

**UNIVERSITE DU QUEBEC**

**MEMOIRE PRESENTE A  
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
A LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE**

**PAR  
ANDREE FORTIN**

**EFFET D'ESTERS DE SUCRE  
SUR LA POTENTIATION DE LA REPONSE  
HUMORALE PAR LES LIPOSOMES**

**JUIN 1991**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

**Il n'y a que trois façons d'acquérir la  
connaissance: l'étude, le raisonnement  
et l'expérience .....**

## **RESUME**

Les liposomes sont depuis longtemps reconnus comme puissants adjuvants de la réponse immune bien que les mécanismes à la base de cette immunostimulation demeurent toujours mal connus. Dans la plupart des études, le ciblage rapide, par l'intermédiaire du véhicule liposomal, de l'antigène aux cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial, initiatrices importantes de la réponse immune spécifique, est considéré comme l'élément déterminant du pouvoir adjuvant. Cependant, l'observation que les réponses induites par un même antigène diffèrent selon son mode d'association avec le liposome (i.e. encapsulation ou association en surface) suggère que des mécanismes différents sont impliqués dans les deux situations, mécanismes qui reflètent possiblement la nature différente de la cellule d'initiation activée par les deux formes liposomales de l'antigène. En effet, si l'antigène encapsulé peut être exclusivement pris en charge par les macrophages du système réticulo-endothélial, d'autres types d'interactions cellulaires sont accessibles à l'antigène ancré, notamment une interaction avec les lymphocytes B via le récepteur spécifique que constitue l'immunoglobuline de surface.

Afin de vérifier cette hypothèse et dans le but d'amplifier la stimulation induite par l'antigène liposomal, nous avons inclus dans la bicouche un dérivé lipidique mannosylé, ligand spécifique d'un récepteur macrophagique exclusif. Cette stratégie avait comme but d'augmenter la vitesse de prise en charge des liposomes par les macrophages et ce faisant, de diminuer la contribution de toute autre voie d'activation, accessible principalement à l'antigène ancré.

L'étude a été faite sur un système modèle constitué d'un antigène soluble, l'albumine bovine sérique, soit encapsulé soit ancré à la surface des liposomes de composition lipidique classique, en présence ou non de dérivés glycosylés de l'acide palmitique. Les deux dérivés utilisés ont été le dérivé mannose contenant le ligand spécifique du récepteur macrophagique et le dérivé sucrose, apparenté mais non efficace quant à la formation d'une interaction privilégiée avec le récepteur macrophagique membranaire. L'étude a porté à la fois sur l'intensité, la qualité et la durée de la réponse induite et ce, tant en réponse primaire que suite à une restimulation avec le même antigène.

Nos résultats ont démontré que l'inclusion d'un dérivé mannosylé influence de façon marquée la réponse induite par l'antigène encapsulé mais n'affecte pas la réponse induite par l'antigène ancré. Dans les deux cas, l'ajout du dérivé sucrose est sans effet sur la réponse induite. L'effet observé se manifeste non pas par une augmentation de l'intensité de la réponse mais par une diminution de cette intensité accompagnée cependant d'une prolongation du temps de réponse sans altération du profil d'immunoglobulines synthétisées. L'absence d'effet sur la réponse induite par l'antigène ancré a été attribuée à l'inaccessibilité du mannose, camouflé par la présence de la protéine ancrée à la surface liposomale.

Ces résultats suggèrent que le ciblage rapide de l'antigène vers les cellules de présentation n'est pas l'unique facteur impliqué dans la potentiation de la réponse immune telle qu'induite par les liposomes et montrent que, dans la mise au point d'un bon adjuvant, l'ensemble des processus mis en branle par l'antigène doit être pris en considération.

## **REMERCIEMENTS**

C'est avec plaisir et fierté que j'ai poursuivi mes études de Maîtrise sous la direction du Dr Hélène-Marie Thérien, auprès de laquelle mon intérêt pour la recherche n'a pu que devenir plus grand. SINCERE MERCI.

Je tiens aussi à remercier Eliane Shahum, Hélène Rocheleau ainsi que Fadel Chbihna pour leur soutien et leurs commentaires toujours enrichissants.

Enfin, un merci tout spécial à un ami sincère pour ses encouragements précieux.

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **ET**

## **GRAPHIQUES**

<b>Tableaux:</b>	<b>Page</b>
1. Résultats de l'analyse élémentaire (par combustion) des esters de sucrose et de mannose synthétisés .....	59
2. Caractéristiques des différentes préparations liposomales avec ester de mannose utilisées pour la première stimulation .....	69
3. Caractéristiques des différentes préparations liposomales avec ester de mannose utilisées pour la seconde stimulation .....	70
4. Niveaux de signification de la différence entre la réponse obtenue à chaque concentration (%) d'ester de mannose et la réponse obtenue en absence d'ester, avec l'antigène encapsulé .....	85

### **Graphiques :**

1. Spectre RMN du palmitoyl sucrose monosubstitué ( $C_{28}H_{51}O_{12}$ ) .....	61
2. Spectre infra-rouge du palmitoyl sucrose monosubstitué ( $C_{28}H_{51}O_{12}$ ) ....	62
3. Spectre RMN du palmitoyl mannose monosubstitué ( $C_{22}H_{42}O_7$ ) .....	64
4. Spectre infra-rouge du palmitoyl mannose monosubstitué ( $C_{22}H_{42}O_7$ ) ...	65
5. Courbe standard d'encapsulation .....	66
6. Courbe standard d'ancrage .....	68
7. Production d'immunoglobulines totales induite par différentes formu- lations antigéniques (BSA libre+liposomes; BSA encapsulée; BSA liée	

en surface, en fonction du temps suivant l'immunisation .....	72
8. Effet de la BSA libre et associée aux liposomes (encapsulation & ancrage) sur le titre en anticorps totaux, en réponse primaire (jour 10) et secondaire (jour 10) .....	75
9. Effet des esters de sucrose et de mannose au jour dix suivant la première stimulation sur le titre en anticorps totaux, en réponse à la BSA encapsulée .....	76
10. Effet des esters de sucrose et de mannose au jour dix suivant la première stimulation sur le titre en anticorps totaux, en réponse à la BSA ancrée .....	78
11. Effet de la concentration en ester de sucrose sur les titres en IgG, IgG1, IgG2a et IgG3 en réponse primaire .....	79
12. Effet de la concentration en ester de mannose sur les titres en IgG & IgM en réponse primaire .....	81
13. Effet de la concentration en ester de mannose sur les titres en IgG & IgM en réponse secondaire .....	82
14. Effet de la concentration en ester de mannose sur les titres en IgG1, IgG2a et IgG3 en réponse secondaire .....	83
15. Effet de la concentration en ester de mannose sur la durée de la réponse primaire induite par la BSA encapsulée .....	87
16. Effet de la concentration en ester de mannose sur la durée de la réponse secondaire induite par la BSA encapsulée .....	88
17. Effet de la concentration en ester de mannose sur la durée de la réponse primaire induite par la BSA ancrée .....	89
18. Effet de la concentration en ester de mannose sur la durée de la réponse secondaire induite par la BSA ancrée .....	90



19. Effet de la concentration en ester de sucrose sur la durée de la réponse primaire induite par la BSA encapsulée .....	92
20. Effet de la concentration en ester de sucrose sur la durée de la réponse secondaire induite par la BSA encapsulée .....	93

## **LISTE DES FIGURES**

vii

<b>Figure :</b>	<b>Page</b>
1. Schéma général de la réponse immune .....	7
2. Réponse primaire .....	10
3. Intervalle d'immunisation .....	11
4. Comparaison réponse primaire & secondaire .....	11
5. Voies d'activation du système immunitaire .....	14
6. Schéma général d'une immunoglobuline .....	20
7. Représentation schématisée de (a) molécule de lipide; (b) vésicule multilamellaire; (c) vésicule unilamellaire .....	25
8. La lectinophagocytose d'un liposome par un macrophage via les sucres .....	32
9. Préparation des liposomes .....	44
10. Modification d'une protéine par le SPDP. Introduction de groupe 2-pyridyl disulfide dans une protéine non thiolée par aminolyse .....	46
11. Réduction spécifique des groupes 2-pyridyl disulfide liés à la protéine par le dithiothréitol (DTT) .....	48
12. Représentation schématisée de l'ancrage d'une protéine à un liposome .....	49
13. Structure de (a) l'ester de sucrose; (b) l'ester de mannose .....	51
14. Calendrier d'immunisation .....	53
15. Technique de la ponction cardiaque chez la souris .....	54
16. ELISA .....	57
17. Interactions des voies d'activation et de suppression .....	98

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>DMPC</b>	dimyristoylphosphatidylcholine
<b>DPPE</b>	dipalmitoylphosphatidyléthanolamine
<b>BSA</b>	albumine bovine sérique
<b>SPDP</b>	3-(2-pyridyldithio) propionic acid N-hydroxysuccinimide
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>DTP</b>	dithiopyridine
<b>PO<sub>4</sub></b>	phosphate inorganique
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)
<b>TLC</b>	"thin layer chromatography" ( chromatographie sur couche mince)
<b>iodo-GEN</b>	1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenyl-glycouril
<b>PBS</b>	tampon phosphate-saline
<b>ES</b>	ester de sucrose (palmitoyl sucrose)
<b>EM</b>	ester de mannose (palmitoyl mannose)
<b>HEPES</b>	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid
<b>TD</b>	thymo-dépendant
<b>TI</b>	thymo-indépendant
<b>CMH</b>	complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPAg</b>	cellule de présentation de l'antigène

## **LISTE DES PRODUITS UTILISES**

### **Principaux produits chimiques**

BSA(98-99%)	DTT
DMPC	ABTS
DPPE	D (+) - mannose ( 10 % $\beta$ , 88 % $\alpha$ )
Cholestérol (99 + %)	iodo-GEN
SPDP	

=> Tous ces produits ont été achetés chez Sigma Chemical Co., St-Louis, Mo.

L'iode radioactif (  $^{125}$  I ) (protein iodination grade) provient de DuPont Canada inc.

### **Antisérums polyclonaux**

- \* Anticorps de chèvre marqués à la peroxidase anti-Ig(G+M) de souris proviennent de Mandel Scientific Co. Ltd., Guelph, Ont.
- \* Anticorps de chèvre marqués à la peroxidase anti-IgM (Fc spécifique), anti-IgG (Fc spécifique), anti-IgG1, anti-IgG2a ou anti-IgG3 de souris sont obtenus de Nordic Immunology, Tilburg, Netherlands.

### **Animaux**

Les souris de type BALB/c ont été achetées de Charles River Canada Inc., St-Constant, Qc.

## **TABLE DES MATIERES**

<b>RESUME .....</b>	<b>i</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX &amp; GRAPHIQUES.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES PRODUITS UTILISES.....</b>	<b>ix</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>x</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE PREMIER.....</b>	<b>6</b>
1.1. La réponse immune humorale.....	6
1.1.1. Réponse humorale primaire .....	9
1.1.2. Réponse humorale secondaire .....	9
1.1.3. Voies d'activation du système immunitaire.....	12
1.2. Les cellules de présentation de l'antigène (CPAg) .....	15
1.2.1. Les macrophages .....	16
1.2.1.1. Leurs rôles principaux .....	16
1.2.1.2. Phagocytose, "processing" et présentation de l'antigène.....	17
1.2.1.3. Récepteurs de surface impliqués dans les diverses fonctions des macrophages .....	18

1.2.2. Les lymphocytes B en tant que CPAg .....	18
1.3. Les immunoglobulines et leur rôle physiologique .....	19
1.4. Les liposomes comme véhicule de l'antigène .....	23
1.4.1. Description générale .....	23
1.4.2. Liposomes et réponse immune .....	26
1.4.3. Influence du mode d'association de l'antigène aux liposomes sur la qualité de la réponse immune .....	27
1.5. Intensification de la reconnaissance liposome-macrophage .....	30
1.5.1. Lectines et glycolipides synthétiques .....	30
1.5.2. Le récepteur spécifique du mannose à la surface des macrophages .....	33
<b>CHAPITRE II-&gt; MATERIEL &amp; METHODES .....</b>	<b>37</b>
2.1. Méthodes .....	37
2.1.1. Préparation des constituants clés des liposomes .....	37
2.1.1.1. Synthèse régiosélective du palmitoyl sucrose mono- substitué ( $C_{28}H_{51}O_{12}$ ) .....	37
2.1.1.2. Synthèse régiosélective du palmitoyl mannose mono- substitué ( $C_{22}H_{42}O_7$ ) .....	39
2.1.1.3. Synthèse du DPPE-DTP .....	41
2.1.1.4. Iodination de la BSA .....	42
2.1.2. Association antigène-liposomes .....	42
2.1.2.1. Encapsulation .....	45
2.1.2.2. Liaison covalente ("ancrage") .....	45
2.1.2.3. Incorporation de l'ester de sucrose ou de mannose dans les liposomes .....	50
2.1.3. Dosage du phosphate inorganique .....	52

2.1.4. Immunisation des animaux et horaire des ponctions cardiaques.....	52
2.1.5. Détermination du titre en anticorps par ELISA .....	55
<b>CHAPITRE III -&gt; RESULTATS.....</b>	<b>58</b>
3.1. Esters et préparations liposomales.....	58
3.1.1. Evaluation de la pureté et de la structure des esters .....	58
3.1.2. Contrôle du taux d'association .....	63
3.1.3. Caractéristiques des liposomes injectés <i>in vivo</i> .....	67
3.2. Cinétique de la réponse humorale primaire.....	71
3.3. Impact des différentes préparations liposomales sur la production des immunoglobulines totales.....	74
3.3.1. BSA libre et BSA associée aux liposomes .....	74
3.3.2. BSA encapsulée avec ester de sucrose ou de mannose .....	74
3.3.3. BSA ancrée avec ester de sucrose ou de mannose .....	77
3.4. Impact des différentes préparations liposomales sur la production des isotypes d'immunoglobulines.....	80
3.5. Effet de l'ester de sucrose et de mannose sur la durée de la réponse humorale .....	86
<b>CHAPITRE IV -&gt; DISCUSSION &amp; CONCLUSIONS.....</b>	<b>94</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>102</b>

## **INTRODUCTION**

L'introduction d'une substance étrangère ou antigène dans l'organisme induit toute une série d'événements aussi bien spécifiques que non spécifiques de la substance introduite. L'ensemble de ces événements est appelé de façon globale "réponse immunitaire". Cette réponse immune est complexe, impliquant d'une part l'activation simultanée ou séquentielle de phénomènes cellulaires et d'autre part une collaboration étroite entre plusieurs cellules d'origine lymphoïde et myéloïde.

La première étape dans l'initiation d'une réponse immunitaire est la présentation de l'antigène aux cellules clés de l'activation du système : les T auxiliaires. Ce phénomène de présentation implique une internalisation de l'antigène par des cellules spécialisées dites cellules de présentation. L'internalisation est suivie d'un "processing" mot désignant un ensemble d'événements encore mal connus aboutissant à la dégradation de l'antigène ainsi qu'à l'expression de fragments antigéniques à la surface cellulaire en association avec des protéines fabriquées par l'organisme appelées produits de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). C'est ce complexe antigène / CMH qui se retrouve sous forme de réseau à la surface des cellules de présentation qui sera présenté au système immunitaire et plus particulièrement à un récepteur spécifique exprimé à la surface de lymphocytes T appartenant à la sous-population dite T auxiliaire (ou T helper). Ces T auxiliaires sont responsables de l'activation du système immunitaire en général et de l'actualisation d'une réponse ou défense soit humorale soit cellulaire.



Une réponse à caractère cellulaire est initiée par les lymphocytes T auxiliaires et médiée par les lymphocytes T effecteurs. La réponse humorale quant à elle, est médiée par les anticorps produits dans les fluides de l'organisme (plasma, lymphe) par les plasmocytes, cellules dérivées des lymphocytes B, eux aussi activés par les T auxiliaires ayant reconnu l'antigène. Dans les deux cas (cellulaire et humorale), une première activation contribue à la mise en place d'une mémoire immunologique qui permet à l'organisme de répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène inducteur.

Dans le cas de la réponse humorale, les anticorps produits par les plasmocytes, bien que toujours spécifiques de l'antigène, peuvent appartenir à différentes classes ou isotypes : A, G, D, M ou E. Ces classes diffèrent les unes des autres par leur capacité d'activer certains mécanismes effecteurs particuliers tels que phagocytose, activation du complément, activation des cellules K, des mastocytes, etc.

Ces deux types de réponse immune (cellulaire et humorale) sont donc initiés par les cellules de présentation de l'antigène. Ce terme englobe différentes populations cellulaires dont les plus importantes sont les macrophages et les lymphocytes B (Dal Monte, P. 1989). Ces deux types cellulaires, comme d'ailleurs toutes les cellules capables de présenter l'antigène, ont comme caractéristique commune d'exprimer à leur surface de façon constitutive une forte densité de produits de classe II du CMH. De plus, l'expression de ces produits de classe II peut être modulée de façon importante par certaines lymphokines libérées par les lymphocytes T auxiliaires activés.

Ces deux types cellulaires ont tous deux la capacité de dégrader l'antigène et de le réexprimer en surface en association avec les molécules de classe II du

CMH. Cependant, les macrophages et les lymphocytes B possèdent des mécanismes de prise en charge de l'antigène qui sont différents.

Les macrophages vont pour leur part s'approprier l'antigène en le phagocytant, via un récepteur membranaire non-spécifique. L'antigène est "enveloppé" par les prolongements cytoplasmiques du macrophage et englobé dans le cytoplasme à l'intérieur d'une vacuole appelée phagosome. La fusion du phagosome avec le lysosome permettra de créer un compartiment, le phagolysosome dans lequel l'antigène sera par la suite dégradé, associé aux produits du CMH et retourné à la surface. Les lymphocytes B, quant à eux, vont "reconnaître" l'antigène par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques analogues des anticorps sécrétés appelés immunoglobulines de surface. L'antigène lié à l'immunoglobuline est endocyté dans un endosome qui fusionne avec un lysosome pour donner un endolysosome où se produiront les événements de dégradation et d'association au CMH comme dans le phagolysosome. Cette différence dans le mécanisme de prise en charge rend possible l'existence de deux voies de présentation de l'antigène : une voie macrophage-dépendante et une voie B-dépendante. De plus, comme le mécanisme de prise en charge diffère entre les deux voies, ceci amène la possibilité qu'une voie pourrait devenir davantage accessible à un antigène dépendamment de sa structure.

Or, comme il est maintenant assez bien établi (Rouse, B.T. 1986 ; Walden, P. et al. 1986) que la réponse finalement induite dépend de la façon dont l'antigène entre en contact avec le système immunitaire, l'existence d'au moins deux voies de présentation distinctes ouvre donc la possibilité d'orienter la réponse finale de l'organisme à un antigène donné.

Les liposomes constituent un outil intéressant pour aborder la question de l'impact de la cellule de présentation sur la qualité et/ou l'intensité de la réponse humorale produite par l'organisme.

Les liposomes sont des vésicules membranaires fabriquées artificiellement et essentiellement composées de phospholipides de type naturel. Les liposomes sont non-toxiques, faiblement immunogéniques et de nombreuses substances peuvent y être associées soit par encapsulation dans la phase aqueuse, soit par ancrage à la surface liposomale (Gregoriadis, G. 1984 ). De plus, une fois injectés dans l'organisme, les liposomes sont à plus ou moins brève échéance, éliminés de la circulation par les cellules phagocytaires du système réticuloendothélial comprenant essentiellement les macrophages. Les liposomes sont déjà reconnus depuis un certain temps comme de puissants adjuvants de la réponse humorale (Beatty, J.D. 1984; Warren, H.S. 1986 ). Cependant, on constate dans les résultats publiés des différences importantes dans la réponse induite en dépendance du mode d'association de l'antigène (Shahum, E. & Thérien, H.-M. 1988). Ces différences pourraient résulter d'interactions privilégiées de l'antigène liposomal avec certaines populations de cellules de présentation. Si l'antigène encapsulé n'apparaît à priori qu'exclusivement accessible au macrophage, compte tenu du fait qu'il est masqué au système, il en va autrement de l'antigène ancré. En effet, au cours de son périple dans l'organisme, l'antigène ancré est susceptible d'interagir avec les immunoglobulines spécifiques présentes à la surface des lymphocytes B.

Il est certain cependant qu'*in vivo*, aucune de ces voies n'aura l'exclusivité puisque l'antigène ancré sera lui aussi, du moins en partie, éliminé de l'organisme

par les macrophages et puisque les fuites d'antigène encapsulé rendent possible l'activation d'une voie B-dépendante.

S'il semble difficile, voire impossible, de diriger l'antigène exclusivement vers l'une ou l'autre voie *in vivo*, il apparaît par contre possible d'amplifier la contribution d'une des deux voies supposées au détriment de l'autre et d'en mesurer l'impact sur la réponse induite.

C'était là l'objectif du travail présenté. La voie d'activation que nous avons voulu privilégier est la voie macrophage-dépendante et la stratégie utilisée consistait à inclure dans la membrane liposomale un ligand spécifique d'un récepteur macrophagique. Nous avons travaillé sur un système modèle utilisant des liposomes de composition reconnue pour leur stabilité en milieu organique et comme antigène modèle, l'albumine bovine sérique, soit encapsulée, soit ancrée à la surface liposomale.

## **CHAPITRE PREMIER**

### **1.1. La réponse immune humorale :**

Suivant la stimulation antigénique, il y a développement de réponses spécifiques tant cellulaire qu'humorale aboutissant entre autres à la production d'anticorps solubles de différentes classes et sous-classes. La division entre ces deux types de réponse immunitaire est plutôt artificielle, puisque la réponse humorale est elle-même un cas particulier de réponse cellulaire (Figure 1).

