-1342.

Christen, Y., Waeber, B., Nussberger, J., Lee, R.J., Timmermans, P.B.M.W.M. et Brunner, H.R. (1991b). Dose-response relationship following oral administration of Dup 753 to normal humans. Am. J. Hypertens. 4 : 350S-353S.

Claasen, E. et Boerama, W.J.A. (1992). Characteristics and practical use of new-generation adjuvants as an acceptable alternative to

- Freund's complete adjuvant. *Res. Immunol.* 143 : 475-477.
- Claasen, E., de Leenw, W., de Greeve, P., Hendriksen, C. et Boersma, W. (1992). Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. *Res. Immunol.* 143 : 478-483.
- Coon, J. et Hunter, R. (1973). Selective induction of delayed hypersensitivity by a lipid conjugated protein antigen which is localized in thymus dependent lymphoid tissue. *J. Immunol.* 110 : 183-190.
- Cooper, T.C. et Wiley, A. (1977). *Immunochemical technics*. Dans: The tools of biochemistry. Interscience publication. John Wiley & Sons, New York p. 259.
- Couraud, P.O. (1986). Structural analysis of the epitopes recognized by monoclonal antibodies to angiotensin II. *J. Immunol.* 136 : 3365-3370.
- Coutinho, A., Gronowicz, E., Bulluck, W.W. et Möller, G. (1974). Mechanism of thymus-independent immunocyte triggering. *J. Exp. Med.* 139 : 74-92.
- Dailey, M.O. et Hunter, R.L. (1977). Induction of cell-mediated immunity to chemically modified antigens in guinea pigs. I. Characterization of the immune response to lipid-conjugated protein antigens. *J. Immunol.* 118 : 957-962.
- Damonneville, M., Wiezerbin, J., Pancré, V., Joseph, M., Delanoye, A., Capron, A. et Auriault, C. (1988). Recombinant tumor necrosis factor mediates platelet cytotoxicity to *S. mansoni* larvae. *J. Immunol.* 142 : 1342-1350.
- Deeb, B.J., DiGiacomo, R.F., Kunz, L.L. et Stewart, J.S. (1992). Comparison of Freund's and Ribi adjuvants for inducing antibodies to the synthetic antigen (TG)-AL in rabbits. *J. Immunol. Methods* 152 : 105-113.
- Deres, K., Schild, H., Weismüller, K.H., Jung, G. et Rammensee, H.G. (1989). In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 342 : 561-564.

Dietrich, F.M. (1966). Immunogenicity of synthetic angiotensin II. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 30 : 497-506.

Dinareello, C.A. et Kruger, J.M. (1986). Induction of interleukin 1 by synthetic and naturally occurring muramyl peptides. *Fed. Proc.* 45 : 2545-2550.

Dreesman, G.R., Sanchez, Y., Ionescu-Matin, J., Sparrow, J.T., Six, H.R., Pettersen, D.L., Hollinger, F.B., Melnick, J.L. (1982). Antibody to hepatitis B surface antigen after-single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptides. *Nature* 295 : 158-160.

Dudley, D.T., Panek, R.L., Major, T.C., Lu, G.H., Bruns, R.F., Klinkfus, B.A., Hodges, J.C., et Weishaar, R.E. (1990). Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol. Pharmacol.* 38 : 370-377.

East, I.J., Eisemann, C.H., Vuocolo, T., Pearson, R.D., Donaldson, R.A. et Cadogan, L.C. (1992). Vaccines against blowfly strike : the effect of adjuvant type on vaccine effectiveness. *Intl. J. Parasitol.* 22 : 309-314.

Ellouz, F., Adam, A., Ciorbaru, R. et Lederer, E. (1974). Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 59 : 1317-1325.

Engvall, E. et Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochem.* 8 : 871-874.

Engvall, E., Jousson, K. et Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, Immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody coated tubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 : 427-434.

Engvall, E. et Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobuline in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109 : 129-135.

Finnegan, A. et Amburgey, C.F. (1989). A single amino acid mutation in a protein antigen abrogates presentation of certain T cell

determinants. *J. Exp. Med.* 170 : 2171-2176.

Fraker, P.J. et Speck, J.C. (1978). Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6, tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 80 : 849-857.

Francis, M.J., Fry, C.M., Rowlands, D.J., Braun, F., Bittle, J.L., Houghten, R.A. et Lerner, R.A. (1985). Immunological priming with synthetic peptides of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 66 : 2347-2354.

Freund, J. (1951). The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization. *Am. J. Clin. Pathol.* 21 : 645-648.

Fries, L.F., Gordon, D.M., Richards, R.L., Egan, J.E., Hollingdale, M.R., Gross, M., Silverman, C. et Alving, C.R. (1992). Liposomal malaria vaccine in humans: a safe and potent adjuvant strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 : 358-362.

Garcia, K.G.; Ronco, P.; Verroust, P.J. et Angel, L.M. (1989). Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of an anti-angiotensin II Fab and of the peptide-Fab complex. *J. Biol. Chem.* 264 : 20463-20466.

Garnett, J.L. (1977). Grafting. *Radiat. Phys. Chem.* 14 : 79-99.

Geysen, H.M., Melohen, R.B. et Bartsling, S.J. (1984). Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 : 3998-4002.

Ghose, A.C. et Karush, F. (1988). Induction of polyclonal and monoclonal responses to cholera toxin by the synthetic peptide approach. *Mol. Immunol.* 25 : 223-230.

Gibbs, J., Titas, K., Root, D. et Lawton, L. (1992) Advantages of covalent immobilization of antibody fragments (Fc, Fab, F(ab')<sub>2</sub>) on 96 well polystyrene plates. *FASEB J.*, 1992 FASEB meeting, Anaheim, California. Abstract no 1654.

Goodfriend, T.L., Levine, L. et Fasman, G.D. (1964). Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology.

Science 144 : 1344-1346.

Gregoriadis, G. (1990). Immunological adjuvants: a role for liposomes. Immunol. Today. 11 : 89.

Gustafson, G.L. et Rhodes, M.J. (1992). Bacterial cell wall products as adjuvants: early interferon gamma as a marker for adjuvants that enhance protective immunity. Res. Immunol. 143 : 483-488.

Habbuetzel, A., Pessi, A., Bianchi, E., Rotigliano, G. et Esposito, F. (1991). Multiple antigen peptides for specific detection of antibodies to a malaria antigen in human sera. Immunol. Letters 30 : 75-80.

Haber, E., Koerner, T., Page, L.B., Kliman, B. et Purnode, A. (1969). Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. (1969). J. Clin. Endocr. 29 : 1349-1355.

Heatley, R.V. et Stark, J.M. (1975). Immunogenicity of lipid-conjugated protein in the intestine. Immunol. 29 : 143-149.

Hebbes, T.R., Turner, C.H., Thorne, A.W. et Crane-Robinson C. (1989). A "Minimal epitope" anti-protein antibody that recognises a single modified amino acid. Mol. Immunol. 26 : 865-873.

Henington, D.A., Clyde, D.F., Losonsky, G., Cortesia, M., Murphy, J.R., Davis, J., Baquar, S., Felix, A.M., Heimer, E.P., Gillessen, D., Nardin, E., Nussenzweig, R.S., Hollingdale, M.R. et Levine, M.M. (1987). Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. Nature (London). 328 : 257-259.

Herbert, V., Lau, K.S., Gottlieb, C.W. et Bleicher, S.J. (1965). Coated charcoal immunoassay of insulin. J. Clin. Endocr. 25 : 1375-1384.

Hermann, K., Kimura, B. et Phillips, M.I. (1986). Enrichment and characterization of angiotensin II using affinity and high pressure liquid chromatography. Biochem. Biophys. Res. Commun. 136 : 685-700.

Hopp, T.P. (1984). Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. Mol. Immunol. 21

: 13-16.

Hsieh, K. et Jorgensen, E.C. (1979). Angiotensin II analogues. 14. Roles of the imidazole nitrogens of position-6 histidine in pressor activity. *J. Med. Chem.* 22 : 1199-1206.

Hui, G.S.N., Tam, L.A., Chang, S.P., Case, S.E., Hashiro, C., Siddiqui, W.A., Shiba, T., Kusumoto, S. et Kotani, S. (1991). Synthetic low-toxicity muramyl dipeptide and monophosphoryl lipid A replace Freund complete adjuvant in inducing growth-inhibitory antibodies to the plasmodium falciparum major merozoite surface protein, gp 195. *Infect. Immun.* 59 : 1585-1591.

Hummel, R. P., Tröger, W., et Jung, G. (1989). Distinction of HIV-1 and HIV-2 infection using novel synthetic lipopeptide-conjugates as antigens in ELISA. Dans: Peptides 1988. Proceedings of the 20th European peptide symposium. E. Bayer et G. Jung eds., Walter de Gruyter, New York. p. 686-688.

Hunter, R.L., Olsen, M. et Buynitzky, S. (1991). Adjuvant activity of non-ionic block copolymers. IV. Effect of molecular weight and formulation on titre and isotype of antibody. *Vaccine.* 9 : 250-255.

Jacob, C.O., Arnon, R. et Sela, M. (1985). Effect of carrier on the immunogenic capacity of synthetic cholera vaccine. *Mol. Immunol.* 22 : 1333-1339.

John, D.D., Torres, J.R., Murillo, J., Herrington, D.A., Levine, M.M., Wasserman, S.S., Cortesia, M.J., Losonsky, G.A. et Stürcher, D. (1989). Effect of priming with carrier on response to conjugate vaccine. *Lancet* 2 : 1415-1418.

Johnston, B.A., Eisen, H. et Fry, D. (1991). An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 41 : 15-21.

Kapp, J.A. et Strayer, D.S. (1978). H-2 linked Ir gene control of antibody responses to porcine insuline. I.- Development of insuline-specific antibodies in some but not all nonresponder strains injected with proinsuline. *J. Immunol.* 121 : 978-982.

Kellner, J., Erhard, M., Schronner, J. et Lösch, U. (1991). The influence of various adjuvants on antibody synthesis following

immunization with an hapten. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373 : 51-55.

Kenney, J.S., Hughes, B.W., Masada, M.P. et Allison, A.C. (1989). Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. *J. Immunol. Methods* 121 : 157-166.

Kiron, M.A.R. et Soffer, R.L. (1989). Purification and properties of a soluble angiotensin II binding protein from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 264 : 4138-4142.

Klasen, E.A., Rigutti, A., Bos, A. et Bernini, L.F. (1983). Development of a screening system for detection of somatic mutations. II. The use of peptides and insoluble protein fragments in a competitive solid-phase enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods* 59 : 281-287.

Koolen, M.J.M., Borst, M.A.J., Horzinek, M.C. et Spaan, W.J.M. (1990). Immunogenic peptide comprising a mouse hepatitis virus A59 B-cell epitope and an influenza virus T-cell epitope protects against lethal infection. *J. Virol.* 64 : 6270-6273.

Larsson, P.H., Johanson, S.G.O., Hult, A. et Gothe, S. (1987). Covalent binding of proteins to grafted plastic surfaces suitable for immunoassays. I.- Binding capacity and Characteristics of grafted polymers. *J. Immunol. Methods* 98 : 129-135.

Lehtonen, O.P. et Viljanen, M.K. (1980). Antigen attachment in ELISA. *J. Immunol. Methods* 34 : 61-70.

Lehtonen, O.P. et Eerola, E. (1982). The effect of different antibody affinities on ELISA absorbance and titer. *J. Immunol. Methods* 54 : 233-240.