Dans le schéma général, l'antigène, internalisé par l'un ou l'autre type de cellule de présentation, incluant le macrophage et le lymphocyte B, est partiellement dégradé en fragments. Suite à cette dégradation effectuée par l'intermédiaire des enzymes lysosomiaux, les fragments d'antigène ou épitopes sont exprimés en surface en association avec les molécules de classe II du CMH. Les fragments exposés par les macrophages peuvent être différents des fragments exposés par les lymphocytes B, à cause du bagage différent d'enzymes présents dans chacun de ces deux types de CPAgs. C'est ce complexe Ag/CMH qui est présenté sous forme de réseau à une population de lymphocytes T, les lymphocytes T<sub>H</sub> et reconnu par un récepteur spécifique de ce complexe. Les lymphocytes T<sub>H</sub> une fois sensibilisés à l'antigène pourront initier les deux types d'immunité i.e. l'immunité cellulaire et l'immunité humorale. De façon générale, l'immunité cellulaire se manifeste par la mise en place des mécanismes effecteurs tels que la cytotoxicité, la suppression et l'hypersensibilité retardée médiés par d'autres populations de lymphocytes T incluant les T cytotoxiques, T suppresseurs et T auxiliaires respectivement. Ces lymphocytes doivent eux-

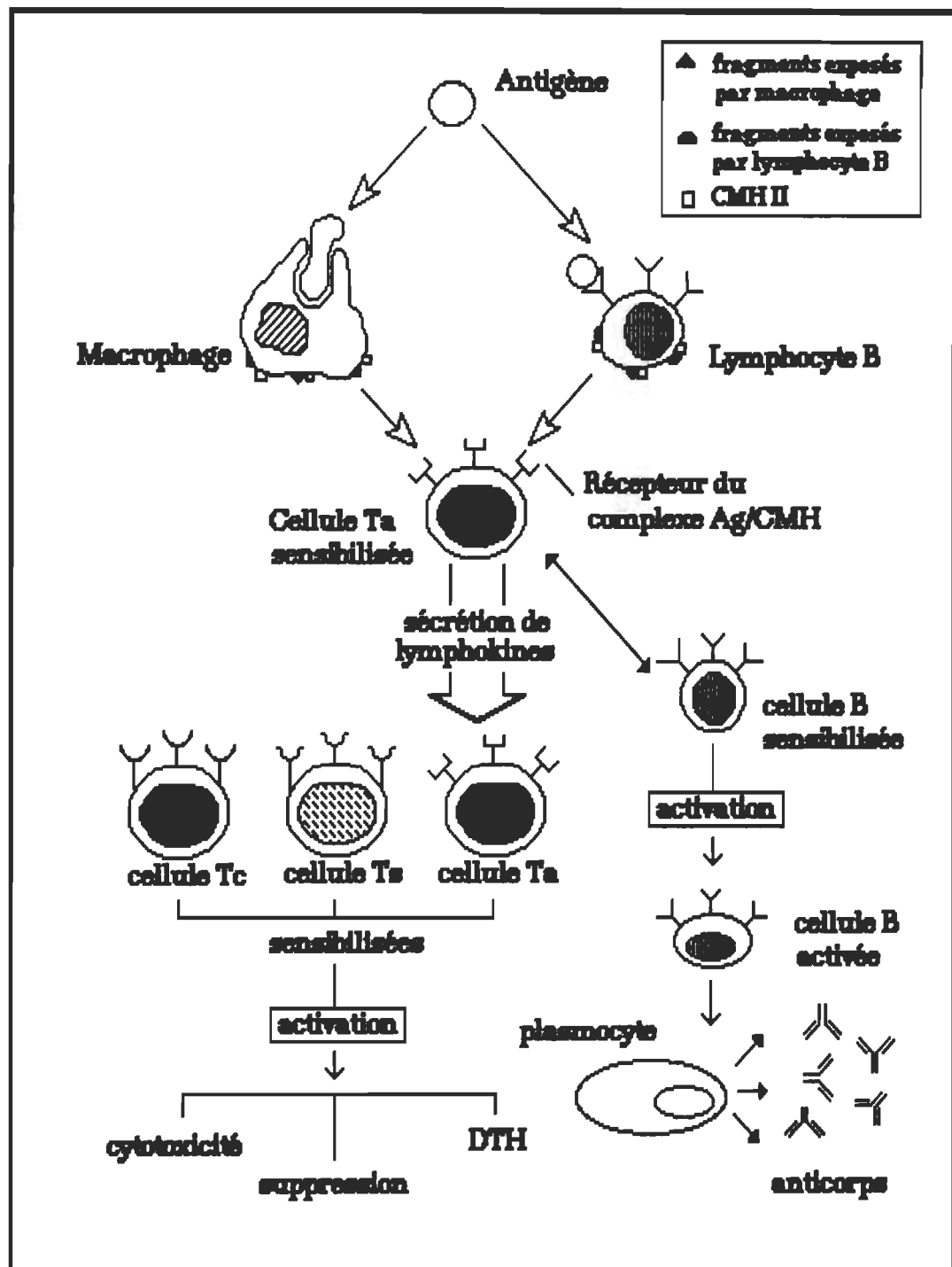


Figure 1 – Schéma général de la réponse immunitaire

mêmes avoir rencontré l'antigène pour répondre efficacement aux signaux d'activation donnés par les T auxiliaires sous la forme de facteurs solubles sécrétés dans le milieu appelés lymphokines.

L'immunité humorale, faisant l'objet de cette étude, est elle aussi initiée par les T auxiliaires. Elle implique l'activation d'une autre population lymphoïde, les lymphocytes B et aboutit à la production d'anticorps spécifiques de l'antigène. L'activation a comme prérequis la reconnaissance de l'antigène par le récepteur spécifique des lymphocytes B et peut se faire soit par contact direct avec les lymphocytes T auxiliaires (coopération cellulaire T/B), soit par l'intermédiaire des lymphokines. Les lymphocytes B activés sont ainsi en mesure de proliférer et de se transformer soit en cellules mémoires soit en plasmocytes ou cellules sécrétant les anticorps.

Cette séquence d'activation caractérise la réponse humorale induite par des antigènes (Van Rooijen, N. 1989) auxquels on réfère collectivement comme thymo-dépendants (TD). Ce sont les seuls antigènes capables d'induire une mémoire immunologique. Certains antigènes dits thymo-indépendants (TI), sont capables d'activer directement les lymphocytes B et d'induire la production d'anticorps; il s'agit souvent d'antigènes très polymérisés, ayant la capacité de se fixer de façon multivalente à la surface des lymphocytes B. La réponse qu'ils induisent est cependant primitive et ne présente pas les caractéristiques de maturation et de mémoire associées aux antigènes T-dépendants.

### **1.1.1. Réponse humorale primaire:**

La réponse humorale primaire est la réponse élaborée par l'organisme contre un antigène avec lequel il est en contact pour la première fois. Immédiatement après la stimulation antigénique, on observe une période de latence, durant laquelle aucune molécule d'anticorps ne peut être détectée. La durée de cette période est fonction de la voie d'administration (site d'injection) et surtout de la nature même de l'antigène. C'est au cours de cette phase de latence que s'effectueront la reconnaissance et la dégradation de l'antigène par les CPAGs (macrophage ou lymphocyte B), son "processing" ainsi que sa réexpression en surface pour fin de présentation aux cellules T auxiliaires.

Vient ensuite la phase de croissance du taux des anticorps. A ce stade, on constate souvent une variation de la classe d'immunoglobulines synthétisées en fonction du temps et une maturation de l'affinité des anticorps. Les IgM apparaissent d'abord dans le milieu, suivi des IgG. La synthèse se poursuit pendant un certain temps (phase de synthèse maximum) et les anticorps sont ensuite tranquillement éliminés de la circulation (phase de décroissance) (Figure 2).

### **1.1.2. Réponse humorale secondaire:**

La réponse humorale secondaire est observée lors de la réinjection du même antigène lorsque le taux d'anticorps circulants spécifiques contre cet antigène est redevenu quasi nul (Figure 3). Ce type de réponse s'observe surtout avec les antigènes protéiques. La réponse se caractérise par une période de latence beaucoup plus courte ainsi que par une phase de synthèse beaucoup plus importante. Le taux maximum d'anticorps est plus élevé, et la phase de décroissance est beaucoup



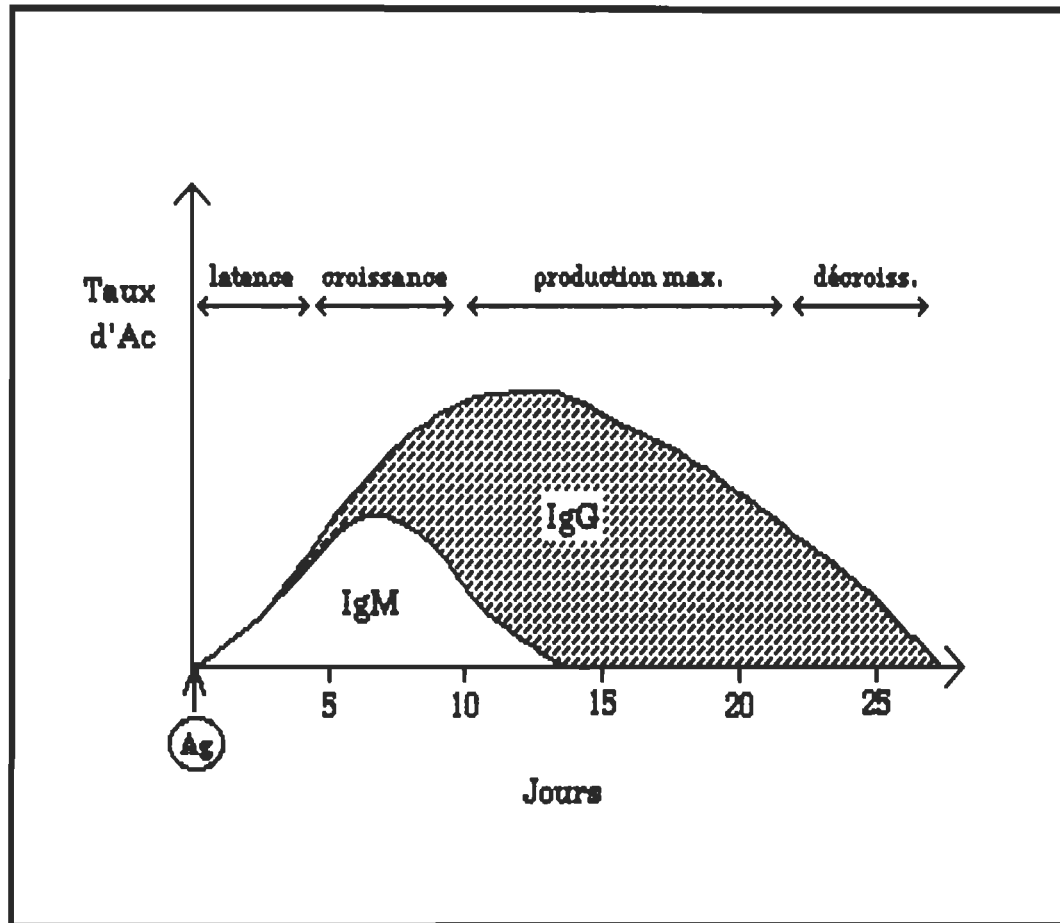


Figure 2 – Réponse primaire

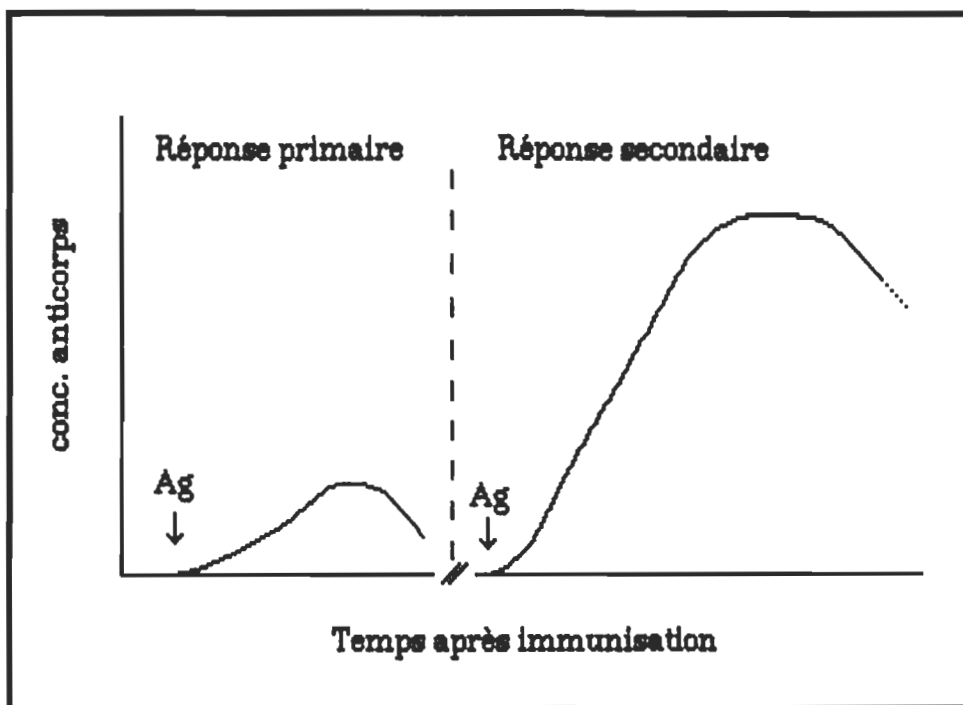


Figure 3 – Intervalle d'immunisation

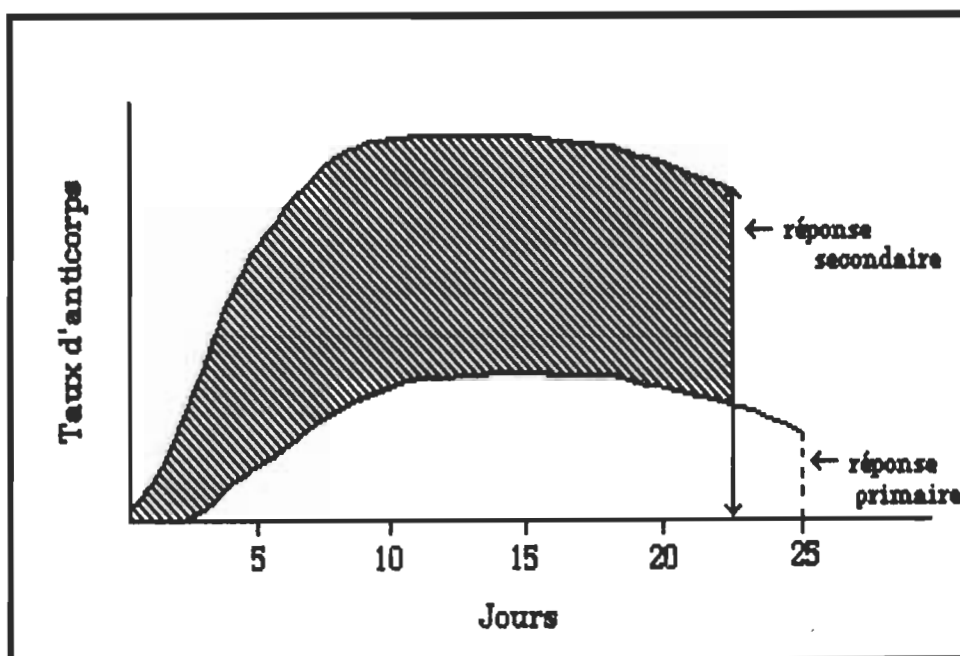


Figure 4 – Comparaison réponse primaire & secondaire

plus longue que lors de la réponse primaire. Enfin, l'affinité des anticorps pour l'antigène est plus grande, ceux-ci étant essentiellement de type IgG (Figure 4).

Les caractéristiques de cette réponse (période de latence brève, production accrue d'anticorps, etc.) reflètent la mise en place d'une mémoire immunologique. Ce type de réponse n'est observée que pour les antigènes T-dépendants. Pour les antigènes T-indépendants, la deuxième rencontre avec l'antigène n'est associée ni à une maturation des anticorps ni à une augmentation sensible de leur production.

En bref, il faut surtout mentionner que cette réponse humorale secondaire peut être vivement influencée par le moment exact auquel la seconde stimulation est apportée, et semble également être fortement influencée par la voie d'activation empruntée par l'antigène lors de l'initiation de la réponse, à la première rencontre. Cette influence peut se manifester tant au niveau du taux d'anticorps qu'au niveau de la distribution des différents types d'anticorps (profil d'immunoglobulines).

### **1.1.3. Voies d'activation du système immunitaire:**

Chez la souris, on a mis en évidence *in vitro* deux sous-populations de lymphocytes T auxiliaires impliqués dans l'activation de la réponse humorale les Ta1 et les Ta2. Chacune de ces populations sécrète préférentiellement certaines lymphokines qui influencent la nature de la réponse humorale induite particulièrement au niveau des classes d'immunoglobulines synthétisées. Les Ta1 favorisent la production d'IgG2a, d'IgG3 et d'IgM, tandis que les Ta2 pour leur part stimulent la production d'IgG1 et d'IgE. Cette production sélective d'immunoglobuline est reliée à la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par les Ta1, d'IL-4 et d'IL-5 par les Ta2 (Vitetta, E.S. 1987; Snapper, C.M., Paul, W.E. 1987). Comme l'IFN- $\gamma$  favorise l'expression du

CMH II à la surface des macrophages et l'IL-4 l'expression du CMH II à la surface des lymphocytes B et comme ces molécules du CMH jouent un rôle important dans la présentation de l'antigène, il a été proposé que la présentation de l'antigène par les cellules B pourrait favoriser l'activation des cellules Ta2 et que la présentation par les macrophages pourrait favoriser l'activation des cellules Ta1 (Vitetta, E.S. 1987; Clifford, M. 1987; Snapper, C.M. 1988) (Figure 5).

L'existence de ces deux sous-populations distinctes de cellules T auxiliaires n'est toutefois pas encore clairement démontrée *in vivo*. Il est possible que dans des conditions physiologiques, cette dualité fonctionnelle soit induite par des signaux d'activation spécifiques agissant sur une cellule T auxiliaire pluripotente (Finkelman, F.D. 1990), pour donner naissance soit à une activité Ta1 soit à une activité Ta2. Certaines évidences expérimentales suggèrent que les réponses de type Ta1 ou Ta2 peuvent être générées *in vivo* dépendant des caractéristiques de l'antigène utilisé pour l'immunisation. (Finkelman, F.D. 1990; Grun, J.L., Maurer 1989).

Bref, bien que la réponse finale résulte d'une multitude d'interactions harmonisées entre les diverses populations de cellules immunes, la route majeure empruntée par l'antigène à l'étape d'initiation influence de façon déterminante l'intensité aussi bien que la qualité de la réponse induite (Vitetta, E.S. 1987).

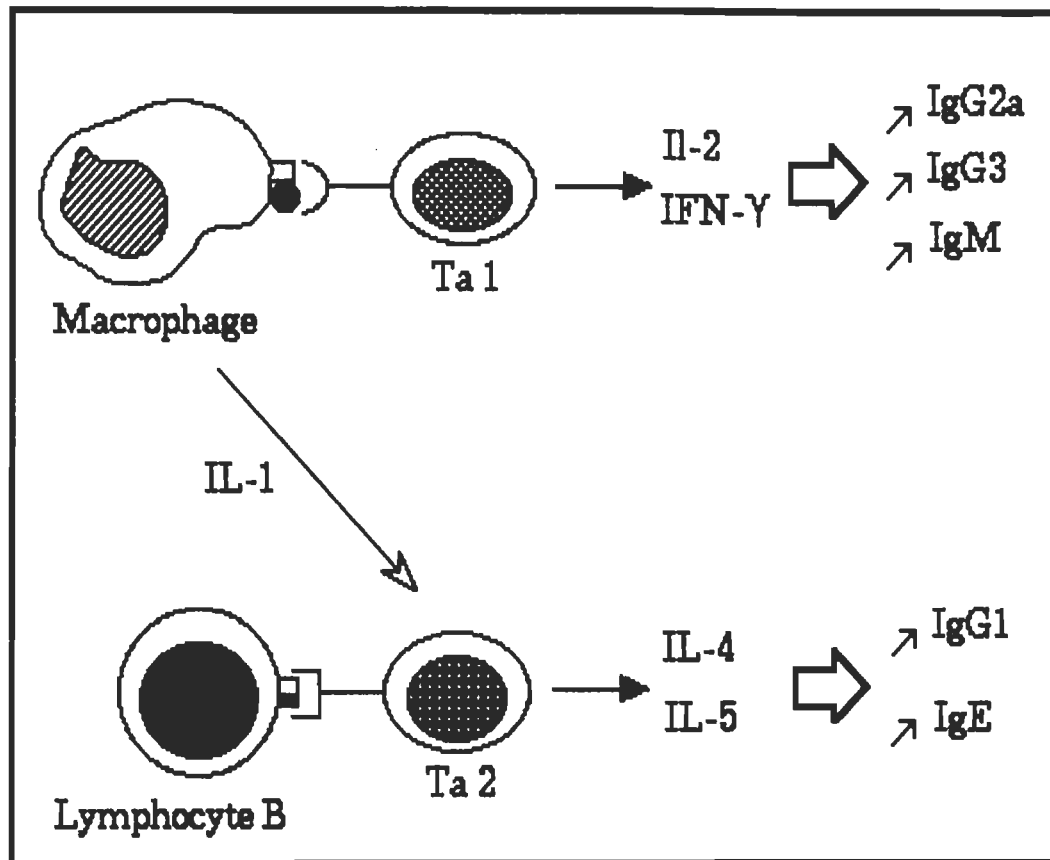


Figure 5 – Voies d'activation du système immunitaire

## **1.2. Les cellules de présentation de l'antigène (CPAg):**

Les cellules de présentation de l'antigène ou cellules accessoires sont celles qui "aident" et coopèrent avec les lymphocytes afin de les rendre capables d'assumer leur fonction de reconnaissance et d'activation. Ces cellules partagent trois fonctions principales: (Ashwell, J.D. 1988)

- \* Prise en charge et " transformation " de l'antigène
- \* Expression de l'antigène en surface dans le contexte des molécules de classe II du CMH.
- \* Sécrétion de médiateurs solubles.

On retrouve dans l'organisme, divers types de cellules accessoires ou cellules de présentation de l'antigène localisées à différents points stratégiques : les cellules de Langerhans de la peau, très actives dans la présentation de l'antigène et possédant une forte densité de molécules de classe I et II du CMH, les cellules folliculaires de la médullaire thymique, les cellules dendritiques de la rate et des ganglions ainsi que les macrophages et les lymphocytes B retrouvés dans tous les tissus lymphoïdes secondaires.

Le rôle du macrophage dans le "processing" des antigènes fait le sujet de nombreuses études depuis le début des années '60 et jusqu'à maintenant (Unanue, E.R. 1987; Johnston, R.B. 1988; Su, D. 1989). Le rôle majeur des lymphocytes B dans cette activité est reconnu depuis moins longtemps mais fait à l'heure actuelle l'objet de recherches intensives.

### **1.2.1 Les macrophages péritonéaux :**

#### **1.2.1.1 Leurs rôles principaux :**

Les macrophages jouent un rôle dans l'inflammation, la défense de l'hôte ainsi que dans la réaction contre une variété d'agents étrangers. Le rôle central joué par les macrophages dans l'initiation de la réponse dépend de leur capacité de générer des signaux tant spécifiques que non-spécifiques, laquelle est reliée d'une part à leur fonction de présentation et d'autre part à leur capacité de sécréter des cytokines influençant l'état d'activation des lymphocytes T (Unanue, E.R. & Allen, P.M. 1987).

Comme mentionné précédemment, le signal spécifique est un complexe de fragments peptidiques (épitopes) associés aux molécules du CMH, ligand spécifique du récepteur des lymphocytes T, alors que les signaux non-spécifiques sont principalement associés à l'interleukine-1 et au TNF ("tumor necrosis factor"). Les macrophages exercent aussi leurs fonctions de défense par un ensemble de mécanismes plus ou moins indépendants de l'activation lymphocytaire. Ces mécanismes contribuent à la réaction inflammatoire médiée par différents produits macrophagiques incluant des enzymes hydrolytiques, des composantes du complément, des prostaglandines et des métabolites actifs de l'O<sub>2</sub>. La sécrétion de plusieurs de ces molécules peut être influencée par les sécrétions des Ta activés grâce aux récepteurs de surface que possèdent les macrophages pour les lymphokines, protéines régulatrices sécrétées par les lymphocytes. Ainsi, les macrophages activés s'avèrent être hautement microbicides et tumoricides.

### **1.2.1.2. Phagocytose, "processing" et présentation de l'antigène :**

La phagocytose consiste en l'ingestion par les macrophages de particules relativement grosses (environ 5  $\mu\text{m}$ ) telles les bactéries ou des parties d'une cellule. La première étape consiste en la liaison de la particule à la membrane plasmique du phagocyte. Par la suite, la particule est enveloppée par des prolongements cytoplasmiques suite à l'interaction progressive des récepteurs de surface sur le phagocyte avec les ligands distribués à la surface de la particule (appelé "interaction ZIPPER"). Après fusion des prolongements cytoplasmiques, la particule se retrouve dans le cytoplasme à l'intérieur d'une vésicule appelée "phagosome". Le phagosome fusionne avec un lysosome primaire pour former le phagolysosome (lysosome secondaire) dans laquelle la particule sera digérée par les enzymes hydrolytiques du lysosome. Toutefois, il est important de mentionner que le sort ultime de la particule ingérée dépend d'abord de sa nature ainsi que du type de cellule phagocytaire.

Au cours de ce processus, l'antigène est "transformé" de façon à devenir immunologiquement reconnaissable; c'est l'étape du "processing". Dans le phagolysosome, l'antigène dégradé est associé au CMH de classe II et retourné sous cette forme à la membrane plasmique. Les peptides obtenus suite au "processing", consistent habituellement en 8 à 10 résidus d'acides aminés, insérés dans une cavité formée de l'association de deux domaines extracytoplasmiques du CMH II.



### **1.2.1.3. Récepteurs de surface impliqués dans les diverses fonctions des macrophages :**

La grande variété de fonctions des macrophages dans le système immunitaire est médiée par divers récepteurs de surface qui leur permet d'interagir avec les hormones, les protéines exogènes et endogènes, les polysaccharides et les lipides. Les récepteurs les mieux connus incluent des récepteurs pour la portion Fc des IgG (Kölsch, E. et al. 1980; Metzger, H. et al. 1988), les récepteurs pour différentes protéines du complément, le récepteur fucose-mannose et les récepteurs pour les facteurs de croissance et cytokines tels l'IFN- $\alpha$  et - $\beta$ , l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 et le TNF ("tumor necrosis factor").

### **1.2.2. Les lymphocytes B en tant que CPAg :**

Comme les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans de la peau, les lymphocytes B internalisent l'antigène par voie d'endocytose et sont capables de réexprimer des fragments de cet antigène à la surface en association avec les molécules du CMH II (Krieger, J.I. et al. 1985; Ashwell, J.D. 1988; Abbas, A.K. 1988). L'extrême efficacité du lymphocyte B dans ce phénomène tient à la spécificité et à l'affinité de son récepteur, l'immunoglobuline de surface (Chesnut, R.W. & Grey, H.M. 1981; Manca, F. et al. 1988). De plus, les cellules B, en liant l'antigène de façon spécifique via les immunoglobulines de surface, requièrent la liaison de concentrations beaucoup plus faibles d'antigène que dans le cas d'une liaison non-spécifique de l'antigène (Malynn, B.A., et al. 1985; Snider, D.P. & Segal, D.M. 1989). L'importance des cellules B en tant que cellule de présentation de l'antigène *in vivo* découle de certaines observations montrant que des souris rendues déficientes en cellules B par injection chronique d'anticorps de lapin anti- $\mu$  dès la naissance ne répondent

pas à une immunisation avec un antigène conventionnel (Kurt-Jones, E.A. et al. 1988).

### **1.3. Les immunoglobulines et leurs rôles physiologiques :**

Indépendamment de toute immunisation active, les immunoglobulines sont présentes en concentration substantielle dans la circulation. Cela résulte en partie de la confrontation constante du système immunitaire avec des substances immunogéniques telles que les éléments de la flore bactérienne intestinale, des aliments ou des particules inhalées.

Bien que les immunoglobulines possèdent toutes la même structure de base (Figure 6), elles ne constituent pas un groupe homogène de protéines. Elles se subdivisent en classes et sous-classes. Une molécule d'immunoglobuline est constituée de deux chaînes légères identiques toutes deux de type  $\kappa$  ou  $\lambda$ , ainsi que de deux chaînes lourdes identiques ( $\alpha$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\delta$ ,  $\mu$  ou  $\epsilon$ ). Chacune des chaînes comprend une région variable et une région constante. L'association des régions variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère détermine le site de liaison de l'antigène et conséquemment la spécificité de l'anticorps. La région constante des chaînes lourdes constitutives est responsable de la particularité des mécanismes effecteurs offerts à l'anticorps pour éliminer l'antigène. C'est donc la région constante d'une molécule d'immunoglobuline qui est responsable des propriétés physiologiques d'une classe donnée. Chez la souris on distingue cinq classes d'immunoglobulines : IgD, IgA, IgE, IgM, IgG et trois sous-classes d'IgG soit IgG1, IgG2a et IgG3, chacune ayant des propriétés physiologiques qui leur sont propres.

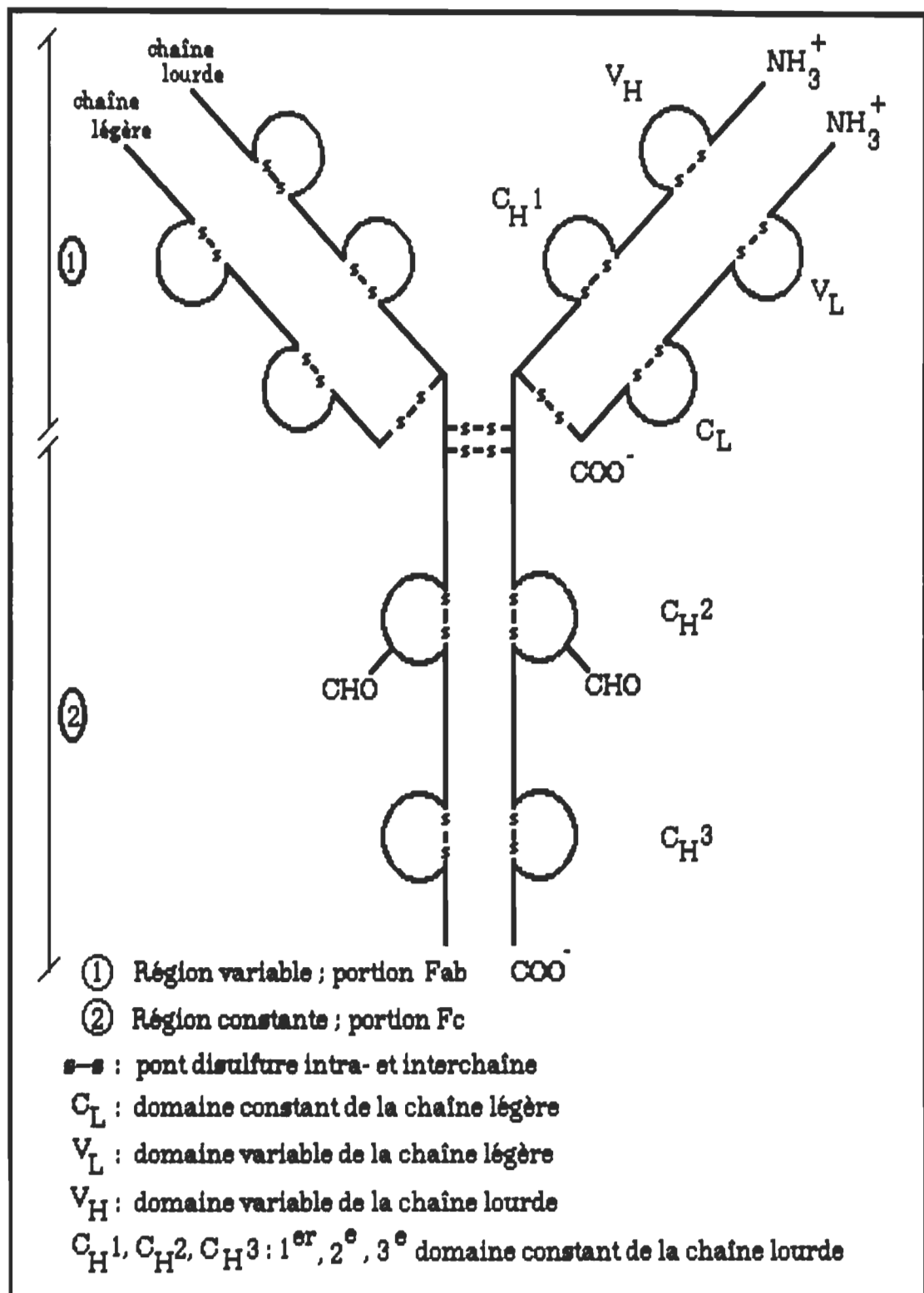


Figure 6 – Schéma général d'une immunoglobuline

L'immunoglobuline de type M ( IgM ), sous sa forme pentamérique, peut lier l'antigène avec une forte avidité. Les complexes anticorps-antigène de ce type activent la cascade classique du complément assez efficacement. De plus, il a été observé que les complexes anticorps-antigène-complément sont phagocytés par les macrophages. Cette phagocytose est probablement médiée par les récepteurs du C3b sur le macrophage et non par un récepteur spécifique pour la région Fc des IgM. L'IgM est aussi un anticorps fréquemment observé dans certains désordres auto-immuns (ex. facteur rhumatoïde).

La sous-classe IgG3 ne représente qu'environ 7% du total des IgG. Toutefois, elle possède la capacité de fixer le complément ainsi que de traverser le placenta. Malgré une capacité d'opsonisation (ou d'attachement à des cellules pour favoriser la phagocytose) faible, l'IgG3 procure une bonne protection contre les bactéries.

Les sous-classes IgG2a et IgG1 représentent quant à elles respectivement environ 23% et 70% du total des IgG, et sont fortement représentées lors d'une réponse immunitaire à une infection virale avec un excès de 10 à 100 fois en IgG2a (Finkelman, F.D. 1990). Enfin, l'IgG2a, en contraste avec l'IgG1 & l'IgG3, peut activer les voies classique et alterne du complément. En se fixant par sa portion Fc à un récepteur distinct sur les macrophages, l'IgG2a se fait médiateur de l'ADCC ("antibody dependent cellular cytotoxicity")

Les IgA (10-15 % des immunoglobulines), sont pour leur part importantes dans la protection des surfaces muqueuses contre l'invasion par les microorganismes. Une forme de l'IgA, désignée sous le terme "IgA sécrétoire", est l'immunoglobuline prédominante dans les sécrétions des mammifères i.e. la salive, les larmes, le lait maternel, etc. Enfin, les IgA n'activent pas la voie classique du complément.

Les IgD sont retrouvées en très faibles concentrations dans le sérum, environ 30-50 µg/ml. Les lymphocytes B immatures expriment les IgM de surface sans IgD qui ne sont exprimés que lors de la différenciation de ces cellules. La plupart des lymphocytes B matures de la rate des souris possèdent considérablement plus d'IgD que d'IgM à leur surface. Suite à l'activation, des lymphocytes B l'IgD de surface n'est généralement plus détectée. Enfin, aucune fonction effectrice n'est encore précisément connue pour cette classe d'immunoglobuline.

Enfin, les immunoglobulines de type E (IgE) ne constituent qu'une très faible partie des immunoglobulines dans le sérum soit seulement 0,1 à 0,3 µg/ml. Toutefois, c'est la classe d'immunoglobuline qui médie la majorité des réactions anaphylactiques. Les IgE se lient étroitement aux récepteurs Fcε sur les basophiles et les mastocytes (Ishizaka, T. et al. 1971). Le pontage par l'antigène des IgE liées à la surface cellulaire, initie la dégranulation de ces cellules conduisant au relargage d'une variété de substances pharmacologiquement actives dont l'histamine et la sérotonine. Ce sont ces substances qui élicitent les réactions d'anaphylaxie et la production de molécules qui attirent les éosinophiles, cellules importantes dans la défense anti-parasitaire.

Bref, c'est essentiellement la région constante de la chaîne lourde de la molécule d'anticorps qui semble déterminer si l'organisme étranger est opsonisé et phagocyté par un macrophage, "attaché" pour la destruction par une cellule K ("Killer"), lysé par le complément ou empêché de s'attacher aux surfaces mucosales.

Enfin, le patron d'isotypes produit en réponse à une activation dépend de l'antigène, de son mode de présentation, de la route d'immunisation, des cellules régulatrices

impliquées et du "background" génétique du sujet. Grâce à leur propriétés spécifiques ces isotypes définiront à leur tour le ou les mécanisme(s) effecteur(s) disponible(s) à l'organisme pour "négocier" avec les corps étrangers.

#### **1.4. Les liposomes comme véhicule de l'antigène :**

##### **1.4.1. Description générale :**

Les liposomes, utilisés ici comme véhicule de l'antigène, sont en fait des vésicules membranaires constituées de phospholipides naturels. Ils sont, dans notre étude, constitués de phosphatidylcholine (DMPC), de phosphatidyléthanolamine (DPPE) et de cholestérol.

Le DMPC constitué de chaînes d'acides gras saturés peu sensibles à l'oxydation favorise la formation d'une double couche (feuillet) lipidique fermée et constitue l'essentiel de la structure liposomale. Le DPPE qui, à forte dose déstabilise le liposome, est utilisé à faible concentration pour fournir une fonction amine facilement modifiable permettant l'association covalente d'une molécule en surface. Le cholestérol rigidifie et stabilise les liposomes en présence de sérum et peut augmenter leur temps de demi-vie dans la circulation, en limitant les échanges de phospholipides avec les lipoprotéines de haute densité, HDL (Gregoriadis, G. 1985; Rouse, B.T. 1986).

La membrane liposomale constitue un feuillet continu, imperméable aux molécules hydrosolubles (Matthews, B.F. 1984). Par conséquent, cette dernière propriété favorise l'encapsulation de molécules hydrosolubles dans leur compartiment interne.

C'est au moment de la dispersion d'un film sec de lipides en milieu aqueux que se forment les vésicules liposomales. On obtient de grosses structures de tailles hétérogènes (500Å à 10µ) constituées de plusieurs bicouches organisées de façon concentrique. De telles structures sont connues sous le nom de vésicules multilamellaires (Figure 7b). Pour ce type d'arrangement, les molécules (en solution aqueuse) peuvent se retrouver en plein centre (espace interne hydrophile), mais aussi entre chacune des bicouches (espaces hydrophiles interlamellaires).

Suite à la filtration par extrusion (ultrafiltration sous pression d'azote) de la suspension lipidique, on obtient cette fois des vésicules unilamellaires de taille homogène dont la dimension varie en fonction de la porosité des filtres utilisés (Figure 7c). On peut également obtenir de telles vésicules unilamellaires par un traitement des vésicules multilamellaires aux ultrasons (sonication), mais les vésicules sont plus petites (< 100 nm) et leur pouvoir d'encapsulation faible.

Les liposomes permettent donc l'association de substances aussi bien dans la phase aqueuse qu'en surface (Shek, P.N. 1983; Claassen, E. 1987; Gregoriadis, G. 1984). Lorsque les substances associées sont camouflées (dans la phase aqueuse) elles sont incapables d'interaction alors que lorsqu'elles sont exposées en surface, elles sont susceptibles de reconnaître et d'interagir avec toute cellule rencontrée *in vivo* (Wolf, B. & Gregoriadis, G. 1984) pour lesquelles elles possèdent une affinité.

*In vivo*, les liposomes sont éliminés de la circulation par les macrophages. Cependant, plusieurs paramètres physico-chimiques des liposomes tels la taille, la fluidité (contenu en cholestérol et/ou lipides à température de transition plus élevée), la charge de surface (résultant des charges des phospholipides constitutants) et la structure (multilamellaire ou unilamellaire) influencent leur stabilité *in vivo* et

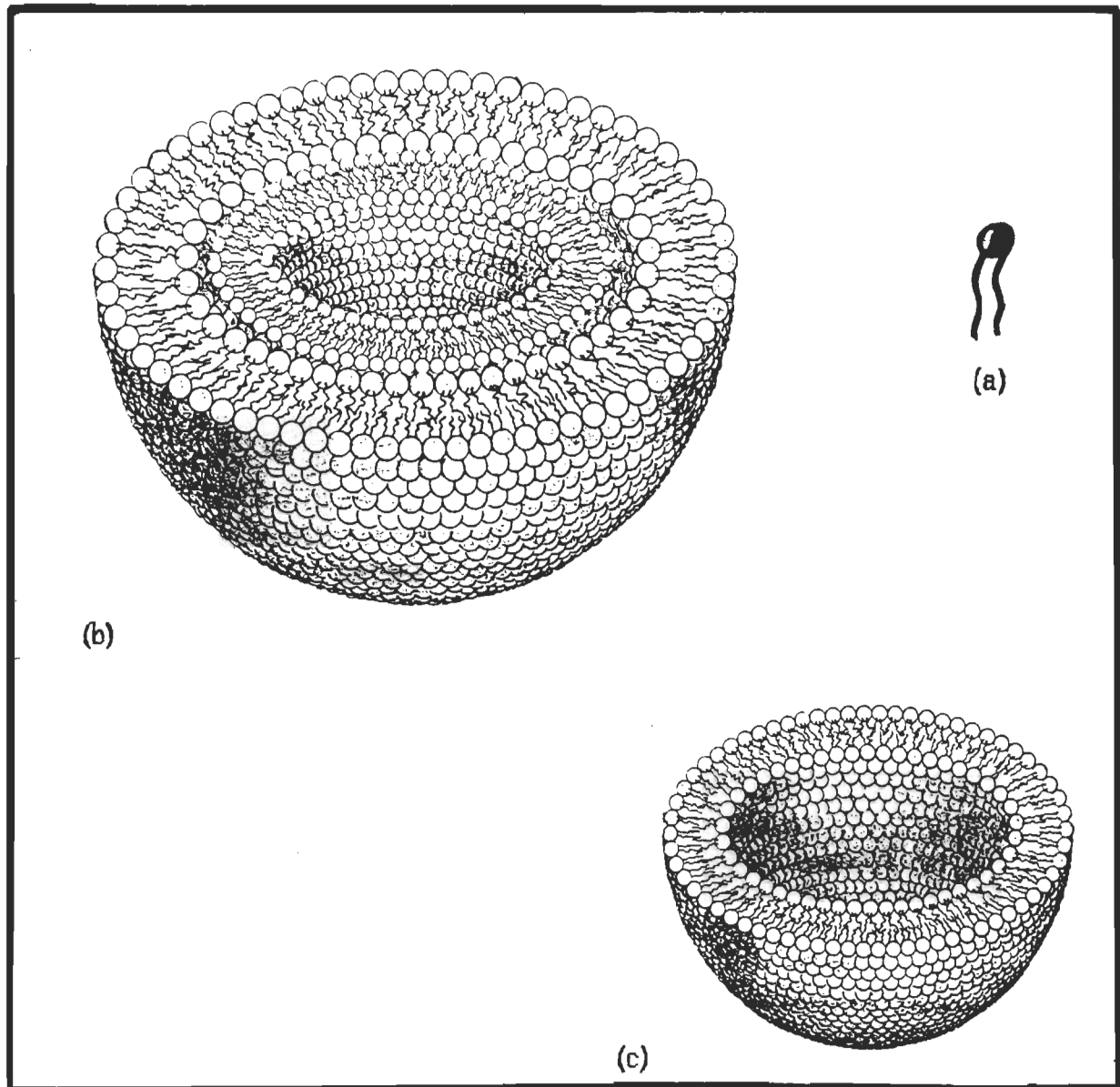


Figure 7 – Représentation schématique de (a) molécule de phospholipide ;  
(b) vésicule multilamellaire ; (c) vésicule unilamellaire.



leur temps de demi-vie en circulation (Beatty, J.D. 1984; Davis, D. & Gregoriadis, G. 1987). Par exemple, les liposomes de grande taille ou les liposomes chargés négativement seront éliminés plus rapidement de la circulation par les phagocytes que les petits liposomes chargés positivement. Les liposomes fabriqués à partir de lipides neutres ont pour leur part une vitesse d'élimination intermédiaire entre les liposomes chargés négativement et positivement. D'autre part, la stabilité et le temps de demi-vie en circulation sont augmentés pour les liposomes riches en cholestérol et/ou en lipides à transition de phase liquide/cristalline élevée. La fluidité membranaire étant ainsi diminuée, le contenu de la phase aqueuse des liposomes est beaucoup moins susceptible de fuir à l'extérieur.

#### **1.4.2. Liposomes et réponse immune :**

Les liposomes se sont avérés particulièrement efficaces comme agent de modulation de la réponse immune. En effet, depuis la mise en évidence par Allison & Gregoriadis de la stimulation de la production d'immunoglobulines contre la toxine diphtérique, plusieurs travaux ont démontré le caractère adjuvant des liposomes que ce soit sur la production d'anticorps ou sur l'immunité cellulaire (Rouse, B.T 1986; Davis, D., Davies, A. & Gregoriadis, G. 1987; Shek, P.N. 1984; Hubscher, T. et al. 1974).

Dans la majorité de ces études, l'association physique de l'antigène aux liposomes apparaît comme une condition indispensable à la manifestation de ce caractère immunomodulateur associé à d'autres propriétés du véhicule liposomal (faible toxicité, faible immunogénicité) (Thérien, H.-M. & Shahum, E. 1989). Toutefois, la nature de cette association i.e. encapsulation ou exposition en surface demeure controversée (Six, H.R. et al. 1980; Lifshitz, R. et al. 1981; Shek, P.N. et al. 1981; Tom, B.H. et

al. 1982; Van Rooijen, N. et al. 1982; Gerlier, D. et al. 1983; Snyder, S.L. & Vannier, W.E. 1984; Shek, P.N. et al. 1983; Gregoriadis, G. et al. 1987).

Ce caractère immunoadjuvant des liposomes permet d'envisager leur utilisation comme vaccins synthétiques pour administration humaine et animale. En effet, les vaccins couramment utilisés tels les peptides synthétiques mimant les antigènes streptococcal, gonococcal etc., sont généralement de faibles immunogènes. En effet, de tels vaccins n'induisent qu'une faible production d'anticorps, offrant par conséquent une immunité peu efficace et de courte durée. Ainsi, ce type d'antigène (peptides) requiert des adjuvants pour induire une immunité protectrice d'où l'intérêt des liposomes qui sont en plus d'être adjuvant, peu toxiques et faiblement immunogénique (Gregoriadis, G. 1988).

#### **1.4.3. Influence du mode d'association de l'antigène aux liposomes sur la qualité de la réponse immune :**

Les liposomes sont non seulement de bons adjuvants de la réponse immune mais semblent capables d'influencer la réponse en dépendance de leur mode d'association avec l'antigène (Shahum, E. & Thérien, H.-M. 1988; Vannier, W.E. & Snyder, S.L. 1988).

Parmi les différences qui ont été rapportées dans les réponses induites par l'antigène ancré et encapsulé, on note des différences dans la durée (Thérien, H.-M., Lair, D. & Shahum, E. 1990), l'intensité (Thérien, H.-M., Lair, D. & Shahum, E. 1990; Van Rooijen, N. & Van Nieuwmegen 1982; Vannier, W.E. & Snyder, S.L. 1988; Latif, N. & Bacchawat, B.K. 1988), le profil d'isotype, la dépendance du site

d'injection (Vannier, W.E. & Snyder, S.L. 1988), la dépendance de l'intégrité des fonctions macrophagiques ( Su, D., Van Rooijen, N. 1989).

En ce qui concerne les différences dans la durée et l'intensité de la réponse humorale, il semble qu'elles ne reflètent pas simplement le comportement différent des divers antigènes testés dans les diverses études puisque des résultats conflictuels ont aussi été obtenus dans des études utilisant le même antigène (BSA) et des conditions similaires (Shek, P.N. & Sabiston 1982; Van Rooijen, N. & Van Nieuwmegen 1982). Une partie de la controverse peut cependant originer des différents aspects de la réponse immune étudiés et des différentes préparations liposomales utilisées par les différents auteurs.

Bref, ces différences observées dans les réponses humorales suggèrent que les deux formes d'antigènes liposomaux encapsulés et ancrés empruntent des voies d'activation différentes. Ces voies d'activation différentes pourraient être reliées aux possibilités distinctes offertes aux deux formes antigéniques pour entrer en contact avec le système immunitaire.

L'antigène encapsulé, masqué qu'il est à l'intérieur du liposome, se retrouve directement dirigé vers les macrophages sans avoir pu interagir pendant son temps de vie en circulation avec de quelconques récepteurs cellulaires. Ce ciblage de l'antigène aux macrophages peut ainsi en retour permettre une activation rapide des cellules T auxiliaires selon une voie essentiellement macrophage-dépendante.

Si l'on considère les macrophages comme la principale, pour ne pas dire l'unique route accessible à l'antigène encapsulé (Shek, P.N. & Ludovick, S. 1982), il en est autrement pour l'antigène ancré. En effet, lorsque l'antigène est ancré dans la

membrane liposomale, la situation s'avère relativement plus complexe en ce sens que d'autres types d'interactions liposome/cellule immune peuvent être envisagés comme par exemple l'interaction avec les lymphocytes B via leurs immunoglobulines de surface spécifiques de l'antigène. La possibilité de telles interactions liposome/cellule est supportée par les travaux de Walden, P. et al. 1986 qui ont démontré l'activation de clones de cellules T par un antigène liposomal ancré présenté à une densité d'épitopes suffisamment élevée.