Le-Nguyen, D., Heitz, A. et Castro, B. (1987). Renin Substrates. Part 2. Rapid solid phase synthesis of the ratine sequence tetradecapeptide using Bop reagent. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 : 1915-1919.

Loleit, M., Tröger, W., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Strecker, M. et Bessler, W.G. (1990). Conjugates of synthetic lymphocyte-activating lipopeptides with segments from HIV proteins induce protein-specific antibody formation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371 :

967-975.

Lowry, O.H., Rosenberg, N.J., Fan, A.L. et Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.

Lu, G.H., Taylor, D.G. Jr., Hodges, J.C. et Panek, R.L. (1991a). Characterization of angiotensin II type 2 (AT<sub>2</sub>) binding sites in the rabbit uterus. *FASEB J.* 5 Abstract no A872.

Lu, Y.-A., Clavijo, P., Galantino, M., Ghen, Z.-Y., Liu, W. et Tam, J.P. (1991b). Chemically unambiguous peptide immunogen: preparation, orientation and antigenicity of purified peptide conjugated to the multiple antigen peptide system. *Mol. Immunol.* 28 : 623-630.

Marguerite, M., Bossus, M., Mazingue, C., Wolowczuk, J., Gras-Masse, H., Tartar, A., Capron, A. et Auriault, C. (1992). Analysis of antigenicity and immunogenicity of five different chemically defined constructs of a peptide. *Mol. Immunol.* 29 : 793-800.

Marie, J., Desarnaud, F., Lombard, C., Seyer, R., Bonnafous, J.C. et Jard, S. (1990). Characterization of the angiotensin II receptor. *Horm. Res.* 34 : 95-100.

Marsden, H.S., Owsianka, A.M., Graham, S., McLean, G.W., Robertson, C.A. et Subak-Sharpe, J.H. (1992). Advantages of branched peptides in sera diagnostic. Detection of HIV specific antibodies and the use of glycine spacers to increase sensitivity. *J. Immunol. Methods* 147 : 65-72.

McLean, G.W., Owsianka, A.M., Subak-Sharpe, J.H. et Marsden, H.S. (1991). Generation of anti-peptide and anti-protein sera. Effect of peptide presentation on immunogenicity. *J. Immunol. Methods* 137 : 149-157.

Mendelsohn, F.A.O. (1985). Localization and properties of angiotensin receptors. *J. Hypertens.* 3 : 307-314.

Merrifield R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85 : 2149-2154.

Metzger, J., Wiesmüller, K.-H., Schoude, R., Bessler, W.G. et Jung, G. (1991). Synthesis of novel immunologically active tripalmitoyl-S-glycerylcystinyl lipopeptides as useful intermediates for immunogen preparations. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37 : 46-57.

Michel, J.-B., Guettier, C., Reade, R., Sayah, S., Corval, P. et Ménard, J. (1989). Immunologic approaches to blockade of the renin-angiotensin system: A review. *Amer. Heart J.* 117 : 756-767.

Monsan, P., Puzo, G. et Mazarguil, H. (1975). Etude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde. *Biochimie* 57 : 1281-1292.

Müller, C.P., Bühring, H.J., Becker, G., Jung, C.C., Jung, G., Tröger, W., Saalmüller, A., Wiesmüller, K.H. et Bessler, W.G. (1989). Specific antibody response towards predicted epitopes of the epidermal growth factor receptor induced by a thermostable synthetic peptide adjuvant conjugate. *Clin. Exp. Immunol.* 78 : 499-504.

Murphy, T.J., Alexander, R.W., Giendling, K.K., Runge, M.S. et Bernstein, K.E. (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351 : 233-236.

Murray, R., Cohen, P., Hardegrer, M.C. (1972). Mineral oil adjuvants: biological and chemical studies. *Ann. Allergy* 30 : 146-151.

Nicklas, W. (1992). Aluminum salts. *Res. Immunol.* 143 : 489-494.

Nilsson, B.O. et Larsson, A. (1992). Inert carriers for immunization. *Res. Immunol.* 143 : 553-557.

Nussberger, J., Matsueda, G.R., Re, R. et Haber, E. (1983). Selectivity of angiotensin II antisera. *J. Immunol. Methods* 56 : 85-96.

Nussberger, J., Re, R., Matsueda, G.R. et Haber, E. (1984). A simplified radioimmunoassay for physiologically active angiotensin peptides [(1-8) Octa- and (2-8) heptapeptides]. *Horm. Metabol. Res.* 16 : 606-610.

Ogonuki, H., Hashizume, S. et Abe, H. (1967). Histopathological tests of tissues in the sites of local reactions caused by the injection of oil-adjuvant cholera vaccine. *Symp. Ser. Immunobiol. Stan.* 6 : 125-128.

Okawa, Y., Howard, C.R. et Steward, M.W. (1992). Production of anti-peptide specific antibody in mice following immunization with peptides conjugated to mannan. *J. Immunol. Methods.* 149 : 127-131.

Ordronneau, P., Abdullah, L.H. et Petrusz, P. (1991). An efficient enzyme immunoassay for glutamate using glutaraldehyde coupling of the hapten to microtiter plates. *J. Immunol. Methods.* 142 : 169-176.

Osebold, J.W. (1982). Mechanisms of action by immunologic adjuvants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181 : 983-987.

Pancré, V., Monté, D., Delanoye, A., Capron, A. et Auriault, C. (1990). Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and the platelets in the killing of *S. mansoni*. *Eur. Cyt. Net.* 1 : 15-19.

Partidos, C.D., Obeid, O. E. et Steward, M.W. (1992). Antibody responses to non-immunogenic synthetic peptides induced by co-immunization with immunogenic peptides. *Immunol.* 77 : 262-266.

Pattarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L.A., Parton, G. et Trujillo, G. (1988). A synthetic vaccine protects human against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 332 : 158-161.

Peterfy, F., Kuusela, P. et Makela, O. (1983). Affinity requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 130 : 1809-1813.

Phillips, D.J., Reimer, C.B., Wells, T.W. et Black, C.M. (1980). Quantitative characterization of specificity and potency of conjugated antibody with solid-phase, antigen bead standards. *J. Immunol. Methods* 34 : 315-327.

Picard, C., Ronco, P., Moullier, P., Yao, J., Beaudoin, B., Geniteau-Legendre, M. et Verroust, P. (1986). Epitope diversity of angiotensin II analysed with monoclonal antibodies. *Immunol.* 57 : 19-24.

Posnett, D.N., McGrath, H. et Tam, J.P. (1988). A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor  $\beta$ -chain. *J. Biol. Chem.* 263

: 1719-1725.

Presentini, R., Perin, F., Ancilli, G., Boraschi, D., Volpini, G. et Antoni, G. (1989). Influence of the peptide insolubilization method on detection of anti-peptide antibodies in ELISA. Evaluation of nonspecific interactions. *J. Immunoassay* 10 : 395-412.

Regoli, D., Park, W.K. et Rioux, F. (1974). Pharmacology of angiotensin. *Pharmacol. Rev.* 26 : 66-123.

Reilly, T.M., Chiu, A.T. et Timmermans, P.B.M.W.M. (1987). Monoclonal antibodies to angiotensin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143 : 133-139.

Reilly, T.M., Christ, D.D., Duncia, J.V., Pierce, S.K. et Timmermans, P.B.M.W.M. (1992). Monoclonal antibodies to the nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, losartan. *Eur. J. Pharmacol.* 226 : 179-182.

Reimer, C.B., Phillips, D.J., Black, C.M. et Wells, T.W. Dans: *Immunofluorescence and related staining technics*, eds. W. Knapp, K. Holubar and G. Wick (Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam) (1978) p.189.

Reitermann, A., Metzger, J., Wiesmüller, K.H., Jung, G. et Bessler, W.G.G. (1989). Lipopeptide derivatives of bacterial lipoprotein constitute potent immune adjuvants combined with or covalently coupled to antigen or haptens. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370 : 343-352.

Rickman, L.S., Gordon, D.M., Wistar, R. Jr., Krzych, U., Gross, M., Hollingdale, M.R., Egan, J.E., Chulay, J.D. et Hoffman, S.L. (1991). Use of adjuvant containing mycobacterial cell-wall skeleton, monophosphoyl lipid A, and squalane in malaria circumsporozoite protein vaccine. *Lancet* 337 : 998-1001.

Rotmans, J.P. et Delwel, H.R. (1983). Cross-linking of *Schistosoma mansoni* antigens and their covalent binding on the surface of polystyrene microtitration trays for use in the ELISA. *J. Immunol. Methods.* 57 : 87-98.

Rouissi, N., Gitter, B.D., Waters, D.C., Howbert, J.J., Nixon, J.A. et Regoli, D. (1991). Selectivity and specificity of new, non-peptide,

quinuclidine antagonists of substance P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176 : 894-901.

Rüde, E., Meyer-Delius, M. et Gundelach, M.L. (1971). Immunological properties of synthetic sugar-polypeptide conjugates. Effect of N-Lauroyl-glucosamine residues on immunogenicity. *Eur. J. Immunol.* 1 : 113-123.

Sad, S., Gupta, H.M., Talwar, G.P. et Raghupathy, R. (1991). Carrier-induced suppression of the antibody response to a "self" hapten. *Immunol.* 74 : 223-227.

Salcedo, M., Barreto, L., Rojas, M., Moya, R., Cote, J. et Pattarroyo, M.E. (1991). Studies on the humoral immune response to a synthetic vaccine against *plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 84 : 122-128.

Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhen, S., Iwai, N., Murray, J.J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. et Inagami, T. (1991). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351 : 230-233.

Scharpé, S.L., Cooreman, W.M., Blomme, W.J. et Laekeman, G.M. (1976). Quantitative enzyme immunoassay: current status. *Clin. Chem.* 2216 : 733-738.

Schild, H., Deres, K., Wiesmüller, K.H., Jung, G. et Rammensee, H.G. (1991). Efficiency of peptides and lipopeptides for in vivo priming of virus-specific cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.* 21 : 2649-2654.

Schutze, M.P., Leclerc, C., Jolivet, M., Audibert, F. et Chedid, L. (1985). Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.* 135 : 2319-2322.

Sela, M., Fuchs, S. et Arnon, R. (1962). Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. 5. Synthesis, characterization and immunogenicity of some multichain and linear polypeptides containing tyrosine. *Biochem. J.* 85 : 223-235.

Shigemoto, R., Yokota, Y., Tsuchida, K. et Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA. *J. Biol. Chem.* 265 : 623-628.

Siegl, P.K.S., Chang, R.S.L., Mantlo, N.B., Chakravarty, P.K., Ondeyka, D.L., Greenlee, W.J., Patchett, A.A., Sweet, C.S. et Lotti, V.J. (1992). *In Vivo* pharmacology of L-158,809, a new highly potent and selective nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 262 : 139-144.

Singh, S.B. et Leskowitz, S. (1978). Some biological characteristics of lipid conjugates of protein antigen that selectively induce delayed-type hypersensitivity on mice. *Cellular Immunol.* 37 : 96-106.

Smith, R.D., Chiu, A.T., Wong, P.C., Herblin, W.F. et Timmermans, P.B.M.W.M. (1992). Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 : 135-165.

Sondergard-Andersen, J., Lauritzen, E., Lind, K. et Holm, A. (1990). Covalently linked peptides for linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* 131 : 99-104.