Les différences observées dans les réponses humorales induites par les deux formes d'antigènes pourraient s'expliquer d'une part par une différence dans la nature des CPAs principalement impliquées et/ou d'autre part dans le "processing" différent des deux formes d'antigènes par un même type de CPA. Afin de clarifier la question et dans le but ultime d'accentuer le caractère adjuvant du véhicule liposomal, nous avons transformé le système de façon à permettre une prise en charge plus rapide de l'antigène par un des deux types de CPAs impliquées, soit le macrophage. En activant de façon principale la voie macrophage-dépendante, les buts visés étaient de diminuer la contribution des autres voies dans la réponse à l'antigène ancré et de voir l'impact de cette voie amplifiée sur la qualité de la réponse finalement induite. Dans cette étude, nous avons voulu exploiter la présence d'un récepteur spécifique présent à la surface des macrophages, le récepteur du mannose pour accentuer la prise en charge des liposomes par les macrophages. Nous avons utilisé pour ce faire un dérivé lipophile synthétique du mannose, le palmitoyl mannose, inséré dans la bicouche liposomale.

C'est en quelque sorte en "disséquant" le phénomène de l'initiation de la réponse, qu'il peut être possible de mieux évaluer l'impact de divers types de formulation

antigénique au niveau de la production d'anticorps en terme d'intensité et de production relative des isotypes d'IgG (IgG1, IgG2a, IgG3) de même que des IgM.

## **1.5. Intensification de la reconnaissance liposome-macrophage :**

### **1.5.1. Lectines et glycolipides synthétiques :**

Comme mentionné plus tôt, les macrophages prennent en charge l'antigène par phagocytose via des prolongements cytoplasmiques indépendamment de la nature de cet antigène. De plus, cet antigène ou corps étranger est généralement constitué ou additionné de différentes molécules ayant pour rôle de favoriser l'interaction avec les phagocytes. Ces diverses molécules faisant partie intégrante ou associées (*in vivo*) à l'antigène, permettent de distinguer deux types de phagocytose soit l'opsonophagocytose et la lectinophagocytose.

On a constaté que certains facteurs sériques augmentaient la vitesse d'incorporation des microorganismes par les phagocytes ; ces facteurs étant appelés opsonines, ce processus d'ingestion est appelé opsonophagocytose (Ofek, I. 1988). Les opsonines, moyen de reconnaissance entre les phagocytes et leurs cibles (bactéries), fonctionnent en liant spécifiquement à la manière serrure/clé les molécules de surfaces membranaires intégrales sur les phagocytes d'une part et la bactérie d'autre part. Les fragments C3b et C3bi du complément, type d'opsonine bien connu, favorisent la phagocytose d'une bactérie en se fixant d'une part à la surface de cette dernière (opsonisation) et d'autre part aux récepteurs pour les molécules du complément (CR) présents à la surface des phagocytes. On reconnaît également les immunoglobulines comme autre type d'opsonine.

Il existe cependant un autre type de phagocytose indépendant des molécules opsonisantes (preuves à l'appui par des expériences *in vitro* et *in vivo* en absence de complément). Les bases moléculaires de cette reconnaissance non-opsonique entre les bactéries et les phagocytes sont demeurées pendant longtemps une énigme. Néanmoins, depuis une dizaine d'années, certaines évidences suggèrent que cette reconnaissance spécifique est médiée par l'interaction de protéines liant les carbohydrates, en l'occurrence les lectines (Behling, V.H. 1976; Sharon, N. chap.3,4,13,20; Machy, P. 1986; Feizi, T. 1987). Ces lectines retrouvées à la surface d'un type cellulaire vont en fait se combiner avec les sucres complémentaires à la surface d'un autre type cellulaire de façon similaire à une opsonine; c'est ce qu'on peut appeler la lectinophagocytose. *In vivo*, ce mécanisme facilite la phagocytose de nombreuses espèces bactériennes (Sharon, N.1983; Handman, E. 1987) qui n'activent pas la voie alterne du complément. On reconnaît deux types de lectinophagocytose: (Sharon, N. 1984)

1. La bactérie porte des lectines de surface (Firon, N. 1982; Sharon, N. & Ofek, I. chap.3 1986) qui se lient de façon complémentaire aux carbohydrates (récepteurs) à la surface des cellules phagocytaires.
2. A l'inverse, les lectines sont des composantes intégrales de la membrane de la cellule phagocytaire se liant aux carbohydrates des surfaces bactériennes

Cette dernière situation illustre en quelque sorte le modèle utilisé dans cette étude (Figure 8). En effet, on retrouve à la surface des macrophages le récepteur du mannose, une lectine ayant la capacité de lier les résidus de mannose. Ces résidus de mannose se situent en ce qui nous concerne à la surface des liposomes et sont

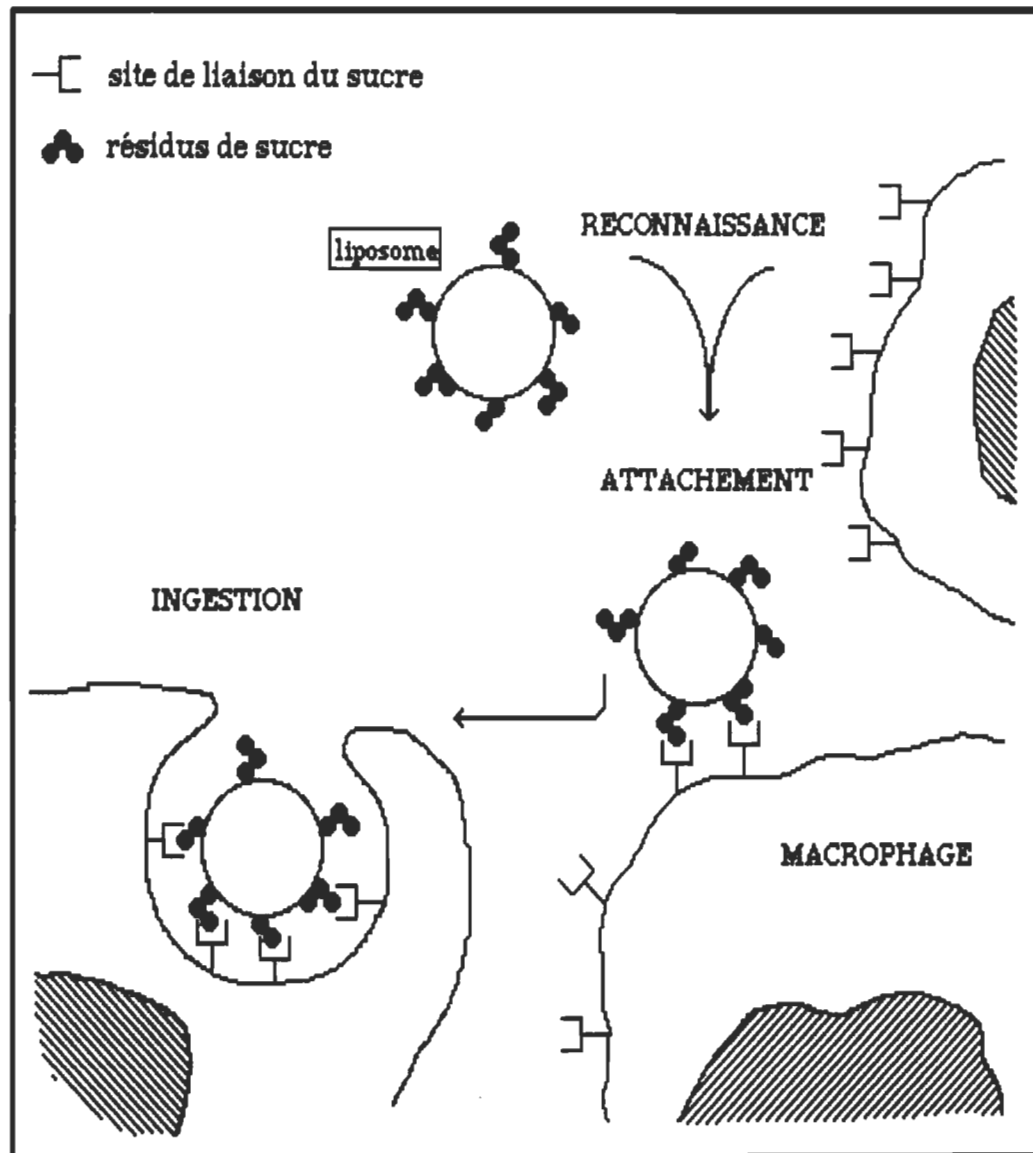


Figure 8 – La lectinophagocytose d'un liposome par un macrophage via les sucres.

retrouvés sous forme de glycolipide (dérivé lipophile du mannose). Les glycolipides sont depuis longtemps reconnus pour leurs effets immunostimulants (Nigam, V.N. 1982 & 1984 Ghosh, P. et al. 1980) et cette propriété est une conséquence de leurs interactions avec les récepteurs de type lectine présents à la surface des macrophages.

### **1.5.2. Le récepteur spécifique du mannose à la surface des macrophages :**

L'idée de cibler directement aux macrophages en utilisant le mannose ou des formes modifiées n'est pas nouvelle. (Barrat, G. et al. 1986; Schroit, A.J. et al. 1986). En effet, afin de cibler les macrophages Baldeschwieler, J.D. et al. en 1985 ont pour leur part utilisé le 6-aminomannose lié au cholestérol. Egalement en 1985, Roche et al. ont surtout exploité les propriétés du muramyldipeptide (MDP), un activateur des macrophages, lié de façon covalente au mannose ou des glycoprotéines terminées par des groupements mannose-phosphate. Il a été démontré que lors de l'association à des liposomes de ligands spécifiques de récepteurs macrophagiques, leur phagocytose stimule les propriétés des macrophages et que ces ligands étaient associés à des propriétés adjuvantes (Garcon, N. et al. 1988; Allen, T.M. & Chonn, A. 1987; Barrat, G.M. et al. 1987; Ohsumi, Y. et al. 1988).

Dès 1976, Stahl et al. ont fait ressortir l'existence d'un récepteur qui avait la capacité de lier les glycoprotéines portant des résidus de mannose (type lectine). Le L-fucose (un sucre simple) a lui aussi une affinité pour le récepteur et le récepteur est donc nommé "récepteur mannose/fucose". Le récepteur du mannose, purifié chez le lapin, le rat et les tissus humains, est une grosse glycoprotéine membranaire requérant du calcium et un pH neutre pour une liaison optimale du ligand (Stahl, P.D. 1990). Les ligands mannosylés se lient au récepteur et entrent subséquemment dans un compartiment endosomal acide où la dissociation a lieu.



Une fois le processus de dégradation du ligand complété, le récepteur est rapidement recyclé à la surface cellulaire (Stahl, P.D. et al. 1980; Wileman et al. 1984; Muller, C.D. & Shuber, F. 1989), le rendant de nouveau apte à une "reconnaissance" spécifique de ligands mannosylés.

Chaque récepteur traverse un cycle complet chaque dix à quinze minutes. Etant donné que le temps de vie du récepteur est de plusieurs jours, il peut être recyclé des centaines de fois avant d'être dégradé ou inactivé.

De récents progrès concernant la biochimie du récepteur du mannose ont révélé que le récepteur est synthétisé en une protéine de 154 kDa, complètement transformée en une forme mature de 162 kDa en environ 90 minutes (Lennartz, M.R. 1987 & 1989; Gordon, S. 1988) par l'acquisition de certains oligosaccharides O-liés et N-liés dans l'appareil de Golgi. Ce récepteur est exprimé par une grande variété de macrophages i.e. alvéolaires, spléniques, péritonéaux ainsi que par les cellules de Kupffer du foie (Hoekstra, D. et al. 1980. Latif, N. & Bacchawat, B.K. 1984; Goldman, R. 1988).

Enfin, l'expression du récepteur du mannose semble d'autre part étroitement régulée (Stahl, P. & Gordon, S. 1982). Le récepteur n'est pas exprimé par les monocytes ("macrophages" circulants) du sang périphérique ou sur les cellules monocytiques, précurseurs provenant de la moëlle osseuse, mais présent en abondance à la surface des macrophages différenciés. On ne le retrouve pas non plus à la surface des PMN, autre cellule phagocytaire majeure de l'arsenal de défense.

Avant d'aborder la présentation et l'interprétation des résultats obtenus, j'expose dans les pages qui suivent un aperçu de la méthodologie utilisée tant au niveau de la préparation du matériel qu'au niveau du cheminement expérimental.

## **MATERIEL & METHODES**

### **2.1. Méthodes:**

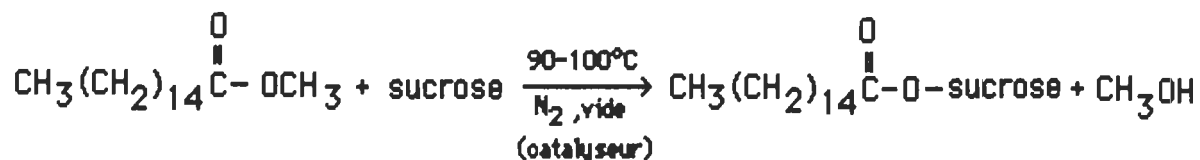
#### **2.1.1. Préparation des constituants clés des liposomes :**

##### **2.1.1.1. Synthèse régiosélective du palmitoyl sucrose monosubstitué (C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>O<sub>12</sub>) :**

a) Synthèse: (Osipov, L. et al. 1956)

La synthèse effectuée est une synthèse régiosélective qui consiste à former un lien ester entre la fonction carboxylique de l'acide palmitique, acide gras à seize carbones et la fonction hydroxyle en position six du glucose d'une molécule de sucrose (glucose-fructose ).

Pour ce faire, le palmitate de méthyle et le sucrose sont dissous dans un rapport molaire 1:3 (excès de sucrose) dans le N,N-diméthylformamide en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> comme catalyseur de la réaction. Tous ces constituants sont introduits dans un ballon à trois ouvertures, où le mélange est chauffé à 90-100°C sous atmosphère d'azote à environ 100 mmHg (vide partiel) pendant six heures avec agitation constante. La réaction est la suivante :



Afin de déplacer la réaction vers la droite et d'obtenir les produits de la réaction (esters de sucrose mono-, bi- et polysubstitués) avec le meilleur rendement possible, le méthanol gazeux dégagé au cours de la réaction est éliminé au fur et à mesure de sa production par condensation ( par un système de réfrigération ).

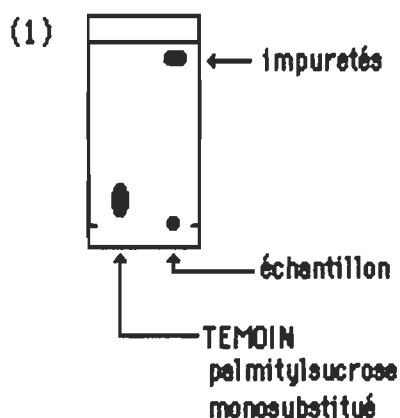
Une fois la réaction terminée, le contenu du ballon réactionnel est évaporé à 80-85°C. Le "résidu" obtenu est lavé avec environ 400 ml d'hexane dans le but d'éliminer le palmitate de méthyle qui n'a pas réagi ainsi qu'une partie des esters polysubstitués.

On effectue ensuite quatre extractions (environ 300 ml chacune) à l'acétone chaud puis deux au butanol-1 (environ 200 ml chacune) qui permettent d'extraire l'ester de sucrose synthétisé et de se débarrasser aussi du sucrose n'ayant pas réagi. Les fractions de butanol-1 et d'acétone sont réunies et évaporées, pour ensuite être redissoutes dans un minimum d'acétone. L'efficacité des extractions est vérifiée par TLC (chromatographie sur couche mince).

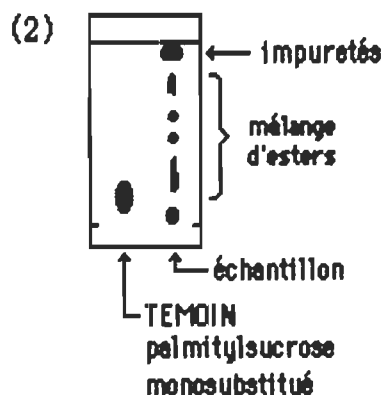
La réalisation d'une TLC s'effectue sur une bandelette de matière plastique recouverte d'une mince couche d'acide silicique. On dépose au bas de celle-ci une petite goutte de l'échantillon à tester (dissous dans un minimum de solvant) à l'aide d'un capillaire, ainsi qu'une goutte d'un témoin adéquat (dans ce cas, le palmitoyl sucrose monosubstitué, dont la migration est connue) à côté au même niveau que la goutte d'échantillon. La bandelette est ensuite déposée à la verticale dans un bécher fermé dans lequel on a préalablement ajouté une quantité minimum de solvant de migration (chloroforme:méthanol 15:1) pour tout juste commencer à imbiber la bandelette, au-dessous des deux gouttes déposées. On laisse monter le solvant jusqu'au haut de la bandelette par capillarité. Les différents types d'esters contenus dans l'échantillon déposé sont ainsi séparés selon leur degré de solubilité dans le solvant

de migration. Ce solvant étant peu polaire, la solubilité des constituants du mélange sera inversement proportionnelle à leur polarité. En conséquence, un ester bisubstitué (deux chaînes carbonées) migrera plus loin qu'un ester monosubstitué (une chaîne carbonée). La révélation des différentes taches obtenues, se fait par vaporisation en couche uniforme d'un révélateur pour les sucres constitué d'éthanol : *p*-anisaldéhyde :  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18:1:1. Une fois séchée, la TLC est mise à l'étuve à  $100^\circ\text{C}$  pendant quelques minutes.

Sont représentées ci-dessous des reproductions des TLC effectuées sur le résidu de sucrose (1) et sur l'extrait liquide d'acétone et de butanol-1 (2).



RESIDU solide (sucrose) après extraction  
à l'acétone et au butanol-1



### EXTRAIT

Cette TLC démontre la présence de sucrose (tache en bas à droite; aucune migration). On voit aussi, outre les impuretés (en haut à droite), le mélange d'esters. Le palmitoyl sucrose monosubstitué est identifié par rapport au témoin, tandis que les autres types d'esters ont migré selon leur degré de substitution.

b) Purification: (Osipov, L. et al. 1956)

L'extrait contient encore une forte quantité de sucrose de même que des impuretés et différents types d'esters. La purification de ce mélange complexe est faite par chromatographie sur gel de silice en utilisant l'acétone comme éluant. La composition de chacune des fractions recueillies est évaluée par TLC après évaporation et redissolution dans un minimum d'acétone ou de chloroforme. Les fractions contenant l'ester monosubstitué sont combinées, évaporées, redissoutes dans un minimum de chloroforme et soumises à une nouvelle chromatographie dans les mêmes conditions afin d'éliminer les quelques impuretés et les quelques esters bi- et polysubstitués résiduels.

Les impuretés sont éluées en premier suivies des esters bi- et polysubstitués. On récolte ensuite l'ester de sucrose monosubstitué. On poursuit l'élution jusqu'à ce que ce dernier soit complètement sorti. Seules les fractions contenant l'ester de sucrose monosubstitué à l'état pur (une seule tache sur TLC vis-à-vis le témoin) sont finalement recueillies et évaporées. L'ester ainsi obtenu est lavé 2-3 fois à l'éther et filtré sur filtre "ULTRA-FAST". Enfin, on sèche le solide obtenu à l'éther pendant environ une demie journée ou jusqu'à ce que celui-ci ne présente plus d'odeur d'éther.

**2.1.1.2. Synthèse régiosélective du palmitoyl mannose monosubstitué  
(C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>):**

a) Synthèse: (Yoshimoto, k. et al. 1979; Asselineau, J. 1955)

La synthèse et le montage sont ici beaucoup plus simples que pour l'ester de sucrose malgré le peu de différence avec l'ester de sucrose. L'objectif visé est aussi

de former le lien ester entre le sucre (mannose) et une chaîne d'acide palmitique (en position six également).

On utilise 5,36 g de chlorure de palmitoyle (préparé par action d'un excès de  $\text{SOCl}_2$  sur 5 g d'acide palmitique) mis en solution dans 10 ml de benzène. Cette solution est ajoutée goutte à goutte dans une solution froide de D(+)-mannose (10%  $\beta$ , 88%  $\alpha$ ) anhydre dissous dans la pyridine anhydre (10 g / 50 ml). La pyridine a pour rôle de maintenir le pH basique en réagissant avec le HCl formé durant la synthèse, un pH acide ayant pour effet d'hydrolyser l'ester au fur et à mesure de sa formation. Le mélange est agité pendant 24 heures à température ambiante. On évapore ensuite le plus possible la pyridine et on précipite avec l'eau distillée glacée tout en maintenant le ballon dans un bain-marie d'eau froide. Les cristaux ainsi formés, sont filtrés et la pyridine restante se trouve éliminée du même coup puisqu'elle est soluble dans l'eau. Les cristaux sont ensuite dissous dans un minimum de chloroforme contenant environ 5% de méthanol. On enlève la phase aqueuse (en haut) i.e. l'eau restante utilisée pour la précipitation et on "assèche" avec du  $\text{MgSO}_4$  que l'on ajoute au liquide (enlevé par filtration) afin d'éliminer toute trace d'eau.

b) Purification: (Yoshimoto, K. et al. 1979; Asselineau, J. 1955)

Le mélange obtenu est ensuite séparé par chromatographie sur gel de silice avec le chloroforme comme solvant d'élution. Le contrôle de la pureté des fractions est effectué par TLC tel que décrit pour l'ester de sucrose. Les fractions contenant l'ester de mannose monosubstitué, déjà pur sont évaporées puis recristallisées à froid après solubilisation dans un minimum d'acétone froid. On sèche les cristaux obtenus à l'éther environ une demie journée.

## CONTROLE DE LA PURETE

Afin de contrôler la nature exacte des produits obtenus les deux esters ont été soumis à une analyse élémentaire ainsi qu'à une analyse par RMN et spectroscopie infra-rouge. L'analyse élémentaire faite par le Schwarzkopf Microanalytical Laboratory nous a permis de confirmer la monosubstitution des esters synthétisés en nous renseignant sur le pourcentage de chaque type d'élément présent dans la molécule synthétisée (C, H et O).

### **2.1.1.3. Synthèse du DPPE-DTP :**

La synthèse a été réalisée d'après la technique décrite par Leserman et al. (1984). Le DPPE est solubilisé (10  $\mu$ moles / 700 $\mu$ l) dans le chloroforme : méthanol 9:1. On ajoute le SPDP, préalablement solubilisé dans du méthanol anhydre filtré dans un rapport molaire de 1,2 avec le DPPE (12  $\mu$ moles / 300 $\mu$ l) et 20  $\mu$ moles de TEA. Le mélange est incubé deux heures à température ambiante avec agitation rotative. Le SPDP est un réactif hétérobifonctionnel qui réagit avec la fonction amine du DPPE.

A la fin de l'incubation on ajoute en mélangeant au vortex quelques millilitres de tampon HEPES 10 mM. NaCl 0,9% pH 7,4 et après centrifugation, la phase aqueuse est éliminée. Cette étape d'extraction est répétée deux fois avec quelques millilitres d'eau, et la phase organique est chaque fois conservée. A la fin du processus, on constate parfois un léger trouble qui est éliminé par ajout de quelques gouttes de méthanol. Par la suite, on rotoévapore (sous azote) et le film sec obtenu est resuspendu dans un volume connu de chloroforme : méthanol 9:1 à l'aide de quelques billes de verre.

La concentration de DPPE-DTP est estimée par spectrophotométrie en me-



surant la concentration de dithiopyridine (DTP) libérée du complexe en présence d'un agent réducteur des ponts disulfures, le DTT. Le DTP absorbe à 343 nm avec un coefficient d'extinction molaire de  $8080 \text{ mole}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ . Pour ce faire, on incube un volume connu de DPPE-DTP en présence de DTT (50 mM) dans le méthanol pendant 20-25 minutes à température ambiante avant de mesurer la densité optique.

#### **2.1.1.4. Iodination de la BSA :**

L'albumine est marquée à l'iode-125 par la méthode à l'IODOGEN (1, 3, 4, 6-tétra-chloro-3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -diphenyl-glycouril) de Salacinsky, P.R.P. et al. (1981).

La première étape consiste à couvrir la surface d'un tube avec le réactif d'iodation (50  $\mu\text{l}$ ) préalablement dissous dans le dichlorométhane (0,2 mg/ml) par évaporation sous azote. On ajoute ensuite 10 $\mu\text{l}$  de tampon, 500  $\mu\text{Ci}$  d'iode  $^{125}$  (forme de l'iode) et 10 $\mu\text{l}$  d'une solution concentrée d'albumine (17mg/ml) dans du PBS.

Le mélange est incubé dix minutes à température ambiante et la réaction arrêtée par ajout de 500 $\mu\text{l}$  de tampon PBS (15 minutes). Les réactifs sont séparés de la protéine iodée par filtration sur gel de Séphadex G-25 préalablement saturé avec la protéine froide, et abondamment rincée au tampon d'élution, le PBS. L'étape de saturation est importante afin de limiter les pertes d'albumine marquée par adsorption non-spécifique au gel compte tenu des petites quantités de matériel utilisées. La BSA ainsi marquée est utilisée comme traceur pour l'estimation des quantités associées aux liposomes.

#### **2.1.2. Association antigène-liposomes :**

Dans les deux cas (encapsulation et ancrage) les liposomes composés de

DMPC, cholestérol et DPPE dans un rapport molaire de 63:31:6, sont préparés selon une technique d'ultrafiltration déjà établie dans notre laboratoire, technique inspirée de Lichtenberg, D. et al. 1988; Milsman, M.H.W. et al. 1978 (Figure 9) avec ou sans ester de sucre.

La procédure standard de fabrication des liposomes est la suivante. Les lipides, solubilisés dans le chloroforme : méthanol 9:1 sont évaporés au rotoévaporateur sous atmosphère d'azote jusqu'à l'obtention d'un film sec. Le film sec obtenu est réhydraté avec du tampon HEPES 10 mM.NaCl 0,9% pH 7,4 à l'aide de quelques billes de verre puis incubé pendant deux heures à 37°C. La suspension de liposomes encore multilamellaires est homogénéisée dix fois à l'aide d'un homogénéisateur verre-teflon et filtrée par extrusion répétée (dix passages) sous pression d'azote à travers deux filtres de polycarbonate possédant des pores de 0,4 µm de diamètre. On obtient ainsi des liposomes unilamellaires d'environ 300 nm de diamètre. Le processus d'extrusion s'effectue à 37°C, environ 10°C au-dessus de la température de transition gel / liquide du DMPC. Les liposomes ainsi formés sont ultracentrifugés pendant 35-45 minutes à 165 000 x g et resuspendus dans le tampon HEPES 10mM.NaCl 0,9 % (pH 7,4 ou 8,0).

La concentration des liposomes est évaluée de façon indirecte par le dosage du phosphate inorganique des phospholipides constitutifs (voir page 52), ce qui permet de connaître le nombre réel de µmoles de lipides à la fin du processus de fabrication des liposomes.

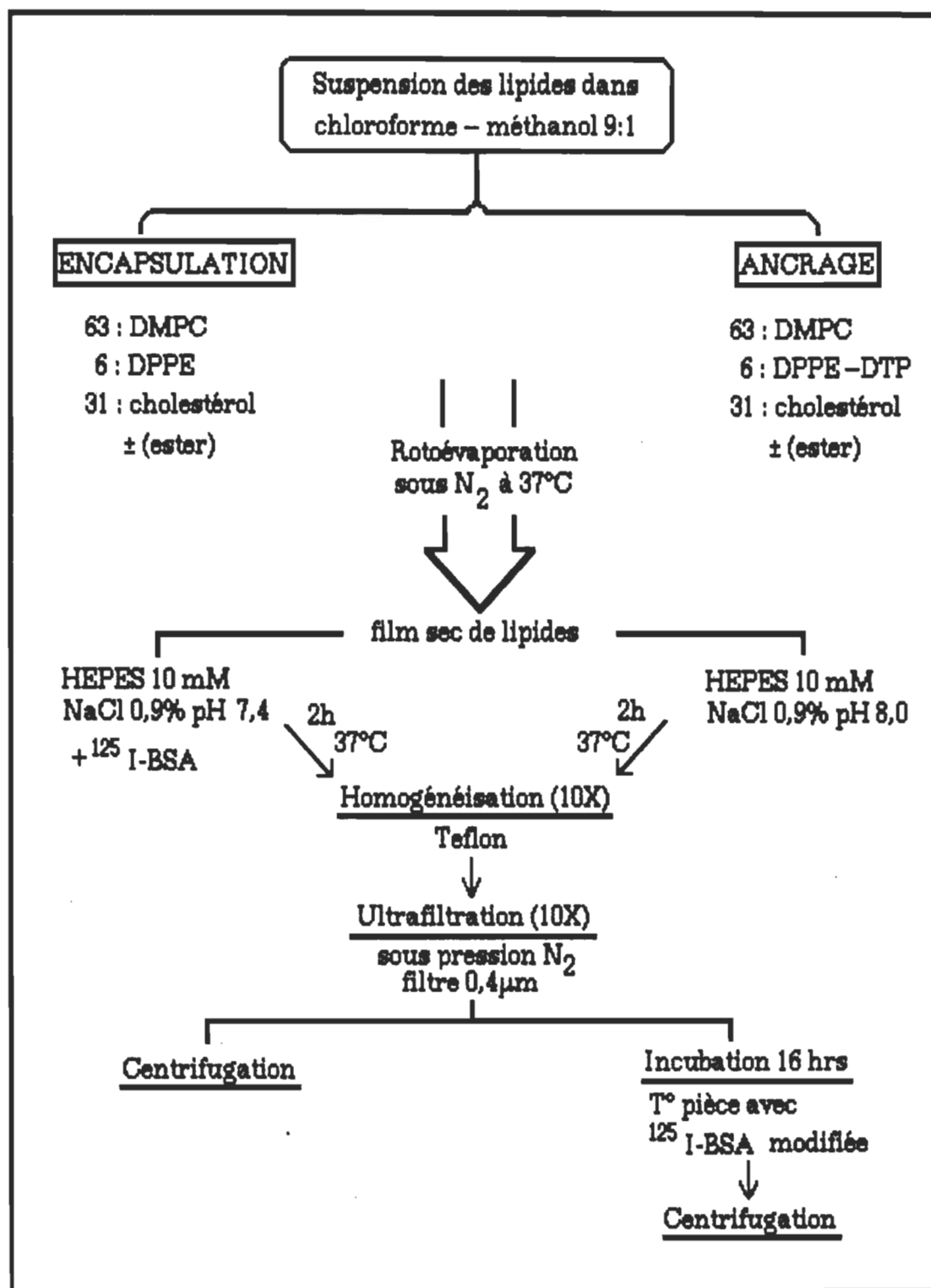


Figure 9 – Préparation des liposomes.

### **2.1.2.1. Encapsulation:**

La BSA, antigène utilisé dans cette étude, est incorporée dans les liposomes pendant leur formation lors de la réhydratation du film sec de lipides dans le tampon HEPES 10 mM.NaCl 0,9% pH 7,4. A cette fin, la BSA est solubilisée dans le tampon à une concentration d'environ 21 mg/ml en présence de BSA iodée. La radioactivité spécifique de la solution est mesurée au compteur  $\gamma$  ce qui nous permet de connaître le taux d'encapsulation à la fin du processus. La BSA encapsulée est séparée de la BSA demeurée libre par deux ultracentrifugations à 4°C, 165 000 x g pendant 35 minutes.

### **2.1.2.2. Liaison covalente ("ancrage") :**

Le couplage à la surface liposomale (Carlsson, J. et al. 1978) de la BSA est réalisé après la modification à la fois du DPPE (voir p. 41) et de la protéine avec le réactif hétérobifonctionnel SPDP selon la méthode de Leserman, L.D. et al. 1984.

Une solution concentrée de BSA contenant une quantité connue de BSA iodée est préparée dans du tampon HEPES.NaCl pH 8,0 puis incubée en présence de SPDP dans un rapport molaire 10:1. Le SPDP est préalablement dissous dans un volume minimal de méthanol anhydre avant ajout goutte à goutte et sous agitation douce à la solution aqueuse de BSA. Au cours de cette incubation, les amines accessibles de la BSA sont modifiées par ajout d'un groupement "2-pyridyl disulfure propionate". Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le SPDP n'ayant pas réagi est éliminé par filtration sur gel de Séphadex G-25 préalablement équilibré dans du tampon acétate 0,1M NaCl 0,9% pH 4,5 (Figure 10). Ce changement de tampon est nécessaire pour assurer la protection des ponts disulfures natifs de la protéine à

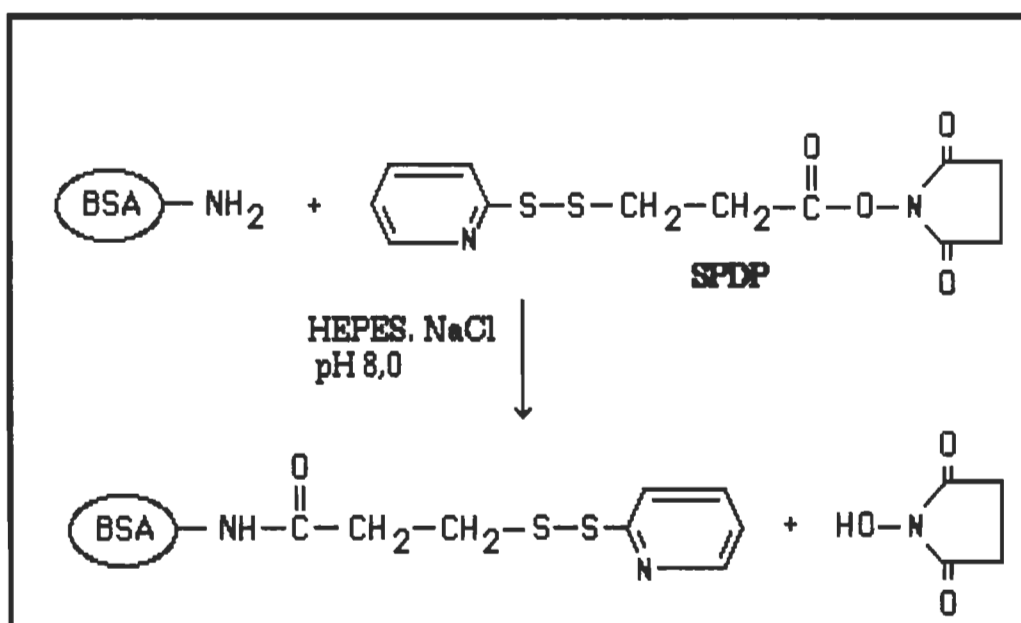


Figure 10 – Modification d'une protéine par le SPDP.

Introduction de groupes 2-pyridyl disulfide dans une protéine non thiolée par aminolyse.

l'étape d'activation du groupement introduit.

Afin de s'assurer de la modification effective de la protéine, on contrôle à cette étape le taux de modification en incubant un échantillon de la protéine en présence de DTT 50mM. Le DTT libère le groupement pyridine 2-thione dont on mesure l'absorption par spectrophotométrie à 343 nm. Cette mesure nous permet de déterminer le rapport de modification obtenu i.e. le nombre de groupements amines modifiés / molécule de BSA.

La BSA est finalement activée par incubation pendant 30 minutes à température ambiante en présence de DTT à une concentration finale de 50 mM. Cette étape permet de générer une fonction sulphydryle réactive par élimination du groupement pyridine 2-thione (Figure 11). Le DTT est éliminé par filtration sur Séphadex G-25 préalablement équilibré dans un tampon HEPES 10 mM.NaCl 0,9% à pH 8,0. La protéine modifiée et activée est récupérée dans le volume mort de la colonne. Elle se trouve maintenant dans des conditions de milieu favorables à l'ancrage à la surface liposomale.

Après une incubation de 16 heures en présence des liposomes modifiés (Figure 12), la BSA ancrée est séparée de la BSA libre par deux ultracentrifugations consécutives à 4°C, 165 000 x g pendant 45 minutes. Le taux d'ancrage est estimé par mesure de la radioactivité associée aux liposomes, connaissant la radioactivité spécifique de la solution de BSA utilisée au départ.

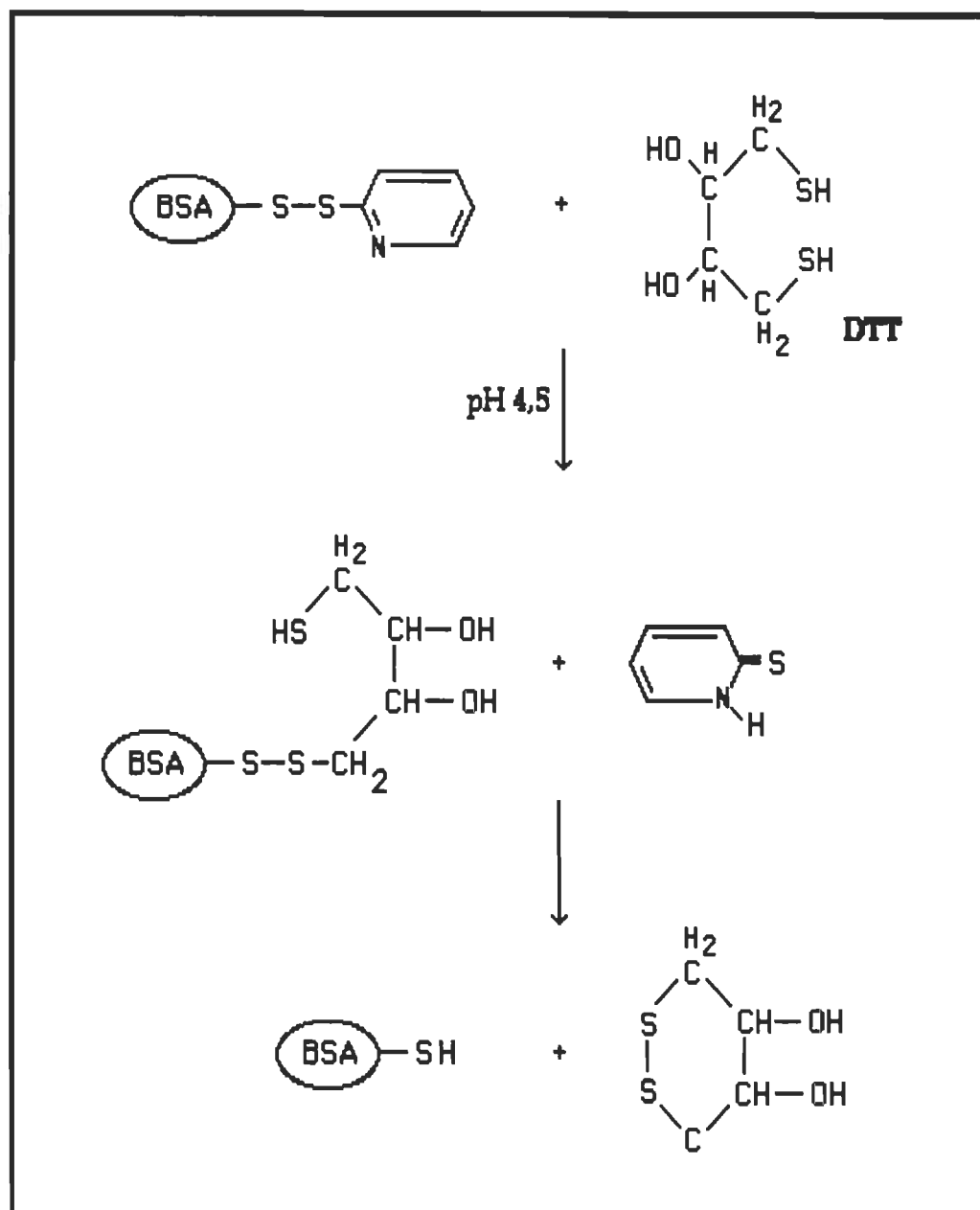


Figure 11 – Réduction spécifique des groupes 2-pyridyl disulfide liés à la protéine par le dithiothréitol (DTT).

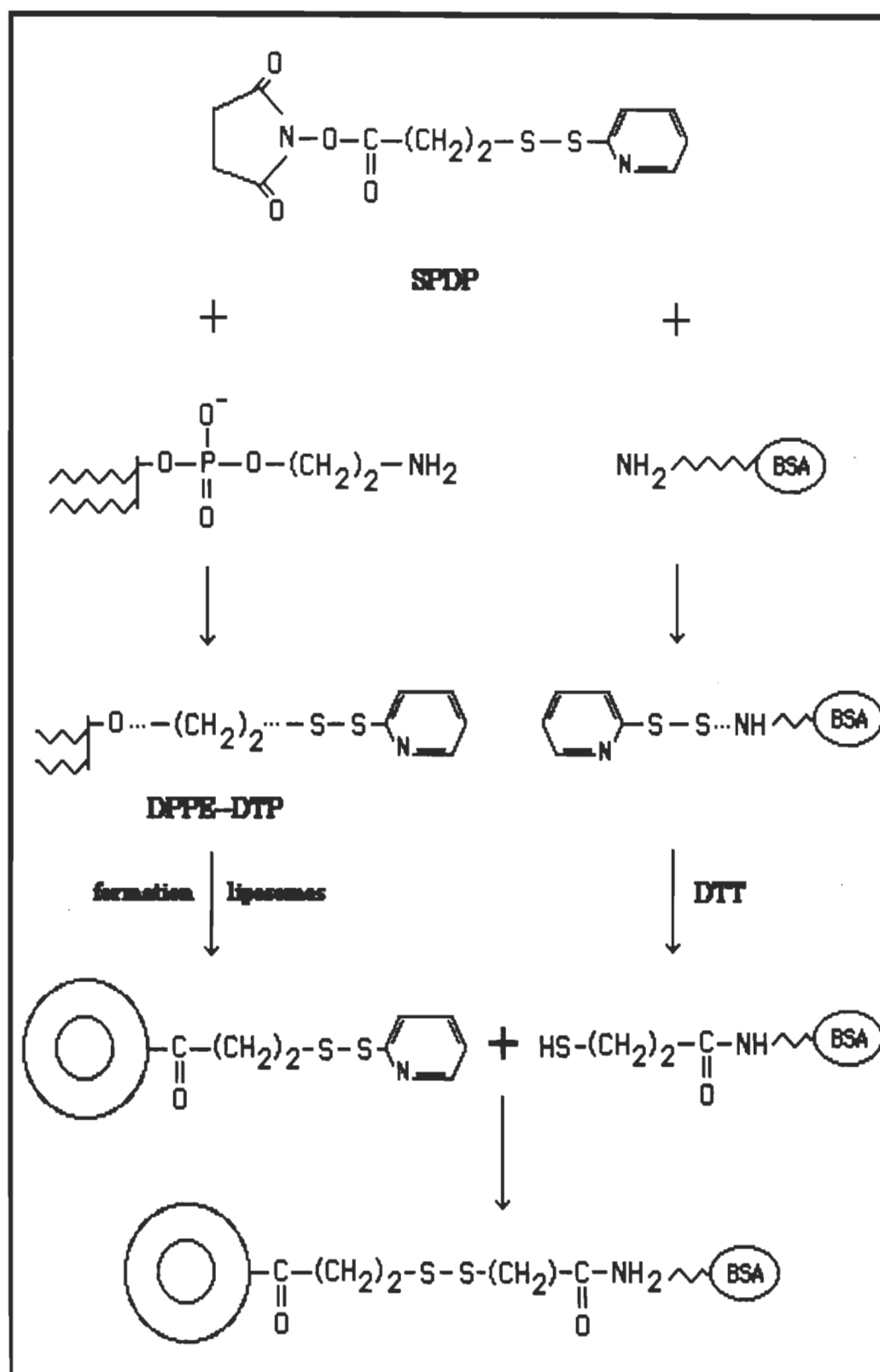
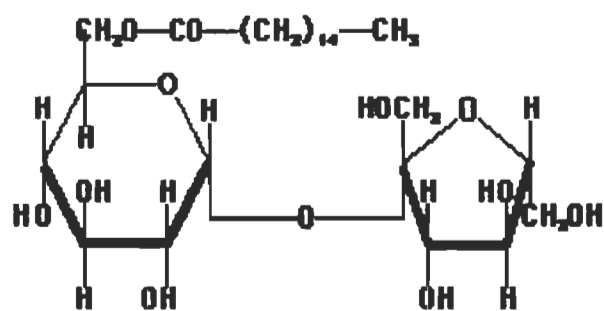


Figure 12 – Représentation schématique de l'ancrage d'une protéine à un liposome.

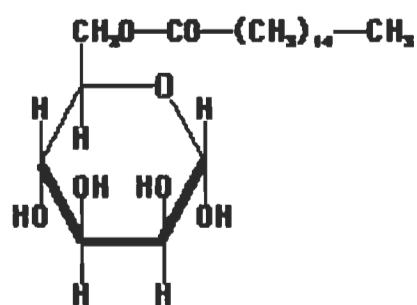


### **2.1.2.3. Incorporation de l'ester de sucrose ou de mannose dans les liposomes**

Les esters de sucres sont, comme les phospholipides, des substances amphiphiles. En effet, comme l'illustre bien leur structure (Figure 13), la longue chaîne aliphatique (C16) s'insère spontanément dans la bicouche pour laisser à l'extérieur du liposome la partie glucidique, en l'occurrence le sucrose ou le mannose. Les esters solubilisés dans le chloroforme : méthanol (1,5 mg/ml) sont ajoutés au moment de la préparation du film sec de lipides. Trois rapports molaires d'ester ont été choisis soit 0,08%, 0,17% et 0,36% pour cette étude (dans le type de liposomes utilisé soit DMPC:cholestérol:DPPE 63:31:6) étant donné qu'à des concentrations plus fortes on pouvait observer la formation de micelles à cause du caractère détergent de ces substances.



(a) Palmitoyl sucrose monosubstitué ( $\text{C}_{16}$ )



(b) Palmitoyl mannose monosubstitué ( $\text{C}_{16}$ )

Figure 13 – Structure de (a) l'ester de sucrose ; (b) l'ester de mannose.

### **2.1.3. Dosage du phosphate inorganique :**

La teneur en lipides (nombre de  $\mu\text{moles}$ ) des préparations liposomales est estimée par dosage du phosphate inorganique libéré après minéralisation des phospholipides constitutifs (Fiske, C.H. & Subarow, Y.1925). Un échantillon contenu dans 900  $\mu\text{l}$  d'eau distillée est minéralisé à 440°F (environ 240°C) pendant une heure en présence de 100  $\mu\text{l}$  d'acide perchlorique. Au résidu, on ajoute 4 ml d'eau distillée. A 1ml du mélange on ajoute 63  $\mu\text{l}$  de réactif au molybdate ( $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,02M &  $\text{H}_2\text{SO}_4$  13,6% v/v) et 113  $\mu\text{l}$  de réactif de Fiske & Subarow et l'on incube à température ambiante durant 30 minutes. La quantité de  $\text{PO}_4$  est estimée par mesure de la densité optique à 660 nm par référence à une courbe standard faite avec du  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0 - 0,25  $\mu\text{mole}$ ).