Stark, M., Locke, J. et Heatley, R.V. (1980a). Immunogenicity of lipid-conjugated antigens . I. The influence of chain length and degree of conjugation on induction of antibody un mice. *Immunol.* 39 : 345-352.

Stark, M., Matthews, N. et Locke, J. (1980b). Immunogenicity of lipid-conjugated antigens, II. Anti-complementary activity and antigen trapping in the spleen. *Immunol.* 39 : 353-360.

Steward, M.W. et Lew, M. (1985). The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *J. Immunol. Methods.* 78 : 173-190.

Stewart, J.M. et Young, R.D. Dans: Solid phase peptide synthesis. 2<sup>e</sup> ed. Pierce Chemical Company, Rockford. IL. (1984).

Tagliabue, A., Ghiara, P. et Boraschi, D. (1992). Non-inflammatory peptide fragments of IL-1 as safe new-generation adjuvants. *Rev. Immunol.* 143 : 563-568.

Talwar, G.P., Gupta, S.K., Singh, V., Sahal, D., Lyer, K.S.N. et Singh, O. (1985). Bioeffective monoclonal antibody against the decapeptide gonadotropin-releasing hormone : reacting determinant and action on ovulation and estrus suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 :

1228-1232.

Tam, J.P. Multiple antigen peptide system: A novel design for synthetic peptide vaccine and immunoassay. Dans: Synthetic peptides : Approches to biological problems. Alan R. Liss, inc. (1989) p. 3-18.

Tam, J.P. et Zavala, F. (1989). Multiple antigen peptide. A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid phase immunoassays. *J. Immunol. Methods* 124 : 53-61.

Trudel, M., Nadon, F., Séguin, C. et Binz, H. (1991). Protection of BalB/c mice from respiratory syncytial virus infection by immunization with a synthetic peptide derived from the G glycoprotein. *Virology* 185 : 749-757.

Uemura, K., Nicolotti, R.A., S.M., Six, H.R. et Kinsky, S.C. (1974). Antibody formation in response to liposomal model membranes sensitized with N-substituted phosphatidylethanolamine derivatives. *Biochemistry* 13 : 1572-1578.

Vallotton, M.B. (1970). Relationship between chemical structure and antigenicity of angiotensin analogues. *Immunochemistry* 7 : 529-542.

Van Regenmortel, M.H.V., Briand, J.P., Müller, S. et Plaué, S. Synthetic polypeptide as antigens. Dans: R. H. Burton et P. H. Knippenberg (Eds) "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology". Elsevier Science Publishers. B. V. (1988).

Varga, J.M. et Fritsch, P. (1990). Immobilization of small molecules and proteins by radio-derivatized polystyrene. *FASEB J.* 4 : 2671-2677.

Varga, J.M., Klein, G.F. et Fritsch, P. (1990). Binding of a mouse monoclonal IgE (anti-DNP) antibody to radio-derivatized polystyrene-DNP complexes. *FASEB J.* 4 : 2678-2683.

Vera, J.C., Rivas, C.I. et Maccioni, R.B. (1988). Antibodies to synthetic peptides from the tubulin regulatory domain interact with tubulin and microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 : 6763-6767.

Verheul, A.M.F. et Snippe, H. (1992). Non-ionic block polymer surfactants as immunological adjuvants. *Res. Immunol.* 143 : 512-

519.

Verschoor, J.A., Vermeulen, N.M.J. et Visser, L. (1990). Haptenated nylon-coated polystyrene plates as a solid phase for ELISA. *J. Immunol. Methods* 127 : 43-49.

Vogel, A.I. Dans: A text book of practical organic chemistry including qualitative organic analysis. 3<sup>ième</sup> edition. Longman Ltd London. (1956) p. 309.

Walden, P., Nagy, Z.A. et Klein, J. (1985). Induction of regulatory T-lymphocyte responses by liposomes carrying major histocompatibility complexe molecules and foreign antigen. *Nature*. 315 : 327-329.

Walden, P., Nagy, Z.A. et Klein, J. (1986). Major histocompatibility complex-restricted and unrestricted activation of helper T cell lines by liposome-bound antigen. *J. Mol. Immunol.* 2 :191-197.

Walter, G. (1986). Production and use of antibodies against synthetic peptides. *J. Immunol. Methods* 88 : 149-161.

Warren, H.S., Vogel, F.R. et Chedid, L.A. (1986). Current status of immunological adjuvants. *Annu. Rev. Immunol.* 4 : 369-388.

Whitebread, S., Mele, M., Kamber, B. et DeGasparo, M. (1989). Preliminary biochemical characterization of the angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 : 284-291.

Wiedemann, F., Link, R., Pumpe, K., Jacobshagen, V., Schaefer, H.E., Wiesmüller, K.H., Hummel, R.-P., Jung, G., Bessler, W. et Böltz, T. (1991). Histopathological studies on the local reactions induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P<sub>3</sub>C) conjugates. *J. Pathol.* 164 : 265-271.

Wisdom, G.B. (1992). Peptide Antigens. *Biochem, Soc. Trans.* 20 : 226-229.

Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Vendeville, C., Balloul, J.M., Tartar, A. et Capron, A. (1989). Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *J. Immunol.* 142 :1342-1350.

Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Vendeville, C., Tartar, A. et Capron, A. (1990). T-cell responsiveness towards various synthetic peptides of the P-28 antigen in rat and mouse models during *Schistosoma mansoni* infection . Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 93 : 350-358.

Wolowczuk, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R.L., Grezel, D., Reid, G.D. et Tartar, A. (1991) Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse, and monkey. J. immunol. 146 : 1987-1995.

Wong, P.C., Hart, S.D., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Carini, D.J., Smith, R.D., Wexler, R.R. et Timmermans, P.B.M.W.M. (1991). Pharmacology of Dup 532, a selective and noncompetitive AT<sub>1</sub> receptor antagonist. J. Pharmacol. Exp. Therap. 259 : 861-870.

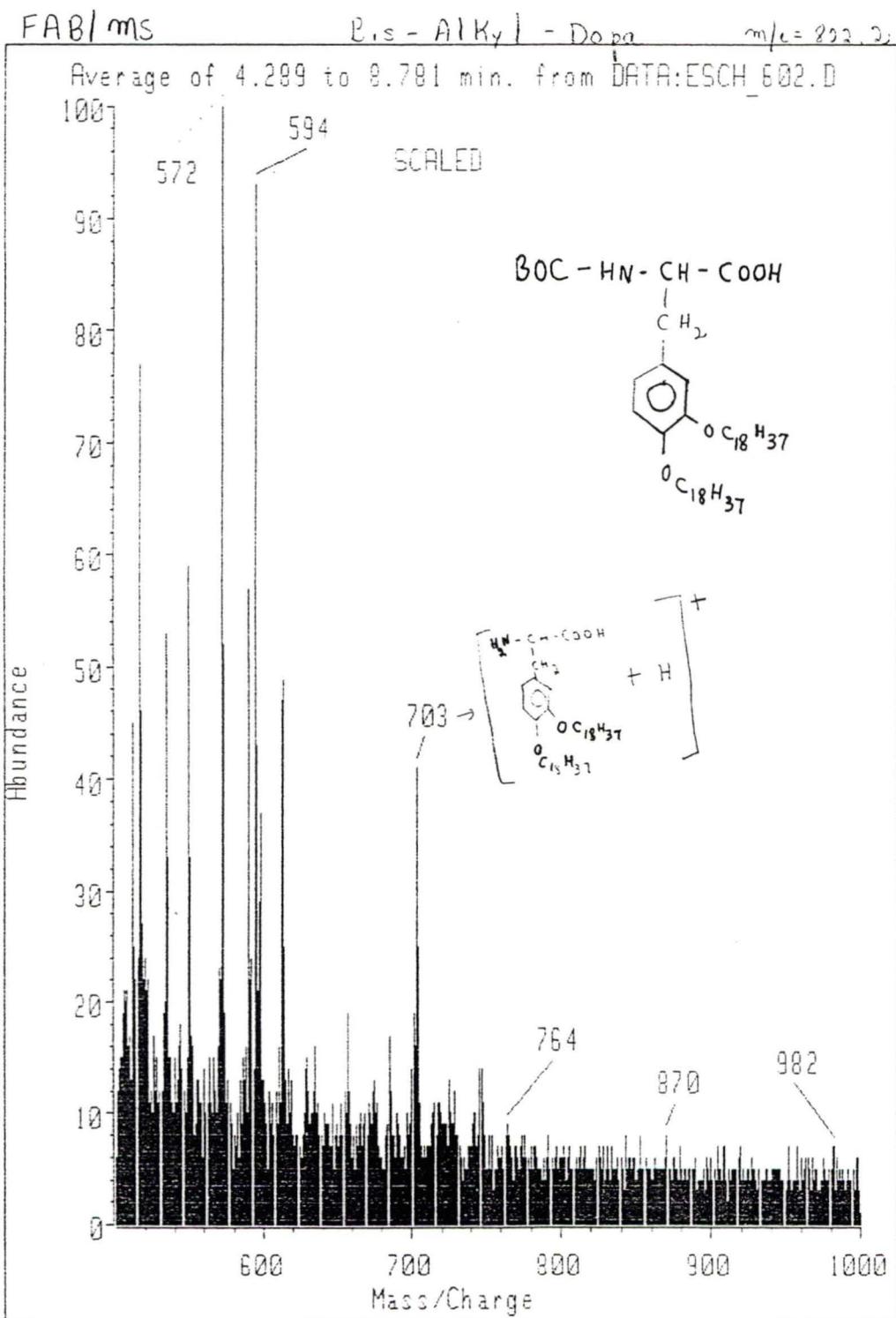
Young, C.R. et Atassi, M.A. (1985). T-cell dependency of the antibody response to free small synthetic peptides of a protein: demonstration with an antigenic site of myoglobin. Immunol. Invest. 14 : 1-5.

Zelezna, B., Richards, E.R., Tang, W., Lu, D., Sumners, C. and Raizada, M.K. (1992). Characterization of a polyclonal anti-peptide antibody to the angiotensin II type-1 (AT<sub>1</sub>) receptor. Biochem. Biophys. Res. Comm. 183 : 781-788.

Ziegelmaier, R. (1988). Agent for immunological diagnosis and a process for its preparation. Canadian Patent no 1 187 786.

**ANNEXE 1: Spectre de masse du boc-bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-dopa**

Matrice: Appliquée <sup>tu</sup><sub>guil</sub>



## **ANNEXE 2: Méthode de coloration des liens peptidiques amides sur plaques chromatographiques**

La plaque de CCM a été vaporisée avec de l'hypochlorite de sodium 5% (eau de javel), et asséchée avec un flot d'air frais (séchoir électrique) pendant au moins une heure. Pour faciliter l'évaporation de l'eau de javel, après 10-15 min. de séchage, la plaque a aussi été vaporisée avec de l'acide acétique 100% puis sécher de nouveau à l'air frais. Enfin, la plaque a été vaporisée une dernière fois avec la solution B dont la composition est la suivante:

**Solution B: Mélange de solution C et solution D + 1.5ml de solution E**

**Solution C: 4,4' Tétraméthyl-diamino-diphénylméthane  
2.5 g/10  $\mu$ l ACOH 100% + 50 ml d'eau distillée.  
Filtrer le précipité.**

**Solution D: 5 g d'iodure de potassium (KI) dans 10 ml d'eau distillée**

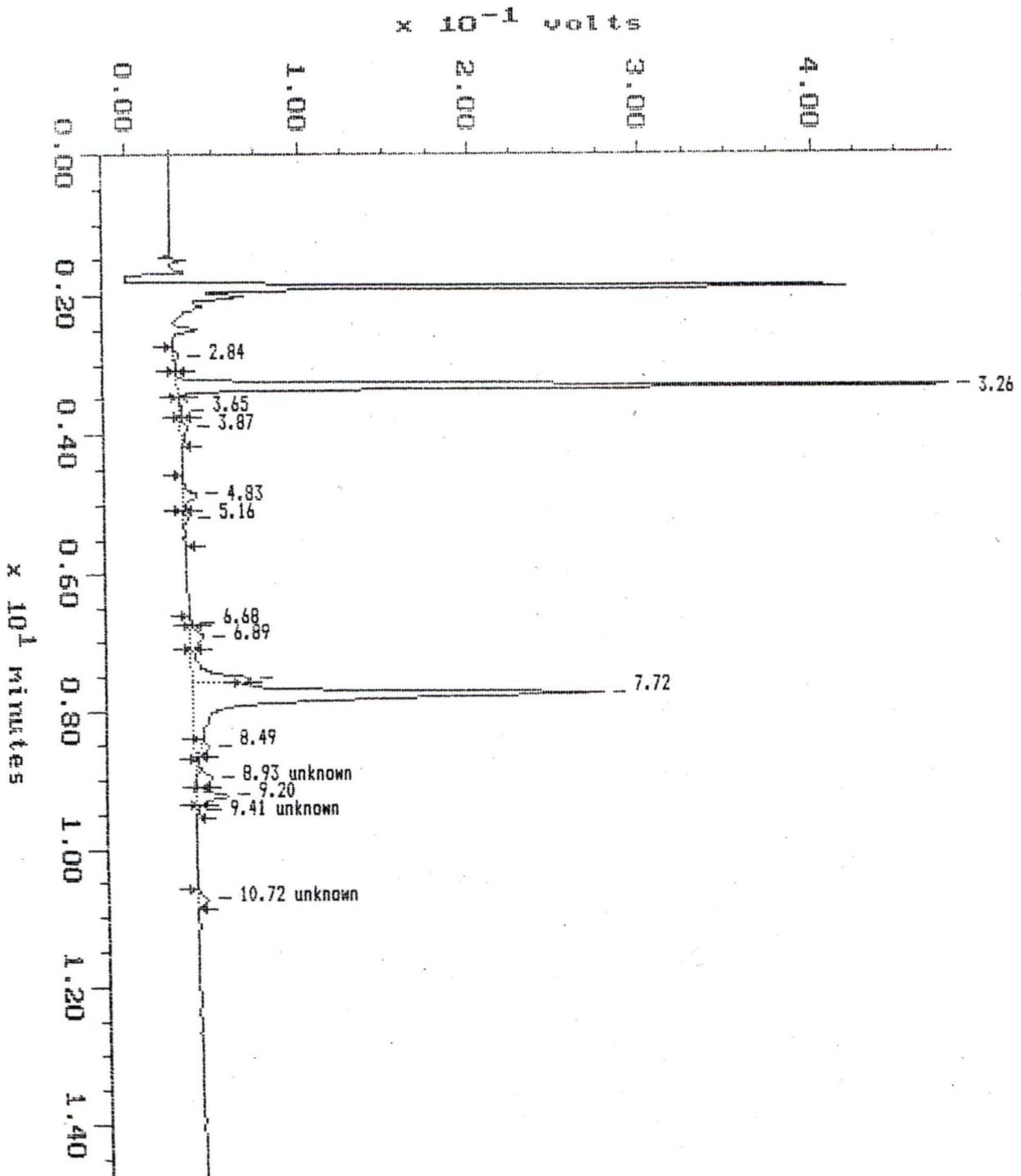
**Solution E: 0.3 g de ninhydrine dans 100 ml d'AcOH 10% dans l'eau**

**ANNEXE 3: Analyse HPLC du peptide Sch avant purification (brut)**

Sample: roger4  
Acquired: 12-NOV-90 14:59  
Inj Vol: 30.00

Channel: M441 UV/Vis  
Method: C:\MAX\DATA1\TEST1

Filename: roger4  
Operator: RB

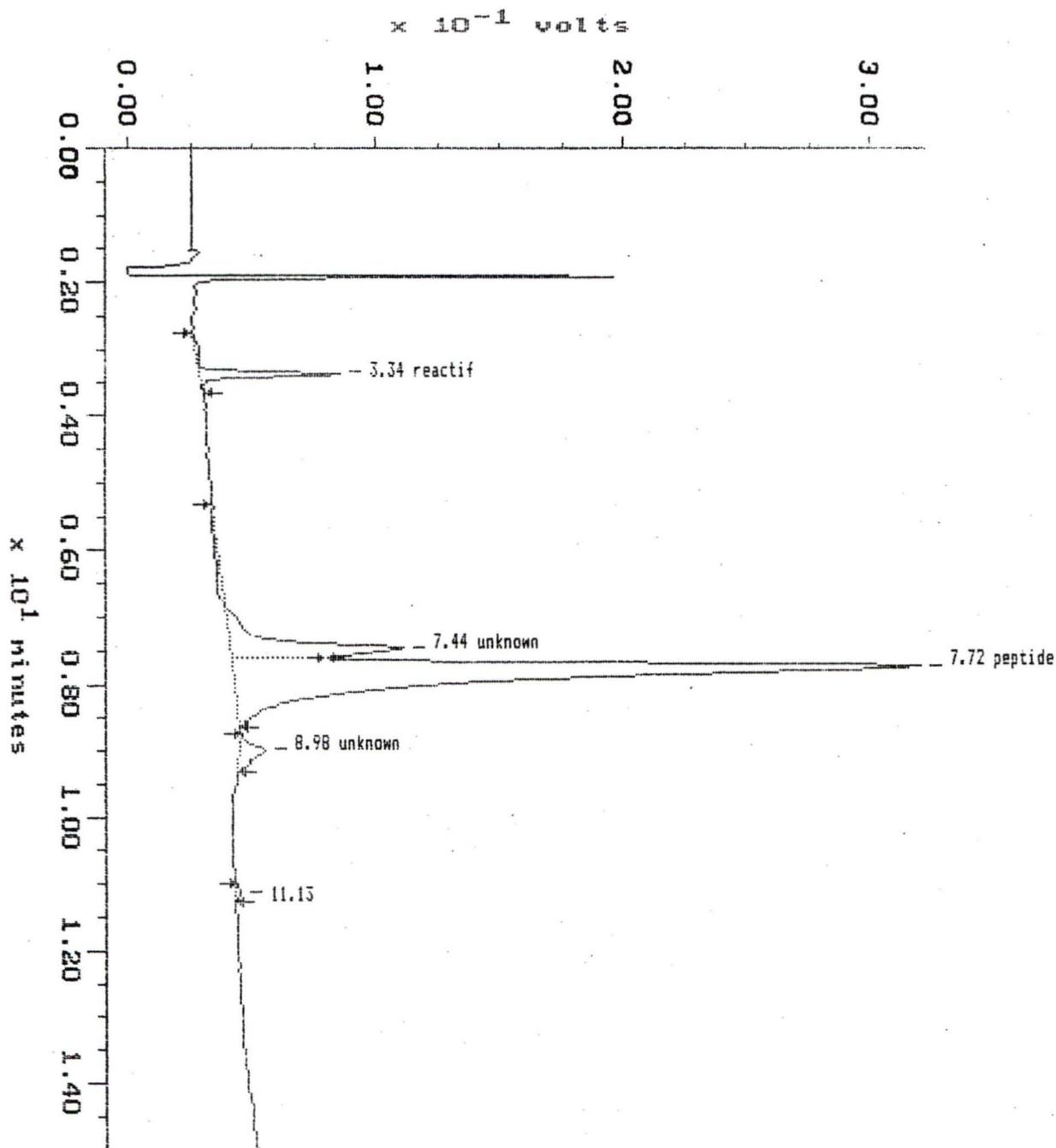


# ANNEXE 4: Analyse HPLC du peptide Sch après purification

Sample: pierre3  
Acquired: 13-NOV-90 14:11  
Inj Vol: 30.00

Channel: M441 UV/Vis  
Method: C:\MAX\DATA1\PIERRE

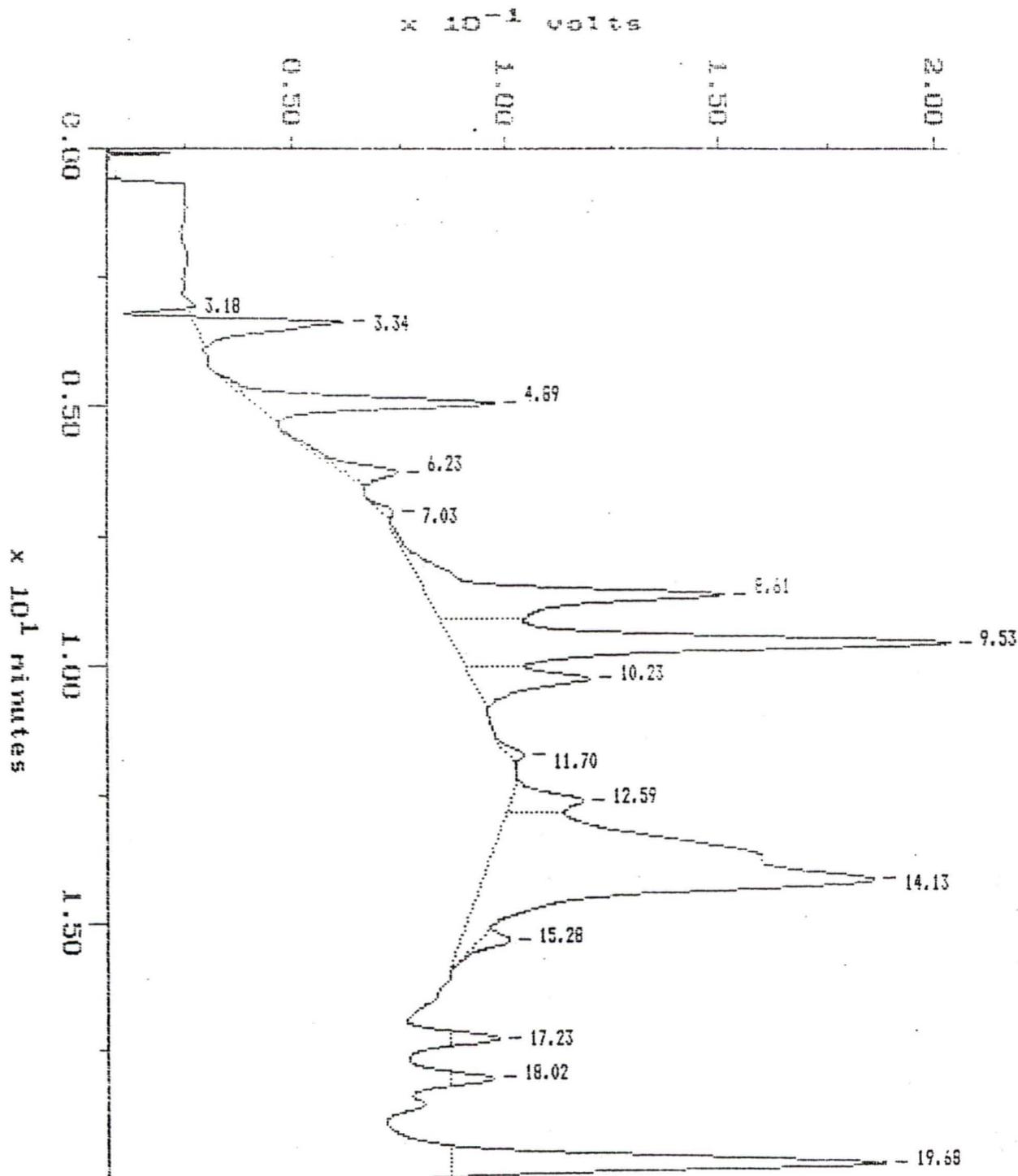
Filename: pierre3  
Operator:



**ANNEXE 5: Analyse HPLC du peptide [bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-dopa<sup>18</sup>]Sch avant purification (brut)**

Sample: SCH-3  
Accepted: 29-NOV-90 11:49  
Channel: M441 UV/Vis  
Method: C:\MAX\DATA1\PIERRE

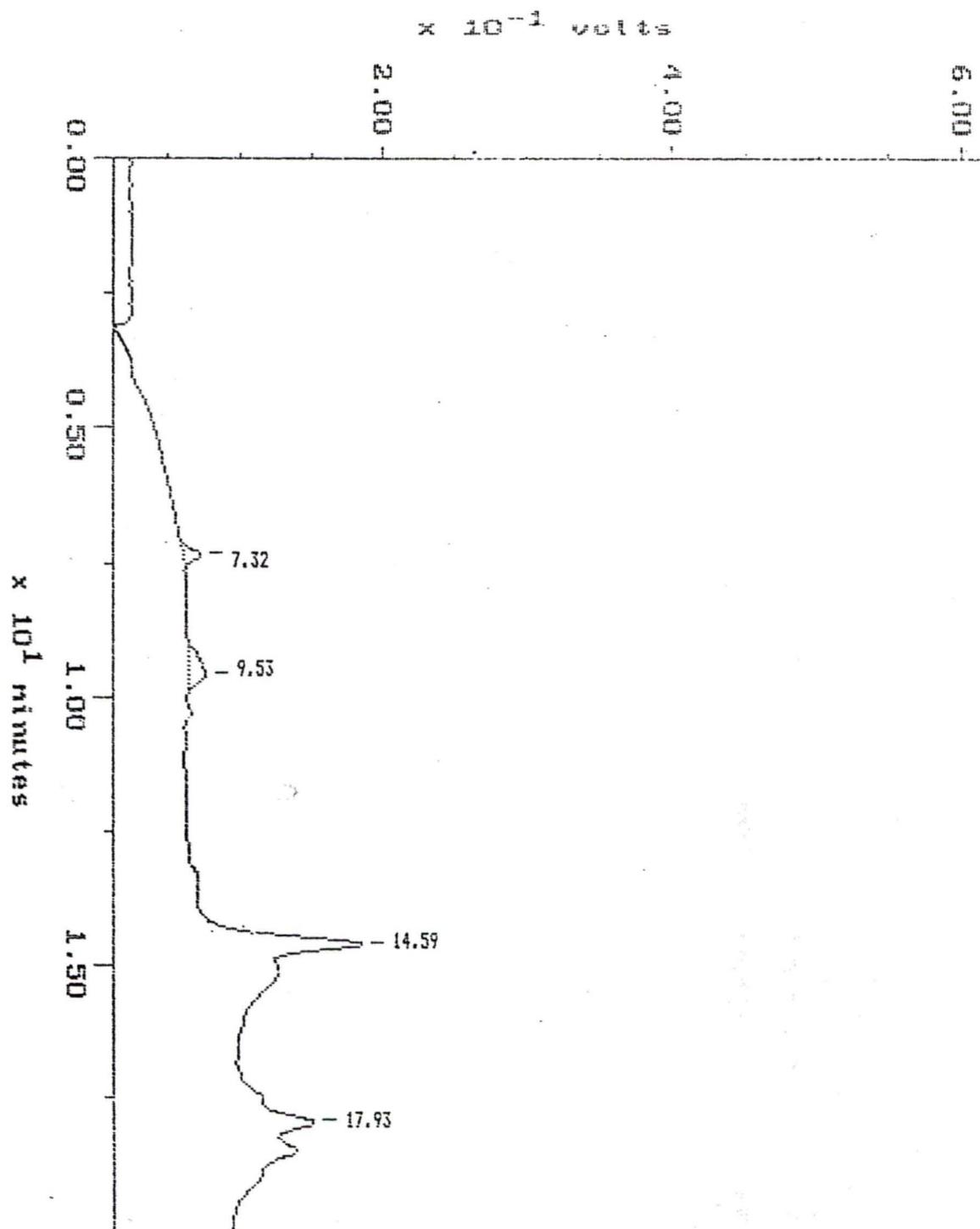
Filename: SCH3  
Operator:



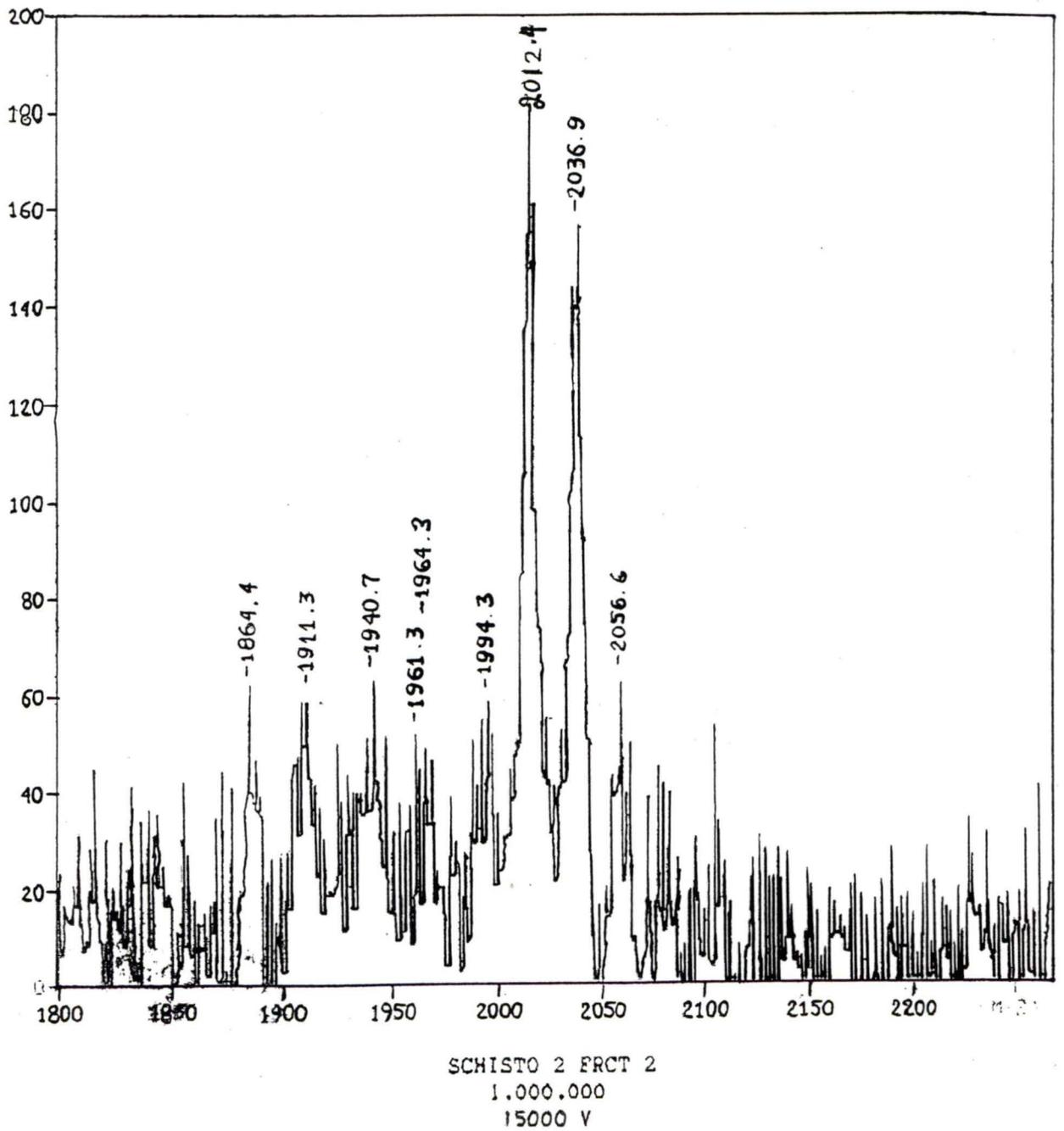
**ANNEXE 6: Analyse HPLC du peptide [bis-O<sub>1</sub>O-octadécyl-dopa<sup>1 8</sup>]Sch après purification**

Sample: SCH3-625-T18 Channel: Waters 441  
Acquired: 11-DEC-90 8:32 Method: C:\MAX\DATA1\ROGER