### **2.1.4. Immunisation des animaux et horaire des ponctions cardiaques :**

Toutes les expériences ont été menées sur des souris BALB/c mâle ou femelle âgées de 8 à 12 semaines. Les souris sont injectées deux fois avec une ou l'autre des différentes préparations antigéniques, soit BSA libre, encapsulée ou ancrée avec ou sans ester de sucrose ou de mannose, et ce à 28 jours d'intervalle. Les diverses préparations contenant 65  $\mu\text{g}$  de protéine furent injectées par voie intrapéritonéale dans un volume total de 250  $\mu\text{l}$ . Dans le cas des préparations liposomales le rapport protéine : lipide était maintenu à peu près constant à une valeur de 35-40  $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$  (Figure 14). Chaque point expérimental représente les valeurs obtenues à partir de cinq individus. A chaque temps étudié i.e jour 10 et jour 28 après la première stimulation et jour 10 et jour 90 après la seconde stimulation, le sang de chaque souris (700  $\mu\text{l}$  à 1 ml) est prélevé par ponction cardiaque (Figure 15) et laissé à température ambiante environ une demi-heure afin de permettre au caillot de se

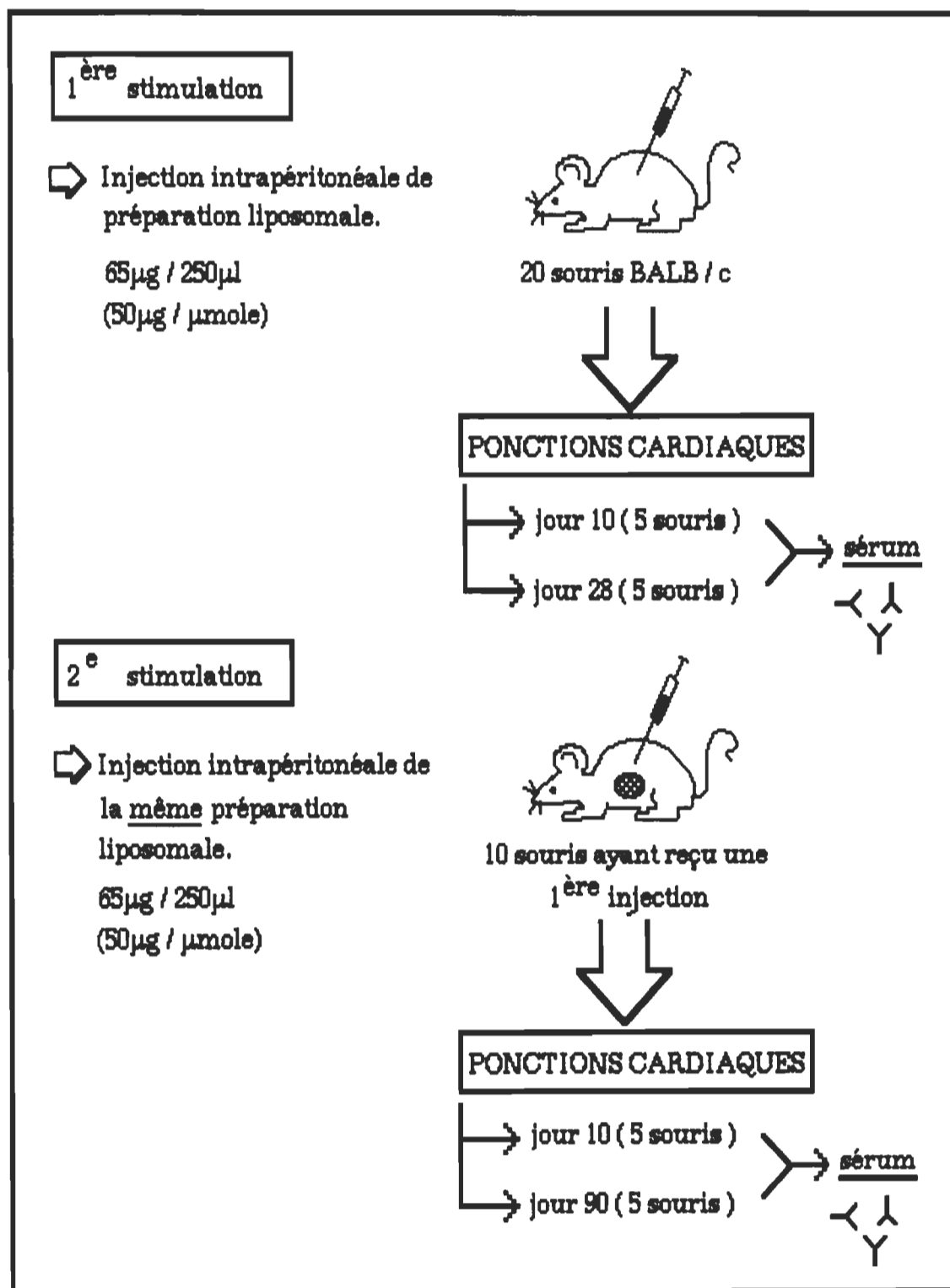


Figure 14 – Calendrier d'immunisation.

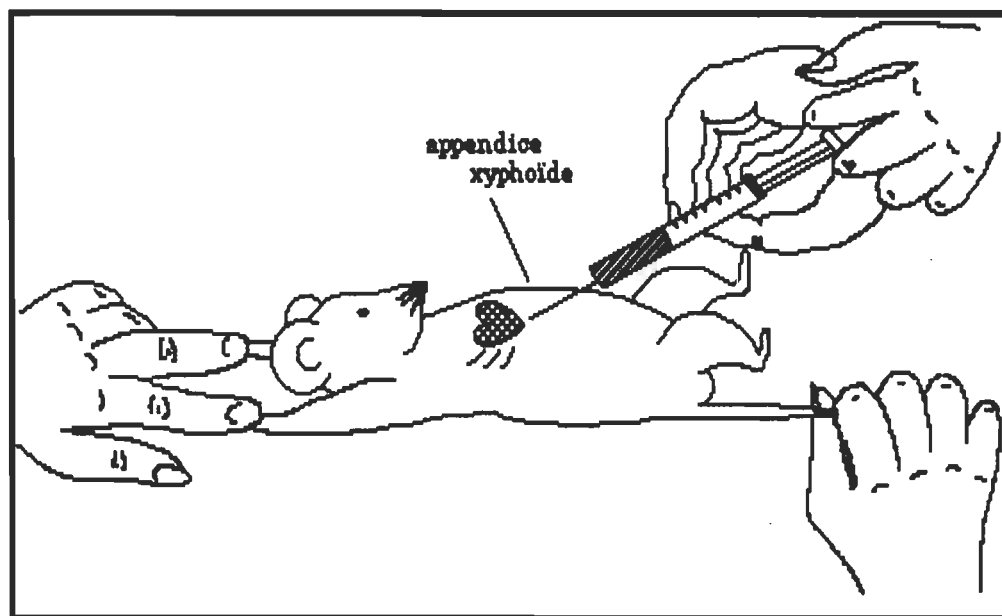


Figure 15 – Technique de la ponction cardiaque chez la souris.

former et on laisse ensuite le sang 24 heures à 4°C pour permettre au caillot de se rétracter, puis on centrifuge pendant dix minutes à 2000 x g. Les sérums (contenant les anticorps anti-BSA), une fois décantés sont conservés au congélateur jusqu'à la détermination du titre par ELISA.

### **2.1.5. Détermination du titre en anticorps par ELISA :**

Les titres en anticorps ont été estimés sur les échantillons de sérums (anti-BSA) par une technique immunoenzymatique analogue à celle décrite par Claassen, E. et al. 1987.

La première étape consiste en la fixation de l'antigène (BSA) dans tous les puits d'une plaque SAUF dans les puits témoins. Pour ce faire, les puits sont remplis uniformément d'une solution de BSA à 5 µg/ml dans un tampon sodium-carbonate 0,1 M pH 9,6. On laisse pour incubation toute une nuit à 4°C. La solution est enlevée par aspiration et les puits sont lavés trois fois avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 saline 0,9 % (PBSN). Afin d'éviter les réactions non-spécifiques, les sites libres sont ensuite bloqués en remplissant tous les puits avec une solution de caséine 3% dans le PBSN légèrement chauffé, et incubés au minimum 30 minutes à température ambiante. La solution est finalement aspirée et les puits lavés trois fois avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 saline 0,9 % contenant 0,05 % de Tween-20 (PBS-NT).

La troisième étape consiste en l'attachement de l'anticorps ; il s'agit ici des différents sérums obtenus. Une série de dilutions des sérums de chaque souris provenant des ponctions cardiaques (dilutions par 2 en série) est déposée dans les puits à raison de 10 µl/puits. Les puits témoins contiennent 10 µl de la dilution la moins

forte. Après incubation de soixante minutes à température ambiante et élimination de l'excès de sérum par aspiration, les puits sont soigneusement lavés trois fois avec le tampon PBSNT.

En quatrième lieu, les antisérums (marqués à la peroxydase), sont ajoutés à raison de 10  $\mu$ l/puits à la dilution optimale spécifique préalablement déterminée pour chacun: anti-Igtotal (1/3000), anti-IgM (1/3000), anti-IgG (1/2000), anti-IgG1 (1/3000), anti-IgG2a (1/2000) et anti-IgG3 (1/2000). Suite à une incubation de soixante minutes à température ambiante, tous les puits sont lavés au tampon PBSNT au moins cinq fois.

Enfin, les titres en Ig totales, IgM, IgG, IgG1, IgG2a et IgG3 sont déterminés après incubation à la noirceur pendant 30 minutes en présence de  $H_2O_2$  le substrat de la réaction enzymatique et d'un chromogène, l'ABTS. On prépare, juste avant utilisation, la solution d'ABTS à 0,4 mg/ml dans un tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 4,0, contenant en plus 0,015 % d'  $H_2O_2$  dont on dépose 125 $\mu$ l/puits. Les titres en anticorps sont estimés par la différence d'intensité de coloration entre les puits échantillons et le puits témoin pour chaque souris. En effet, le puits dont l'intensité de coloration est tout juste un peu plus élevée que le puits témoin représente le titre i.e. la dilution maximale à laquelle une réaction est encore visible. Les résultats sont exprimés en  $\log_2$  de la dilution correspondante (Figure 16).

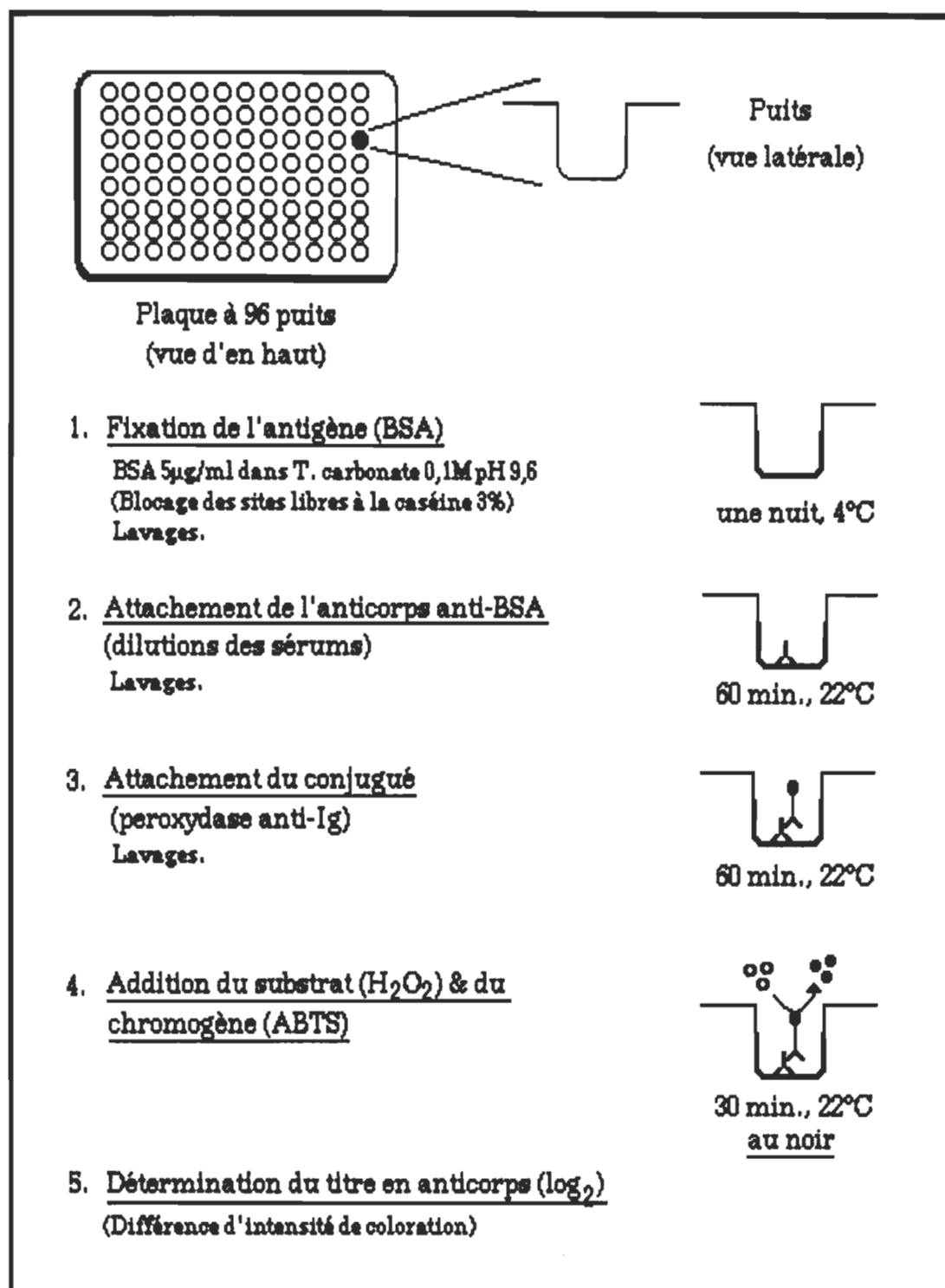


Figure 16 – ELISA



## **RESULTATS**

### **3.1. Esters et préparations liposomales :**

#### **3.1.1. Evaluation de la pureté et de la structure des esters :**

La pureté des esters synthétisés a été confirmée par analyse élémentaire (Schwarzkopf Microanalytical Laboratory, Woodside, New York) qui permet d'évaluer le pourcentage de chaque type d'atome présent dans la molécule suite à la combustion d'un échantillon en fonction du rapport attendu. Les données obtenues sont présentées au tableau 1.

Pour le palmitoyl sucrose, les pourcentages obtenus correspondent aux pourcentages théoriques calculés sur la base du poids moléculaire ( $PM = 580,712 \text{ g/mole}$ ) et confirme qu'il s'agit d'un palmitoyl sucrose monosubstitué. Les données obtenues avec le palmitoyl mannose ( $PM = 418,580 \text{ g/mole}$ ) confirment la structure générale puisque les pourcentages en oxygène et en hydrogène correspondent à ceux calculés. Cependant, on observe que le pourcentage de carbone obtenu (54,47 %) est inférieur à celui calculé (63,16 %). Tel qu'indiqué par le laboratoire d'analyse, ce faible pourcentage pourrait être attribuable à une combustion incomplète de l'échantillon dans les conditions qu'ils ont utilisés compte tenu de la longue chaîne de carbone. La compagnie nous a offert de reprendre l'analyse, cependant comme les autres analyses effectuées sur le produit confirmaient la structure attendue, nous n'avons pas repris l'analyse élémentaire.

**TABLEAU 1**

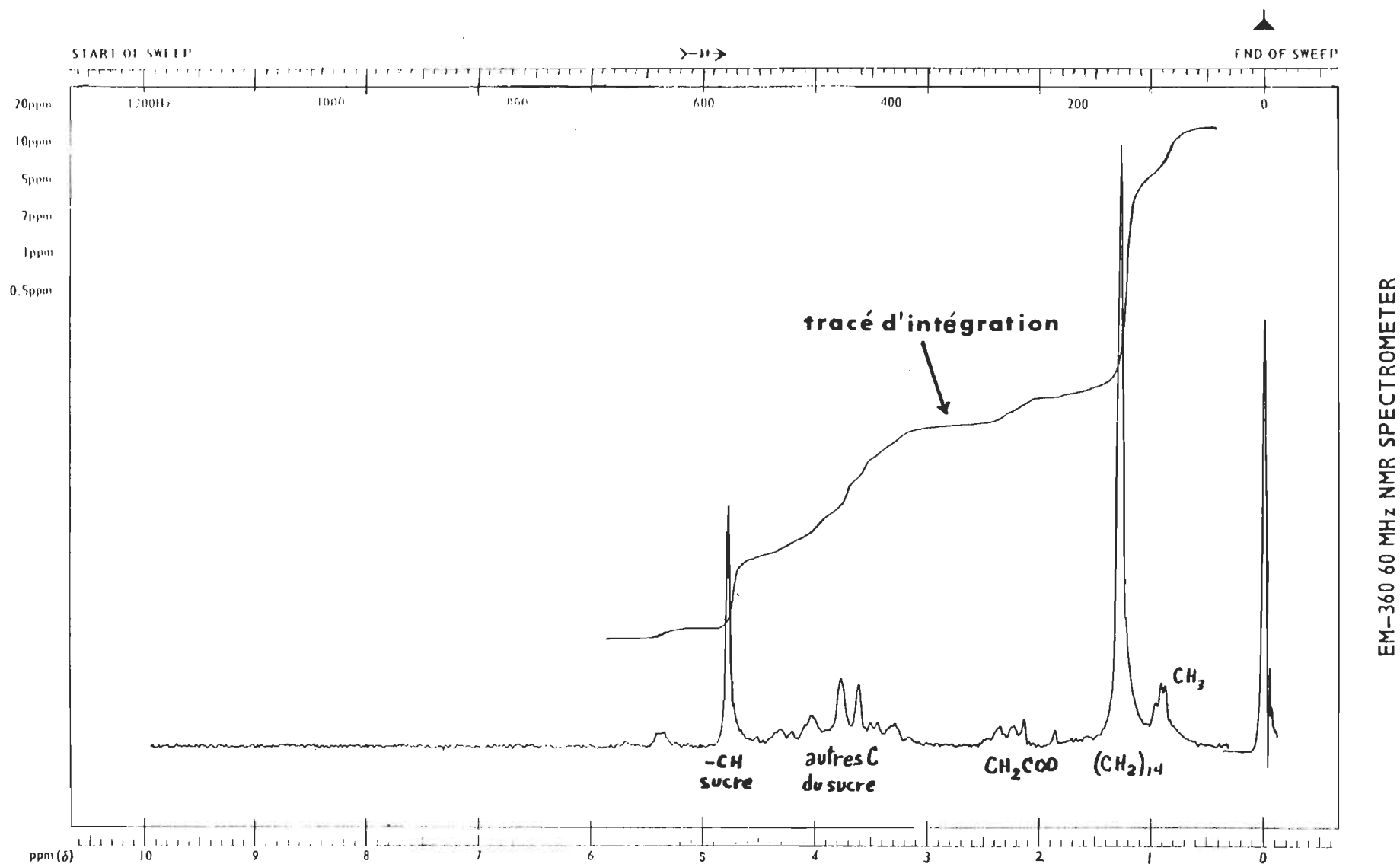
Résultats de l'analyse élémentaire (par combustion)  
des esters de sucrose et de mannose synthétisés

	<b>% C</b>	<b>% H</b>	<b>% O</b>	<b>% C</b>	<b>% H</b>	<b>% O</b>
	<u>calculés</u>			<u>obtenus</u>		
<u>Palmitoyl sucrose</u> ( $C_{28}H_{51}O_{12}$ )	58,03	8,81	33,16	56,34	8,61	31,74
<u>Palmitoyl mannose</u> ( $C_{22}H_{42}O_7$ )	63,16	10,05	26,79	54,47	10,03	25,93

La structure des esters quant à la position de la chaîne d'acide gras et l'isomérisation du sucre a été confirmée par RMN et spectroscopie infra-rouge (graphiques 1 à 4). Les spectres correspondent à ceux décrits dans la littérature (Asselineau, J. 1955; Osipov, L. et al. 1956; Yoshimoto, K. et al. 1979). Ces deux techniques d'analyses structurales rendent toutefois difficile la confirmation de la position de la substitution sur le sucre. Compte tenu de la réactivité de l'hydroxyle de la position 6 et compte tenu du fait que les esters obtenus sont monosubstitués, la probabilité est forte pour que la chaîne d'acide palmitique soit fixée en cette position.

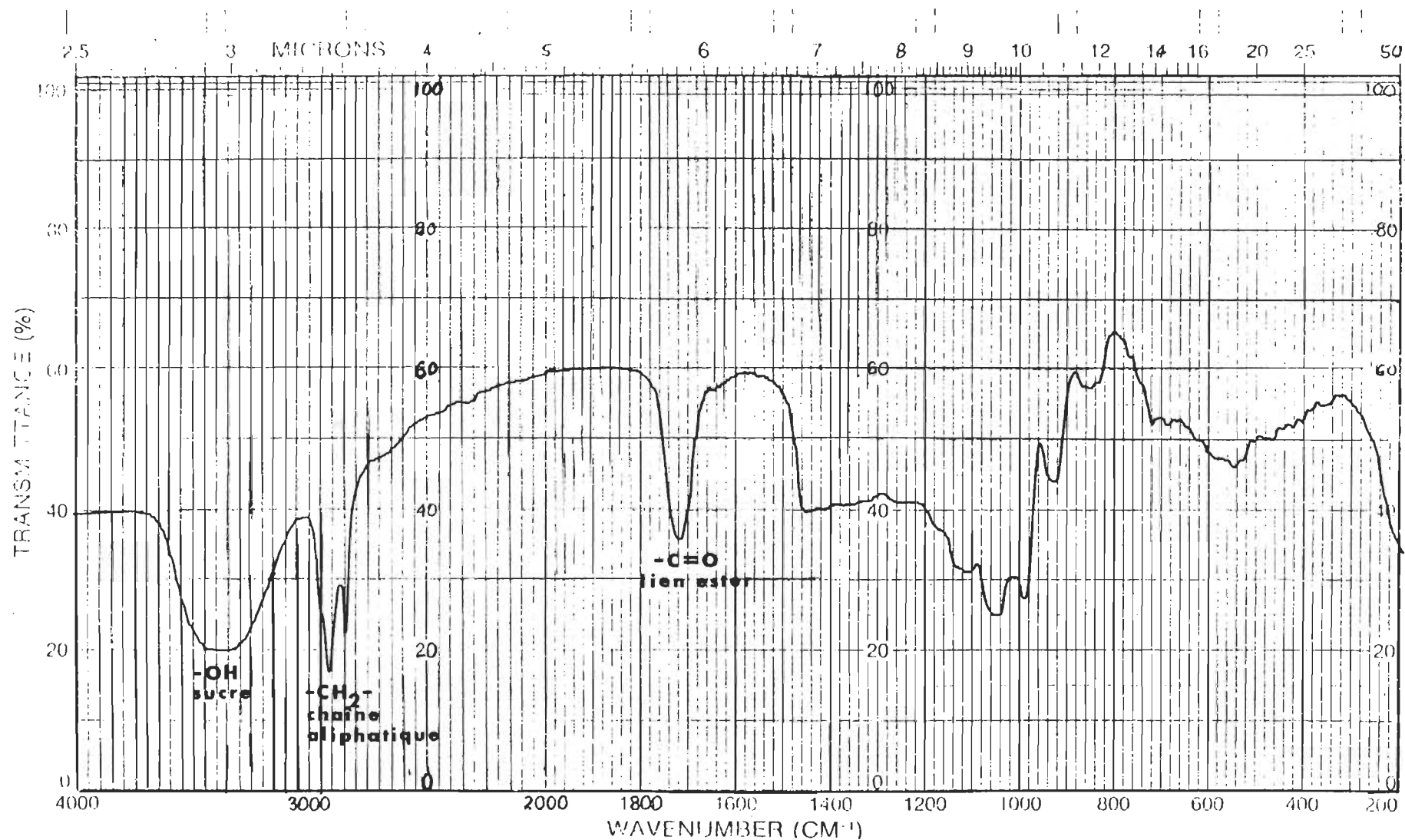
Pour l'analyse RMN du palmitoyl sucrose, l'échantillon a été préalablement dissous dans le méthanol deutéré ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) à une concentration suffisamment élevée pour obtenir un signal mesurable. Selon leur position (ppm) sur l'échelle du bas, il est possible de déterminer pour chaque pic ou groupe de pics, à quelle portion de la molécule cela correspond puisque chaque groupe fonctionnel conserve toujours sa même position caractéristique en RMN. Le tracé d'intégration nous renseigne sur le nombre de chaînes d'acide palmitique liées au sucre en indiquant le rapport du nombre d'atomes d'hydrogène de la chaîne par rapport au nombre d'atomes d'hydrogène du sucre. Sur le graphique 1, on retrouve de droite à gauche le pic du groupe  $-\text{CH}_3$  terminant la chaîne aliphatique de seize carbones, qui est elle-même représentée par le grand pic juste à côté à environ 1,2 ppm ( $(\text{CH}_2)_{14}$ ). Le pic du lien ester ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ) se situe à environ 3 ppm et les groupes  $-\text{OH}$  du sucrose se retrouvent à environ 4,8 ppm. Ces trois groupes de pics retrouvés en des endroits spécifiques sur le spectre i.e. les carbones de la chaîne aliphatique, le lien ester, les groupes hydroxyles du sucre, ainsi que le tracé d'intégration correspondent à la structure de l'ester de sucrose (Figure 13).