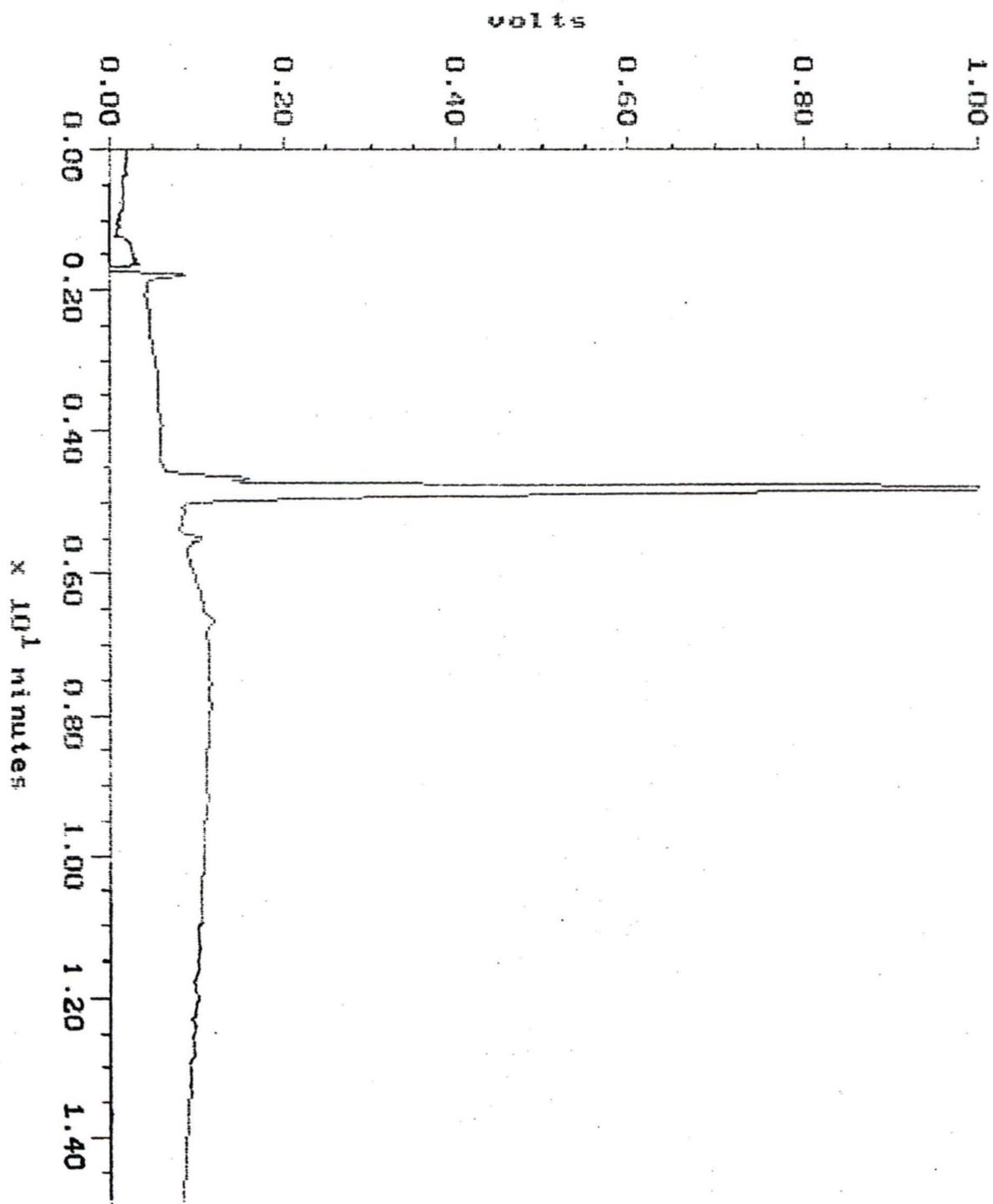
Filename: SC32518  
Operator: Rog



**ANNEXE 7: Spectre de masse (bombardement au californium)  
du peptide Sch**



**ANNEXE 8: Analyse HPLC du peptide CGRP 30-37**

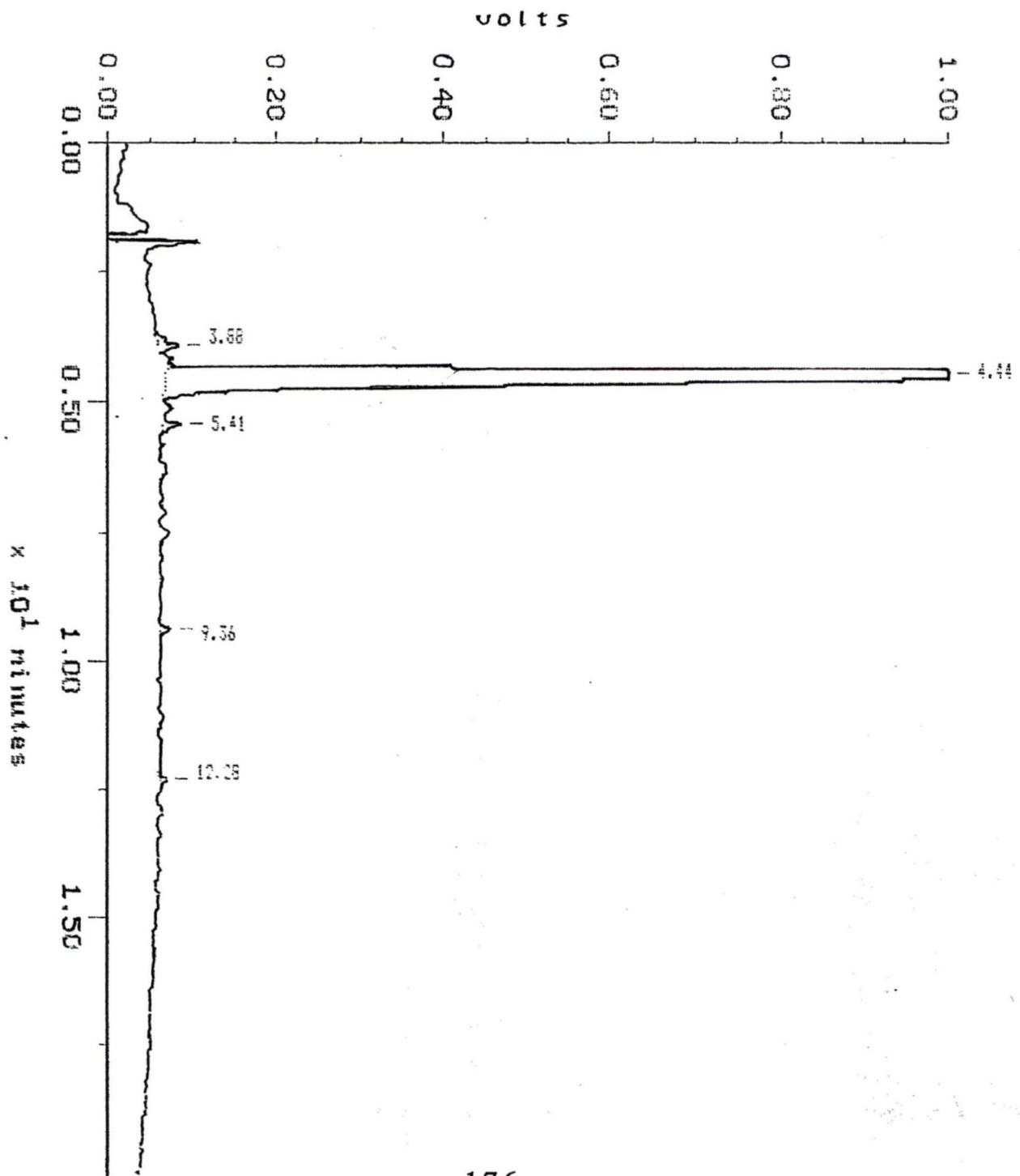


**ANNEXE 9: Analyse HPLC du peptide CGRP 32-37**

Sample: CGRP-pure  
Acquired: 11-JUL-91 11:02

Channel: Waters 441  
Method: C:\MAY\DATA\1\ROGER

Filename: 1106p  
Operator:

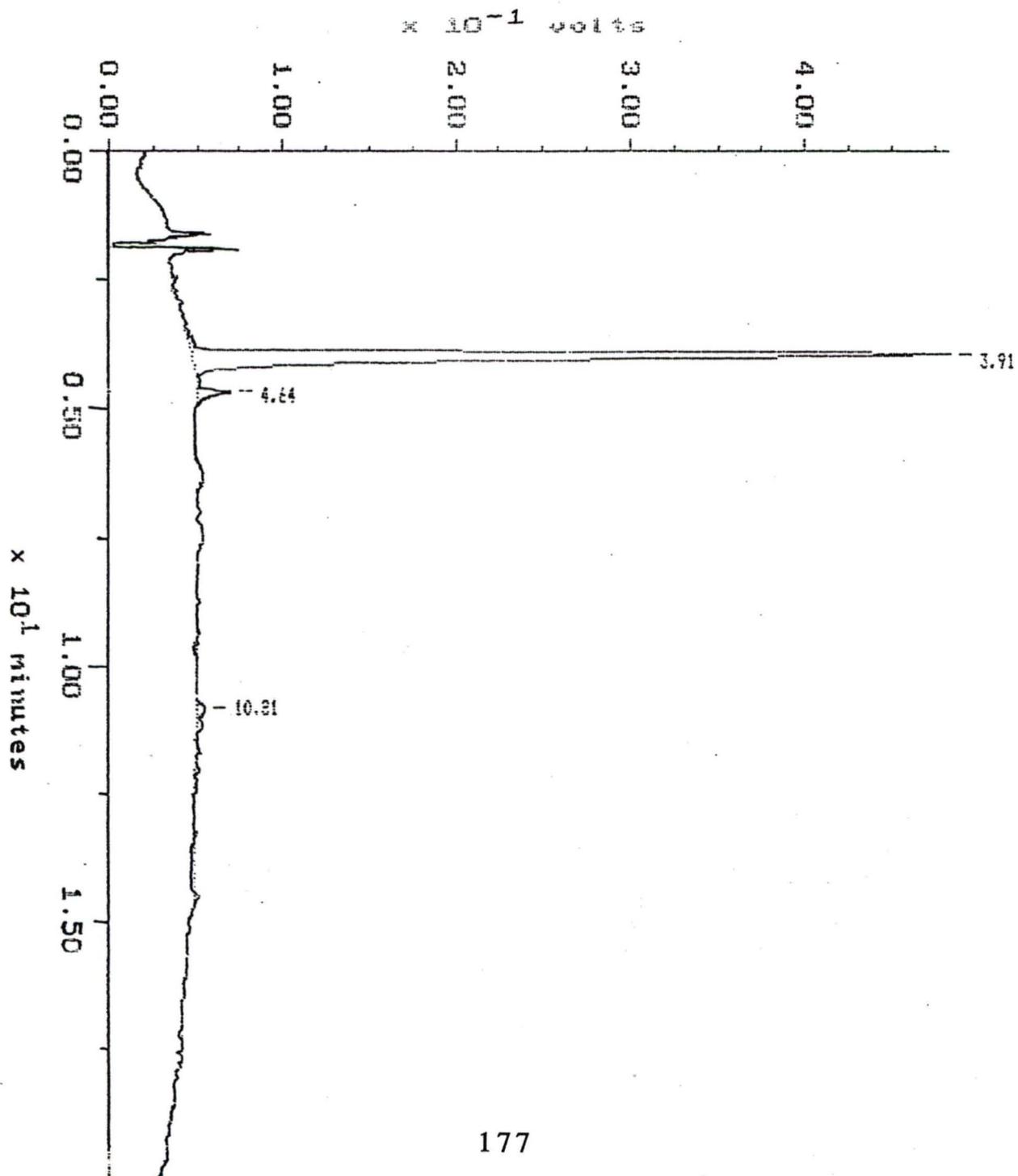


**ANNEXE 10: Analyse HPLC du peptide CGRP 34-37**

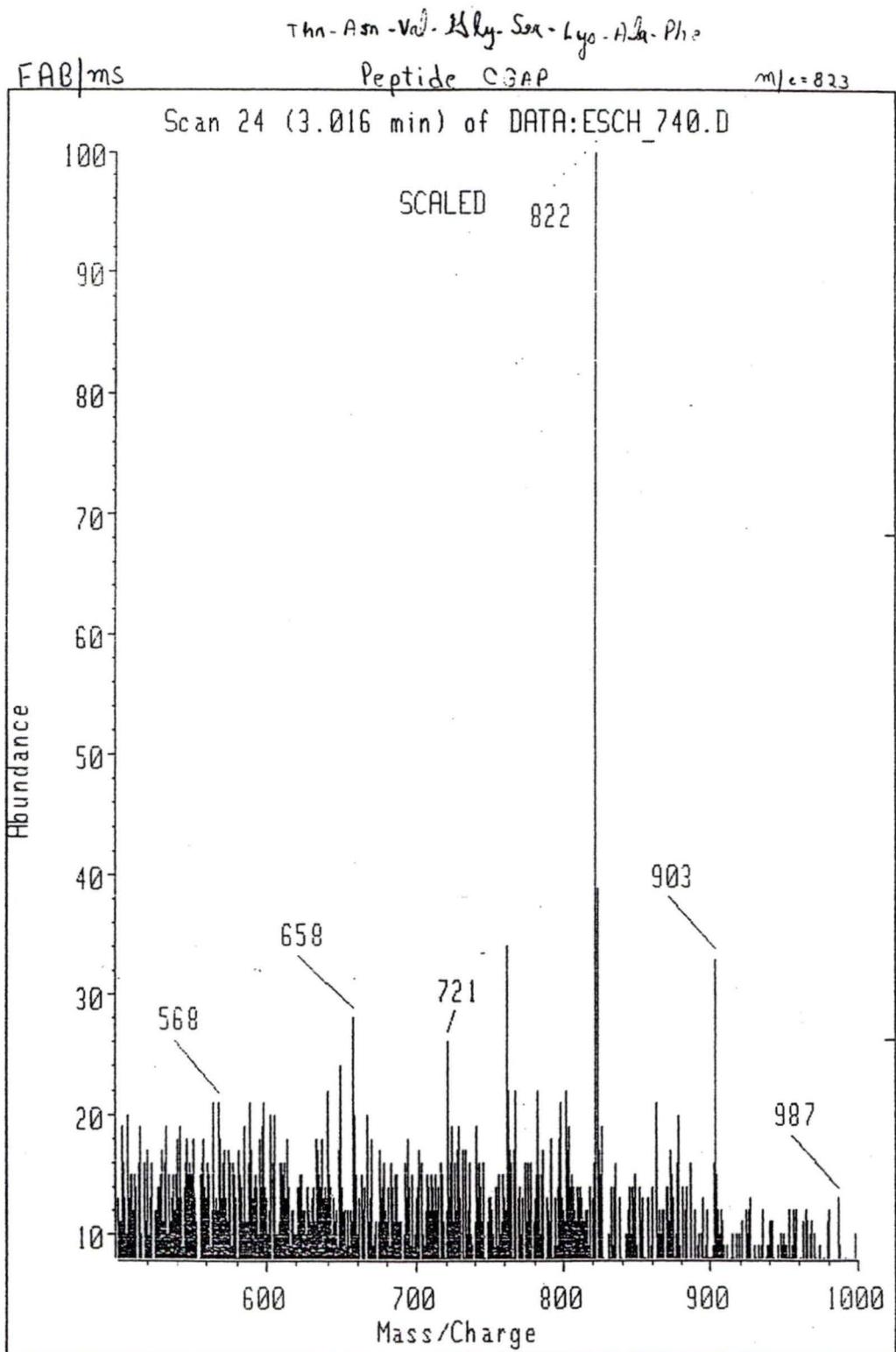
Sample: *cgrp4s-4*  
Acquired: 07-JUL-91 15:02

Channel: Waters 441  
Method: C:\MAXDATA\KROGER

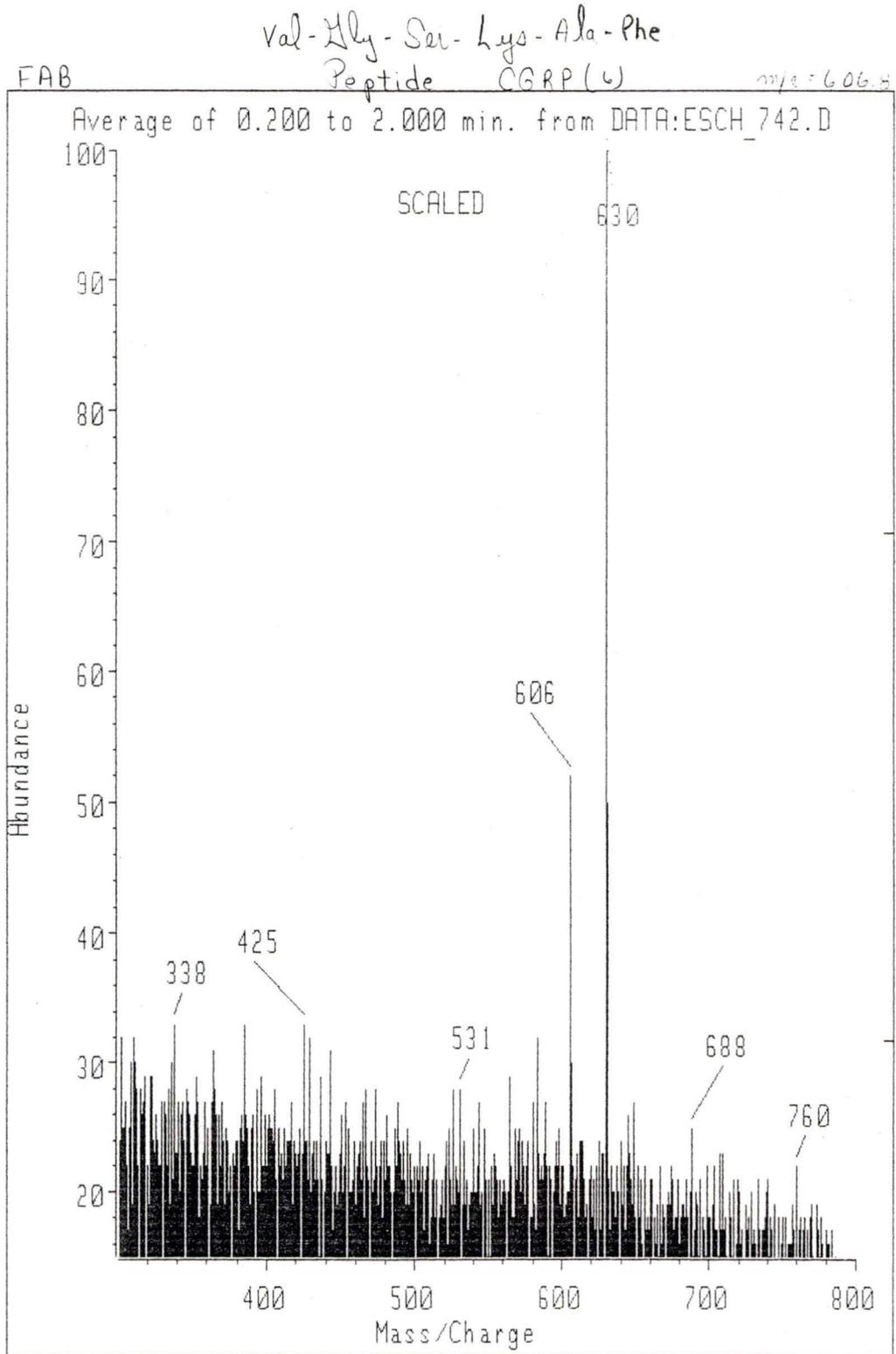
Filename: c:\p04  
Operator:



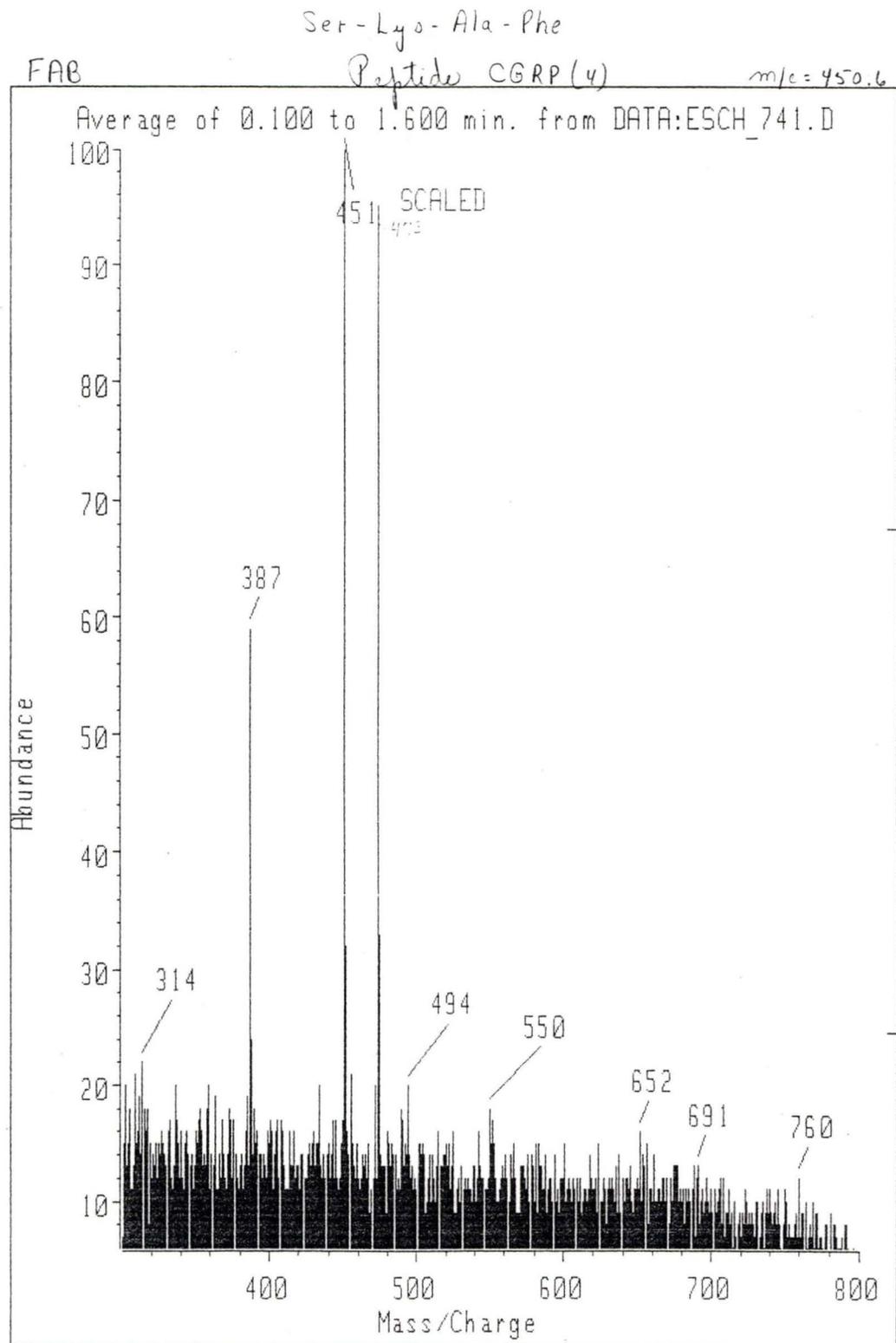
**ANNEXE 11: Spectre de masse du peptide CGRP 30-37**