Pour l'analyse par spectroscopie infra-rouge (graphique 2), l'échantillon d'ester de



Graphique 1 – Spectre RMN du palmitoyl sucrose monosubstitué ( $C_{28}H_{51}O_{12}$ )

(amplitude = 3000 ; filtre = 0,5 sec. ; solvant = CD<sub>3</sub>OD)



Graphique 2 – Spectre infra-rouge du palmitoyl sucrose monosubstitué (C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>O<sub>12</sub>)

(scan = 3 ; fente = 2)

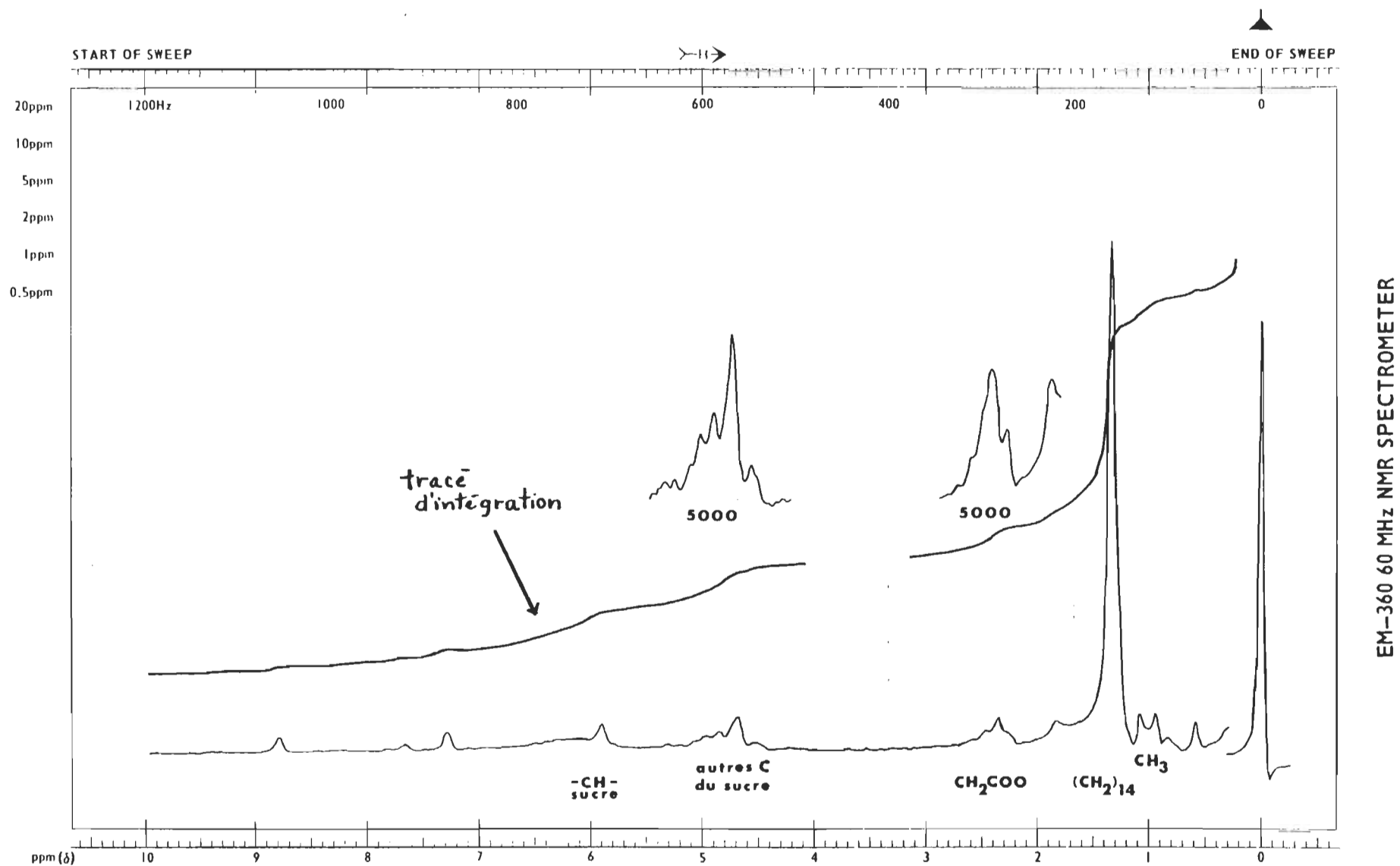
sucrose (préparé en pastille de KBr) nous renseigne également sur la structure à l'aide de la position spécifique de chaque pic qui correspond à un groupe fonctionnel en particulier. Ainsi, on retrouve les -OH du sucrose, les -CH<sub>2</sub>- de la chaîne aliphatique et le groupe -C=O (lien ester) à 3400, 2800 et 1700 cm<sup>-1</sup> respectivement.

Les mêmes types d'analyses ont été faites sur le palmitoyl mannose. Les spectres RMN (échantillon dissous dans la pyridine D<sub>5</sub>) et infra-rouge (graphiques 3 et 4) sont quasi identiques à ceux obtenus pour le palmitoyl sucrose et supportent fortement l'identification de la molécule synthétisée comme étant véritablement le palmitoyl mannose.

### **3.1.2. Contrôle du taux d'association :**

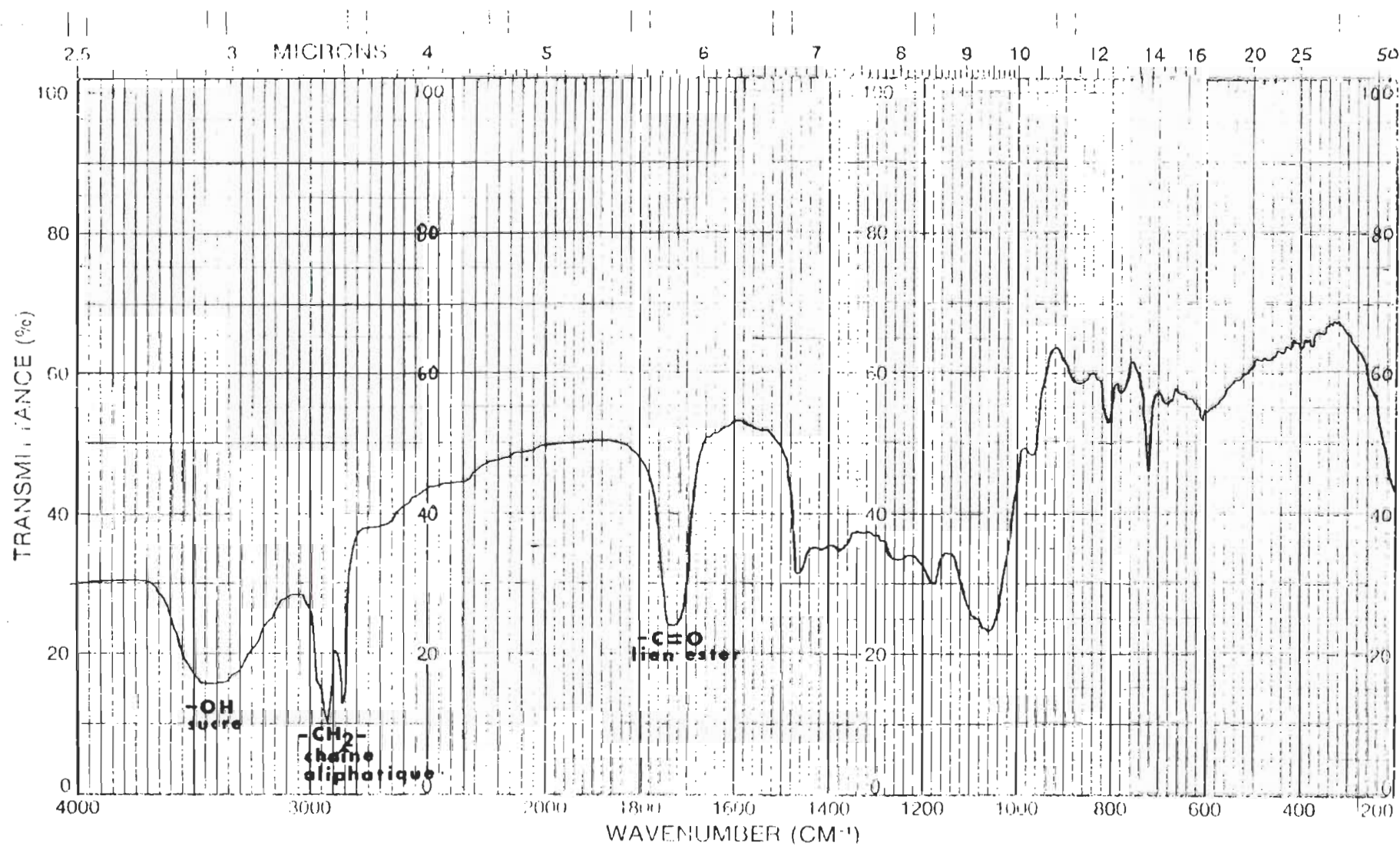
Le rapport protéine : lipide d'une préparation liposomale est un facteur qui risque d'influencer de façon importante la réponse finalement induite et qu'il est impérieux de contrôler. Nous avons donc établi les conditions permettant d'obtenir de façon reproductible des liposomes de rapport protéine:lipide prédéterminé et standardisé les techniques de préparation.

Le taux d'encapsulation est relativement facile à contrôler, puisque les lipides s'associent pour former les liposomes, enferment une certaine quantité de protéine solubilisée. Le point crucial de cette association est d'exercer un contrôle sur la reproductibilité de préparation des liposomes eux-mêmes. Les tests contrôles ont été faits à une concentration constante de lipides (10 µmoles / ml) (Graphique 5). On constate que le taux d'encapsulation (L / mole) diminue au fur et à mesure qu'augmente la concentration de protéine. A concentration fixe de protéine, on observe la même diminution du volume d'encapsulation en fonction de l'augmentation de la concentration de lipides.



Graphique 3 – Spectre RMN du palmitoyl mannose monosubstitué ( $C_{22}H_{42}O_7$ )

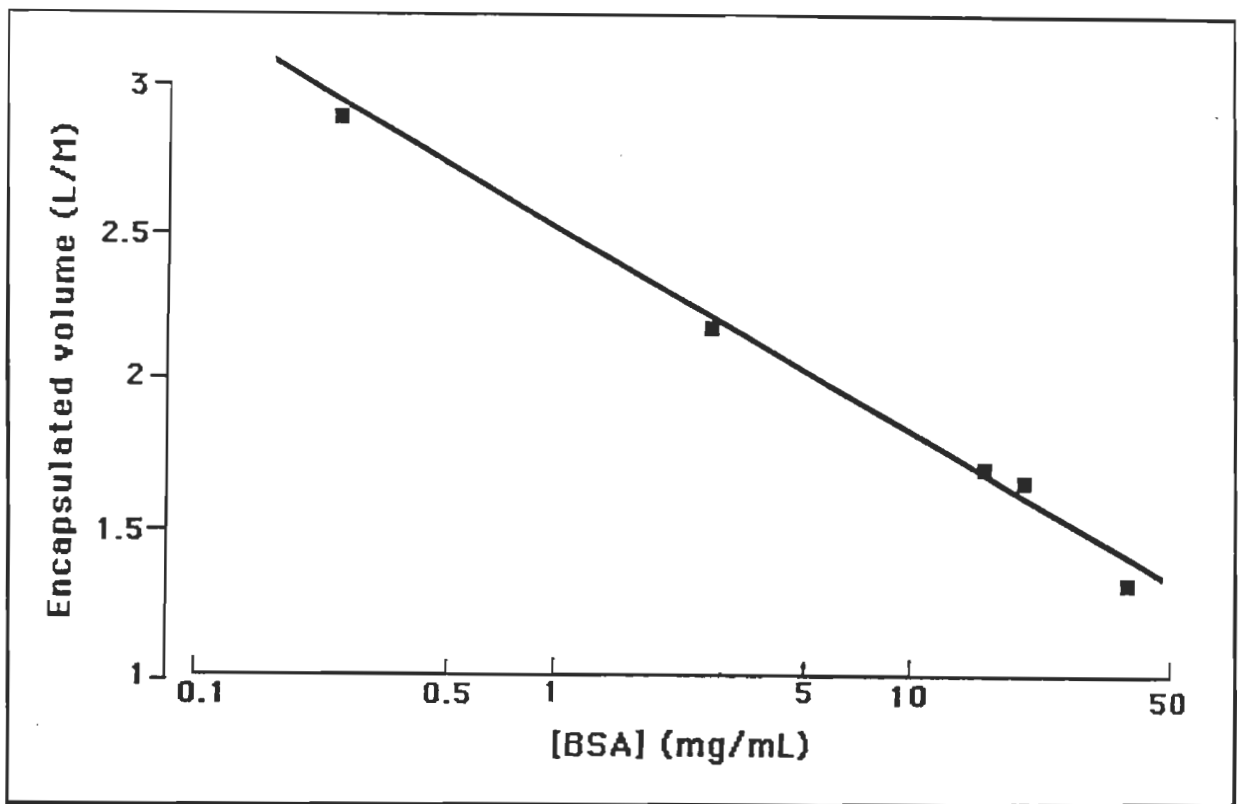
(amplitude = 400 ; filtre = 0,2 sec. ; solvant = pyridine D<sub>6</sub>)



Graphique 4 – Spectre infra-rouge du palmitoyl mannose monosubstitué ( $C_{22}H_{42}O_7$ )

(scan = 3 ; fente = 2)





Graphique 5 – Courbe standard d'encapsulation.

(Thérien, H.-M., Shahum, E. & Fortin, A. 1991)

Pour l'ancrage, la situation est plus complexe puisque trois paramètres entrent en jeu : les liposomes eux-mêmes, le pourcentage de modification du DPPE et l'efficacité de modification de la protéine. La courbe montrée au graphique 6 a été obtenue à concentration fixe de lipides (10  $\mu$ moles / ml ou 20  $\mu$ moles / ml). On observe une augmentation logarithmique du taux d'association. La dépendance entre le taux d'association et la quantité de protéine rappelle les interactions ligand-récepteur avec une saturation des sites à forte concentration de ligand, ici initiée à partir d'une concentration totale de BSA autour de 20 mg / ml.

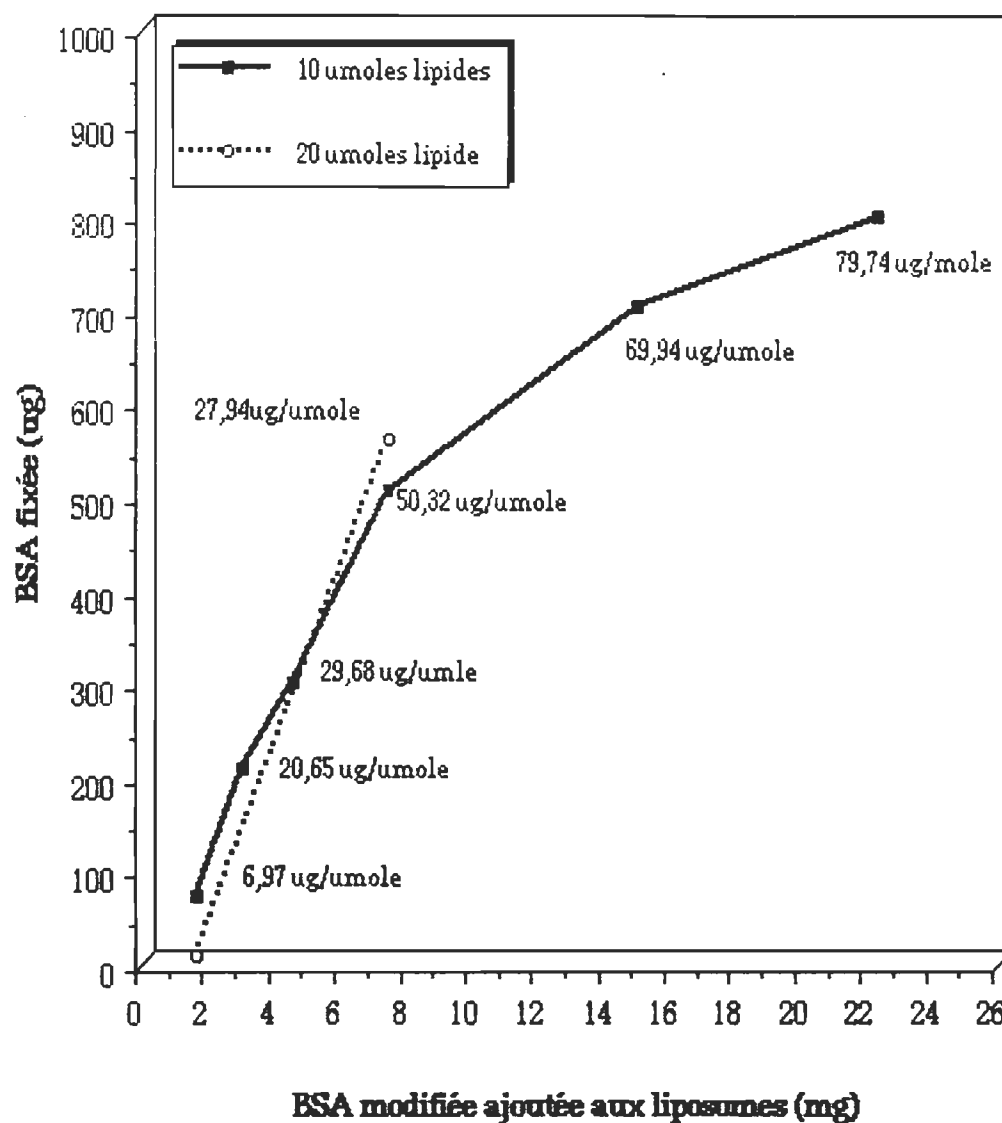
A partir de ces courbes de standardisation, nous avons établi les conditions permettant d'obtenir des liposomes ayant l'antigène ancré ou encapsulé dans les mêmes rapports protéine : lipide. Ce rapport, nous l'avons arbitrairement choisi relativement élevé à une valeur d'environ 35  $\mu$ g /  $\mu$ mole.

### 3.1.3. Caractéristiques des liposomes injectés *in vivo* :

Au tableau II et III, sont représentés les divers paramètres évalués pour les liposomes injectés en première ou seconde stimulation, avec ou sans ester de mannose.

Pour chaque type de préparation liposomale, l'efficacité d'encapsulation ou d'ancrage fut estimée en mettant en relation la quantité de lipide récupérée ( $\mu$ moles) et la quantité de protéine ( $\mu$ g) associée dans la fraction liposomale récupérée.









Au cours des différentes étapes de préparation, on constate une perte relativement faible de lipides, environ 10 % de la quantité de départ, tel que déterminé par le dosage du phosphate inorganique (Pi). Pour les diverses préparations liposomales, le rapport protéine:lipide se situe en moyenne à 38  $\mu$ g/ $\mu$ mole  $\pm$  6.



Graphique 6 – Courbe standard d'ancrage.









**TABLEAU II**

Caractéristiques des différentes préparations liposomales avec ESTER de MANNOSE  
utilisées pour la première stimulation (20 souris)

LIPOSOMES	DMPC ( $\mu$ moles)	BSA ajoutée (mg)	qté associée ( $\mu$ g)	Pi dosé ( $\mu$ moles)	protéine/lipide ( $\mu$ g/ $\mu$ mole)	diam. moyen (nm)
 BSA	50	70,86	1313,80	42,45	30,95	337
 BSA-EM <sub>0,08%</sub>	50	71,97	1491,43	41,71	35,76	363
 BSA-EM <sub>0,17%</sub>	50	74,22	1469,00	44,58	32,95	310
 BSA-EM <sub>0,36%</sub>	50	78,72	1819,26	45,98	39,57	353
 BSA	50	19,00	2154,71	32,35	66,61	331
BSA-  EM <sub>0,08%</sub>	50	19,00	1152,40	41,41	27,83	342
BSA-  EM <sub>0,17%</sub>	50	19,18	1569,30	46,72	33,59	372
BSA-  EM <sub>0,36%</sub>	50	19,18	1618,70	38,21	42,36	446
<b>X = 38,70 <math>\pm</math> 12,18    X = 357 <math>\pm</math> 41</b>						

**TABLEAU III**

Caractéristiques des différentes préparations liposomales avec ESTER de MANNOSE  
utilisées pour la seconde stimulation (10 souris déjà immunisées)

LIPOSOMES	DMPC ( $\mu$ moles)	BSA ajoutée (mg)	qté associée ( $\mu$ g)	Pi dosé ( $\mu$ moles)	protéine/lipide ( $\mu$ g/ $\mu$ mole)	diam. moyen (nm)
 BSA	25	39,84	946,33	21,30	44,43	301
 BSA-EM <sub>0,08%</sub>	25	40,10	998,85	21,94	45,53	339
 BSA-EM <sub>0,17%</sub>	25	74,59	1362,20	45,61	29,87	434
 BSA-EM <sub>0,36%</sub>	25	82,05	1479,40	45,81	32,29	437
 -BSA	25	10,00	587,80	16,04	36,65	348
BSA-  -EM <sub>0,08%</sub>	25	12,00	763,00	20,35	37,49	483
BSA-  -EM <sub>0,17%</sub>	25	12,00	779,50	17,47	44,62	420
BSA-  -EM <sub>0,36%</sub>	25	12,00	535,60	15,63	34,27	426
					<b>X = 38,14 ± 6,05</b>	<b>X = 399 ± 62</b>

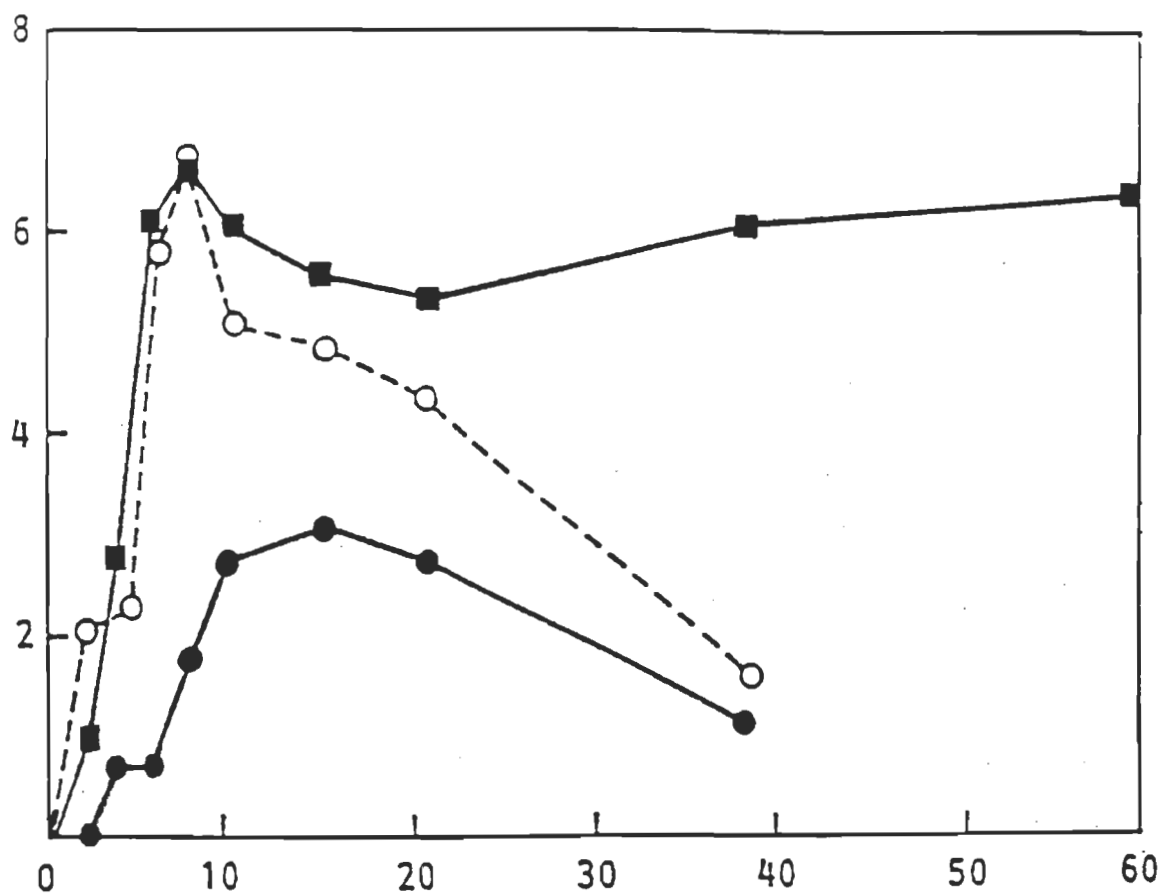
Après quelques passages sur filtres de polycarbonate, les liposomes obtenus sont de taille relativement homogène et unilamellaires (diamètre moyen de 357 nm). Enfin, les liposomes contenant de l'ester de mannose ont été examinés en microscopie électronique afin de savoir si l'insertion d'un glycolipide dans la bicouche liposomale pouvait avoir un effet sur l'aspect des liposomes. Les liposomes conventionnels (sans ester) sont généralement de forme plutôt sphérique. L'ajout de molécules d'ester de sucrose ou de mannose a semblé donner des populations de liposomes de taille homogène et de forme légèrement allongée par rapport aux liposomes sans ester.