**ANNEXE 12: Spectre de masse du peptide CGRP 32-37**



**ANNEXE 13: Spectre de masse du peptide CGRP 34-37**

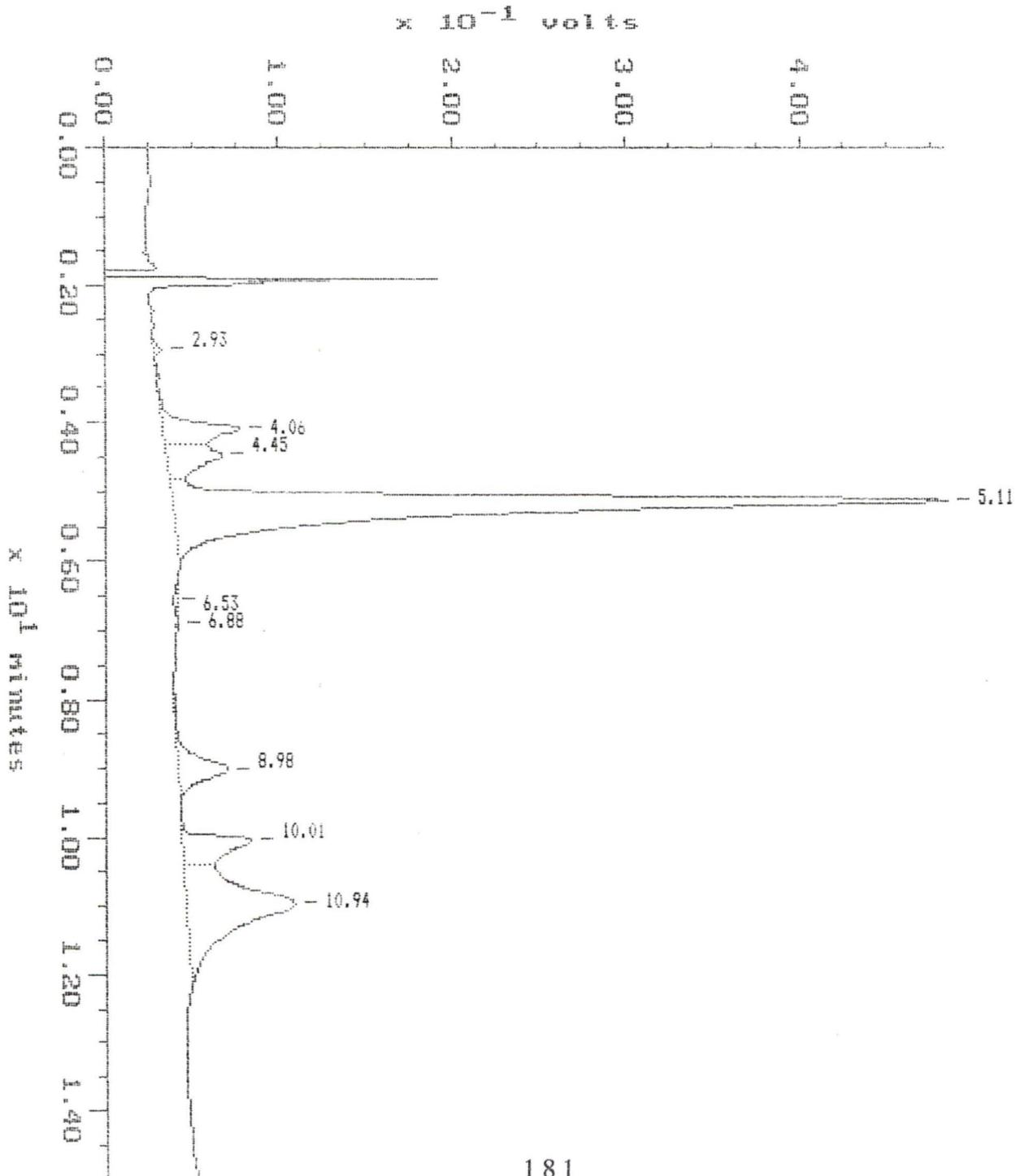


**ANNEXE 14: Analyse HPLC du peptide [Sar<sup>1</sup>,Aca<sup>8</sup>,  
Lys<sup>9,10,11</sup>]Ang II avant purification (brut)**

Sample: AT-ACA-BRUT  
Acquired: 14-NOV-90 11:14

Channel: M441 UV/Vis  
Method: C:\MAX\DATA1\PIERRE

Filename: ATACABRT  
Operator:

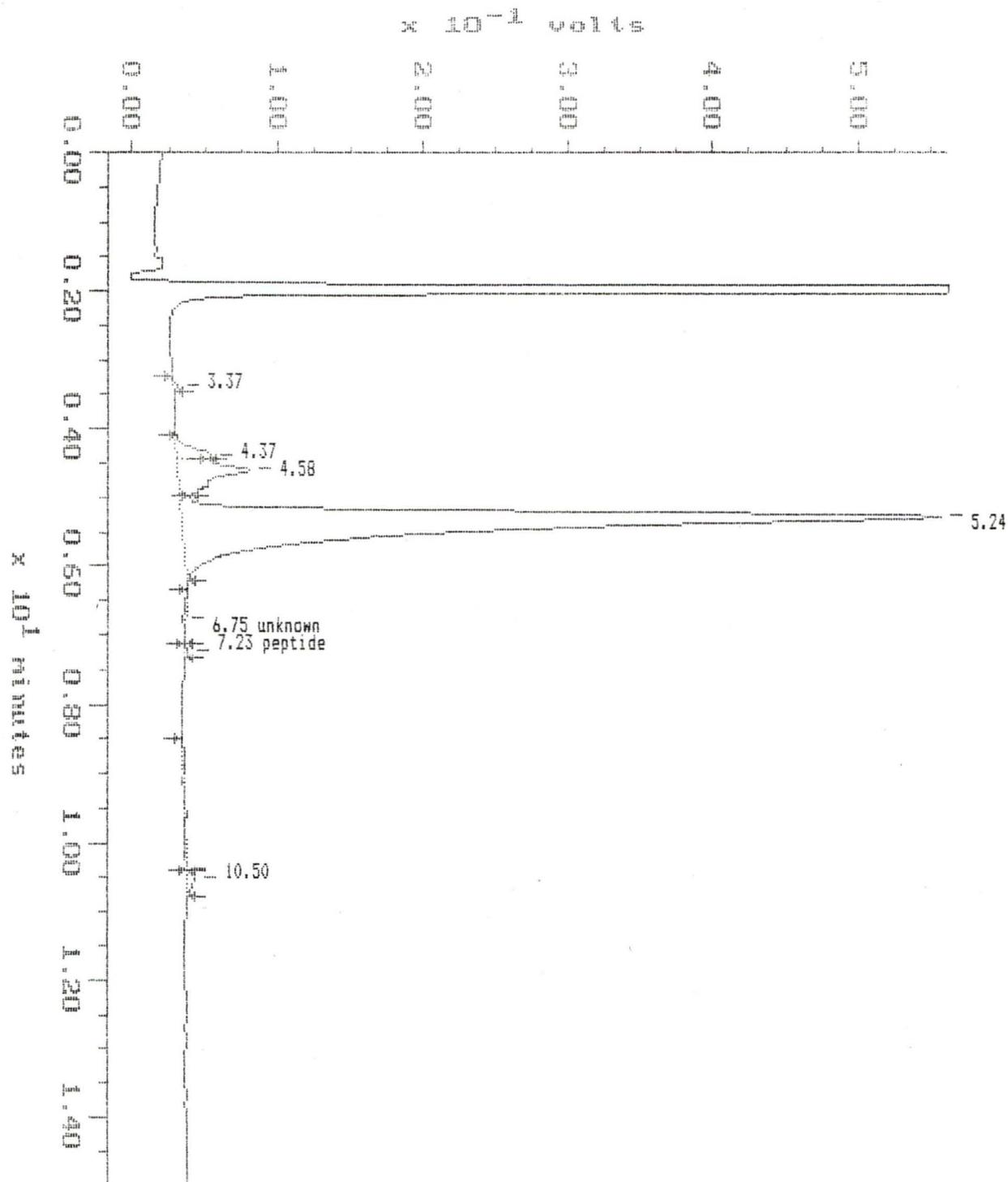


**ANNEXE 15: Analyse HPLC du peptide [Sar<sup>1</sup>,Aca<sup>8</sup>,  
Lys<sup>9,10,11</sup>]Ang II après purification**

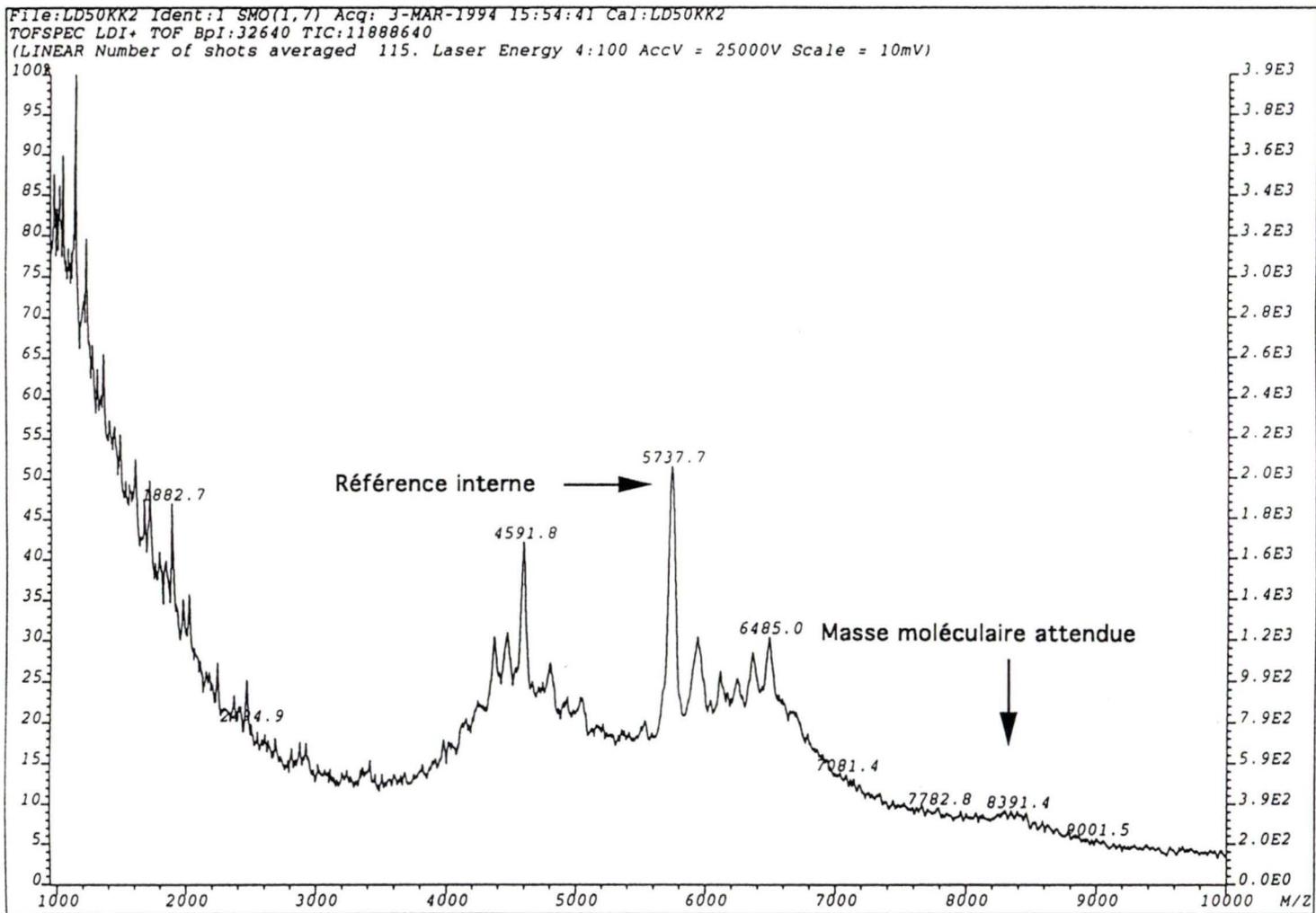
Sample: AT-ACA-T22  
Acquired: 14-NOV-90 13:41  
Inj Vol: 30.00

Channel: M441 UV/Vis  
Method: C:\MAX\DATA1\PIERRE

Filename: ATACAT22  
Operator:



**ANNEXE 16: Spectre de masse du peptide Sch-tétramère**



ANNEXE 17: Spectre de masse d'un peptide Ang II-octamère