### **3.2. Cinétique de la réponse humorale primaire :**

La production des anticorps, que ce soit en réponse à des liposomes ou à tout autre type de corps étranger (antigène) varie en fonction du temps, c'est ce qu'on appelle la cinétique de la réponse humorale. De plus, l'aspect de cette cinétique s'avère fortement influencé par le type d'antigène introduit *in vivo*, en termes de durée et d'intensité.

Ainsi, les résultats de nos travaux antérieurs (Graphique 7), ont d'une part permis de montrer les différentes cinétiques générées selon le type de formulation antigénique et d'autre part de déterminer où se situe le titre en anticorps maximum atteint suite à l'immunisation. Sur la base de ces résultats, il nous a été possible d'établir le calendrier d'immunisation ainsi que l'horaire des ponctions cardiaques.

On constate que les cinétiques obtenues en réponse à la BSA encapsulée et ancrée atteignent toutes deux un maximum autour du jour neuf suivant la première immunisation. Bien que l'intensité de la réponse induite par l'antigène ancré soit maintenue à un même niveau au-delà de 60 jours, l'intensité de la réponse induite



Graphique 7 – Production d'immunoglobulines totales induite par différentes formulations antigéniques incluant (●) BSA libre + liposomes, (○) BSA encapsulée ou (■) liée en surface, tracée en fonction du temps suivant l'immunisation.  
(Thérien, H.-M., Lair, D. & Shahum, E. 1990)

par l'antigène encapsulé décroît très rapidement après avoir atteint son maximum pour devenir quasi nul dès le jour 40. Ainsi, le jour dix a été choisi comme premier "point" d'étude et le jour 28 comme second "point" qui permettent de bien apprécier la différence entre l'antigène ancré et l'antigène encapsulé.

Après restimulation, une étude cinétique faite préalablement dans notre laboratoire montre que la réponse atteint pour toutes les préparations antigéniques un maximum autour du jour six qui se maintient pendant plusieurs jours. Au jour 60, la réponse est encore forte pour toutes les préparations mais la baisse de la réponse à l'antigène libre et à l'antigène encapsulé est déjà amorcée. Nous avons donc choisi d'étudier aussi la réponse à deux temps fixes : un temps au maximum de l'intensité (10 jours) et un temps plus éloigné (90 jours) où la décroissance de la réponse se devait d'être plus marquée.



### **3.3. Impact des différentes préparations liposomales sur la production des immunoglobulines totales :**

#### **3.3.1. BSA libre et BSA associée aux liposomes :**

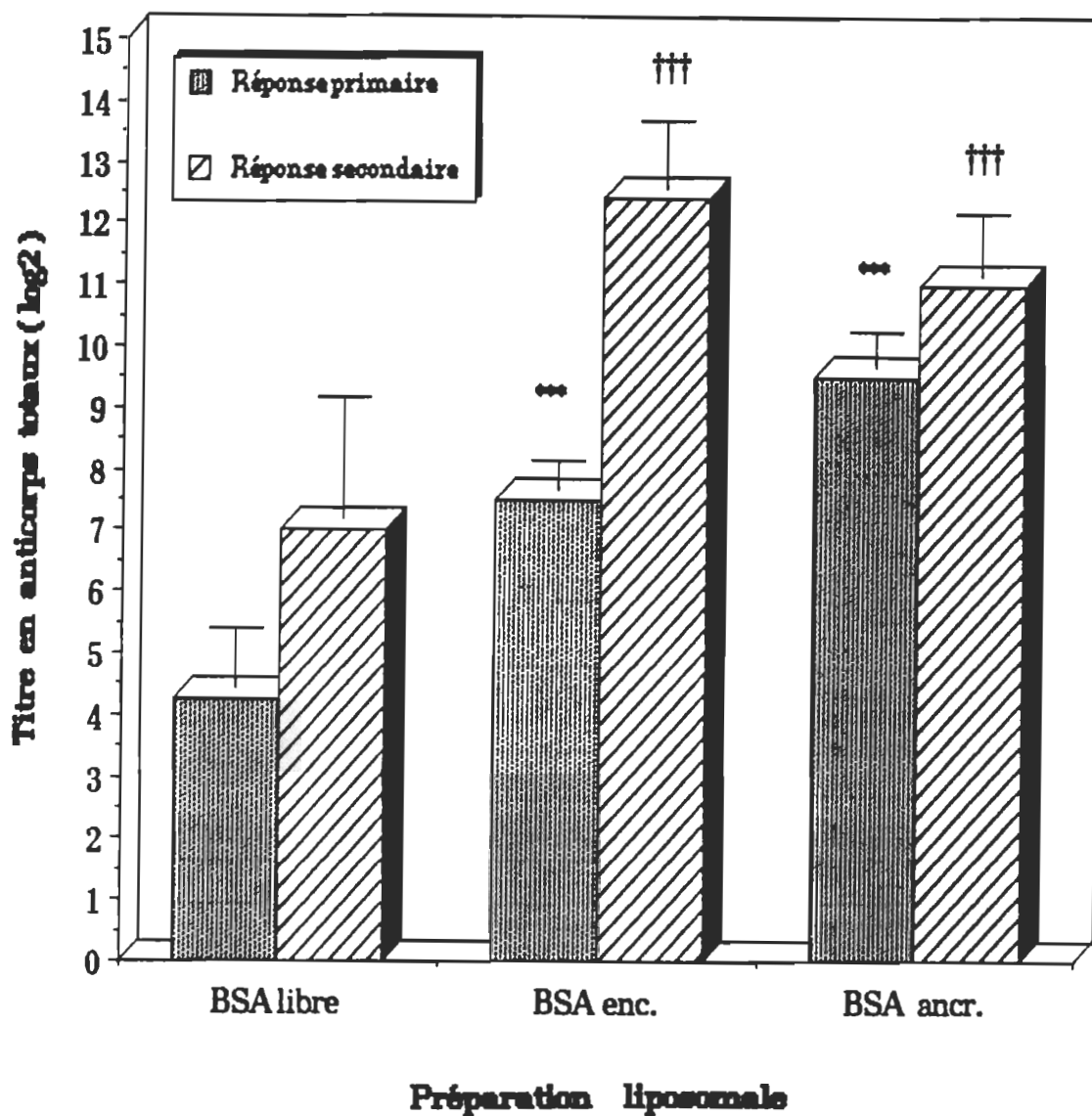
Dans le graphique 8, les résultats obtenus suite à l'association de l'antigène avec le véhicule liposomal sont comparés à la réponse obtenue pour l'antigène libre.

En réponse primaire i.e. dix jours après la première immunisation, la BSA libre induit à elle seule un titre en anticorps totaux relativement faible ( $4,25 \pm 0,96$ ). Le titre en anticorps pour la BSA associée aux liposomes par encapsulation est de  $7,5 \pm 0,5$  soit 9,5 fois plus et celui de la BSA ancrée est de  $9,5 \pm 0,6$  soit 38 fois plus.

En réponse secondaire i.e dix jours après la seconde immunisation, on constate de façon générale que les trois types de formulations antigéniques affichent un effet similaire à celui de la réponse primaire mais de plus forte intensité. En effet, les résultats font ressortir le fait que l'association "BSA : liposome", que ce soit par encapsulation ou par ancrage, induit une production d'anticorps anti-BSA accrue. Dans tous les cas d'association, l'augmentation de la réponse humorale est hautement significative ( $p < 0,001$ ).

#### **3.3.2. BSA encapsulée avec ester de sucrose ou de mannose :**

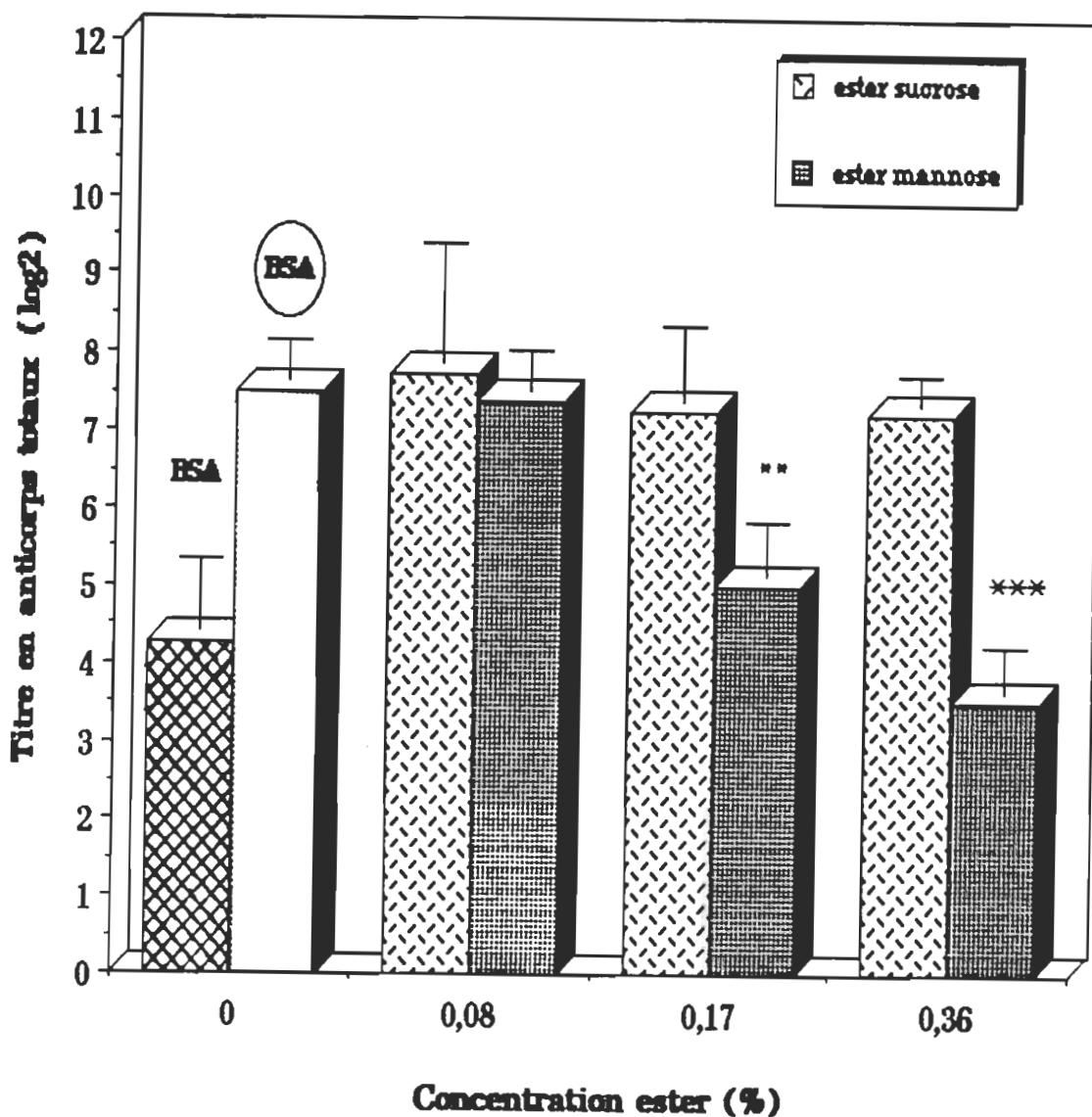
Le graphique 9, compare les titres en anticorps totaux obtenus pour une réponse primaire induite par l'antigène encapsulé dans des liposomes contenant une quantité croissante d'ester de mannose. On constate une relation inverse entre la quantité d'anticorps et la quantité d'ester de mannose. La comparaison des données à celles obtenues avec l'antigène encapsulé sans ester montre bien le caractère significatif de la différence avec l'augmentation de la concentration d'ester. Cet effet semble



Graphique 8 - Effet de la BSA libre et associée aux liposomes (encapsulation & ancrage) sur le titre en anticorps totaux, en réponse primaire (jour 10) et secondaire (jour 10).

Les symboles représentent le niveau de signification des différences par rapport à la BSA libre en réponse primaire (\*) et par rapport à la BSA libre en réponse secondaire (†).

\*\*\*  $p < 0,001$     †††  $p < 0,001$



Graphique 9 - Effet des esters de sucrose et de mannose au jour dix suivant la première stimulation sur le titre en anticorps totaux, en réponse à la BSA encapsulée.

Les symboles représentent le niveau de signification des différences par rapport à l'ester de sucrose (\*).

\*\*  $p < 0,01$

\*\*\*  $p < 0,001$

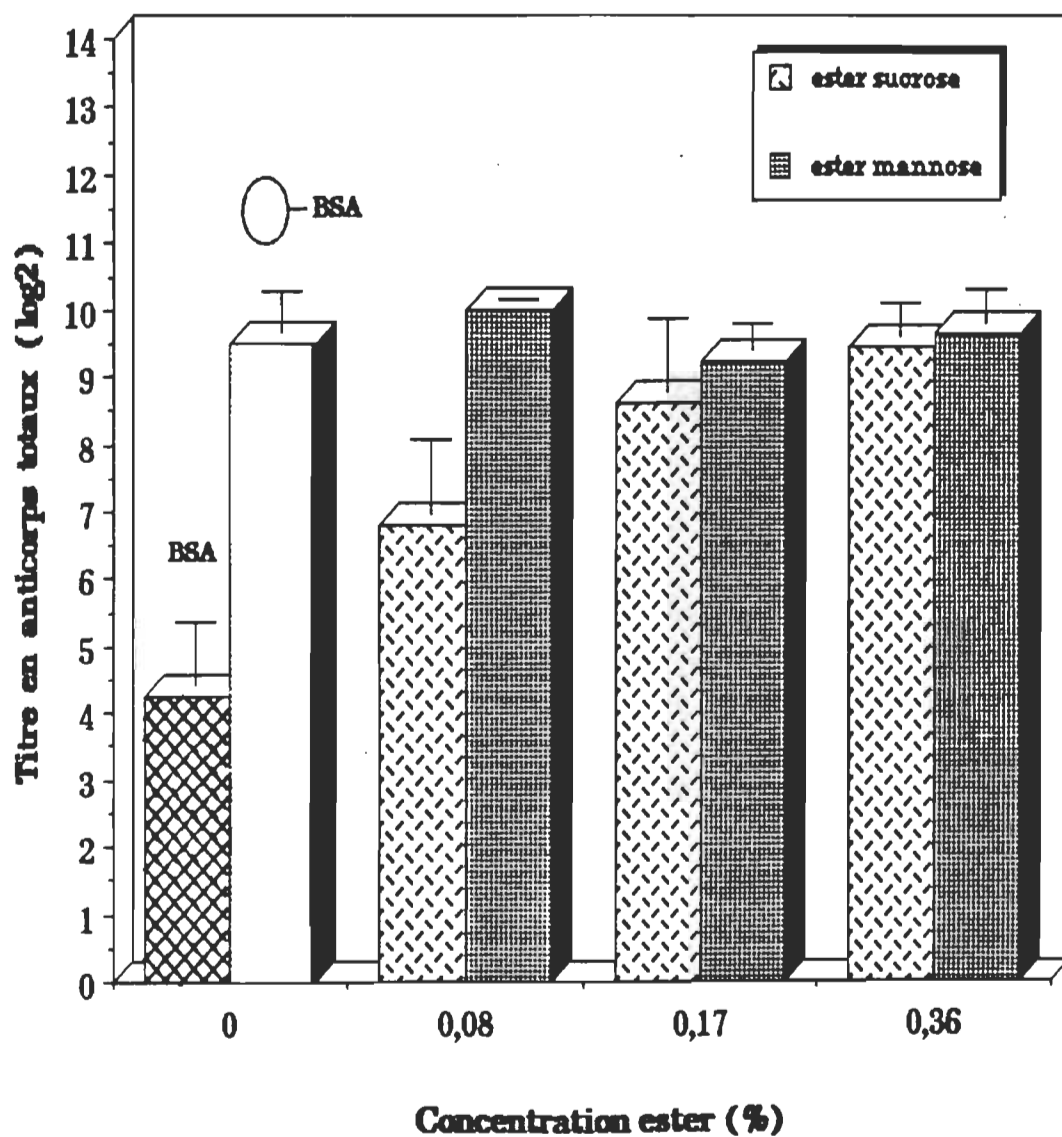
relié à la présence du résidu mannose, puisque l'inclusion d'un ester de sucre apparenté est sans effet sur la réponse induite.

### **3.3.3. BSA ancrée avec ester de sucrose ou de mannose :**

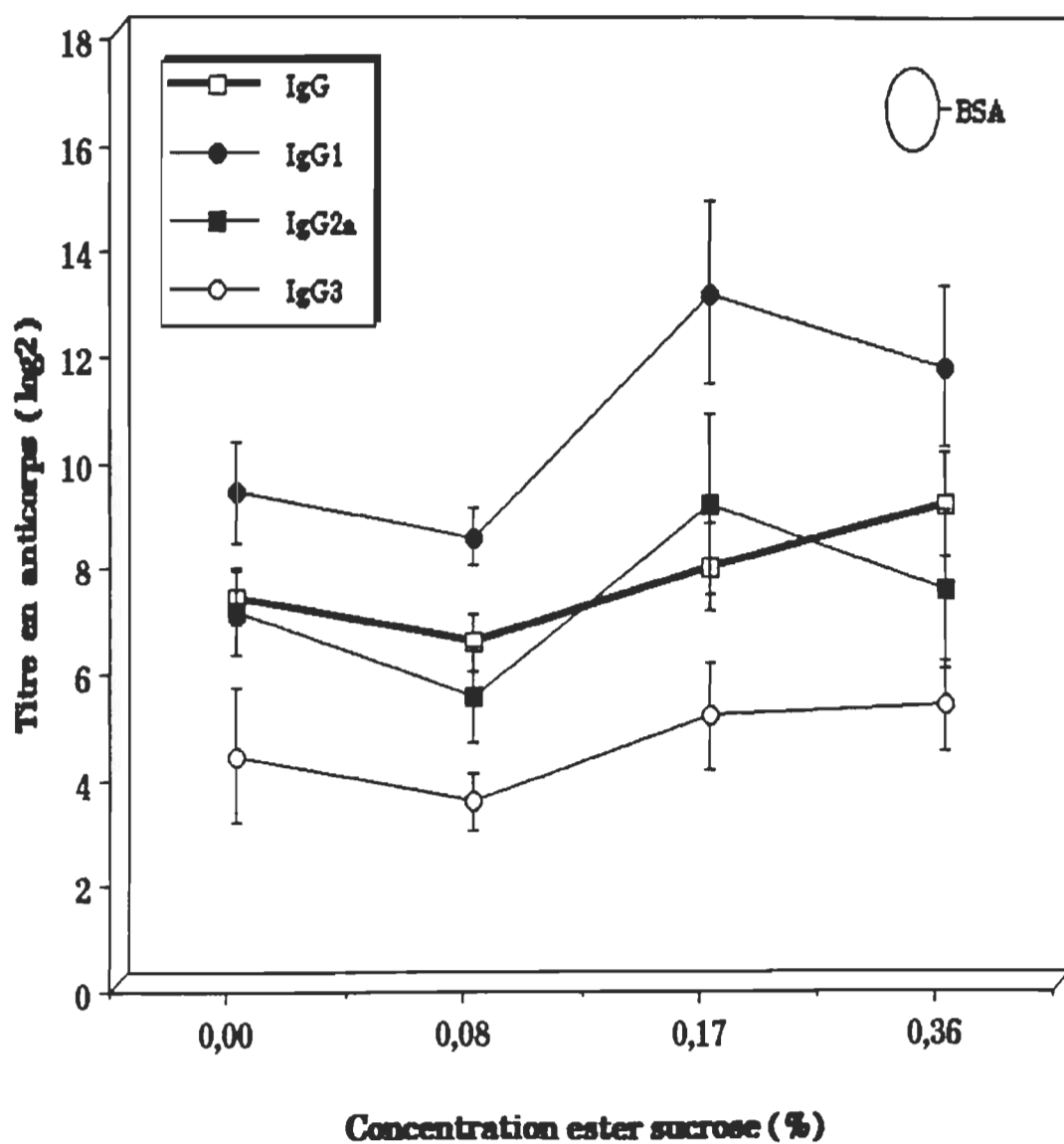
Lorsque la BSA est exposée à la surface liposomale avec des quantités croissantes d'ester de sucrose ou de mannose, on constate que la réponse humorale primaire induite n'est pas significativement modifiée en terme d'intensité.

En effet, comme l'illustre le graphique 10, l'incorporation d'ester de mannose dans ce cas (ester et BSA exposés), n'influence pas le titre en anticorps totaux en fonction de la concentration. On obtient pour les trois concentrations d'ester de mannose, un niveau d'immunoglobulines similaire à celui atteint en réponse à la BSA ancrée sans ester soit environ 9,5.

L'ester de sucrose, lui non plus, ne produit pas de changement majeur de la réponse en fonction de la concentration. La baisse observée à la concentration 0,08 %, bien que significative, n'est pas confirmée par la mesure des classes d'immunoglobulines ( ex. graphique 11). L'ensemble des résultats obtenus nous permettent donc de conclure que ni l'ester de mannose, ni l'ester de sucrose n'influencent de façon significative la réponse humorale primaire de l'antigène ancré.



Graphique 10 - Effet des esters de sucrose et de mannose au jour dix suivant la première stimulation sur le titre en anticorps totaux, en réponse à la BSA ancrée.



Graphique 11 – Effet de la concentration en ester de sucrose sur les titres en IgG, IgG1, IgG2a et IgG3 en réponse primaire.

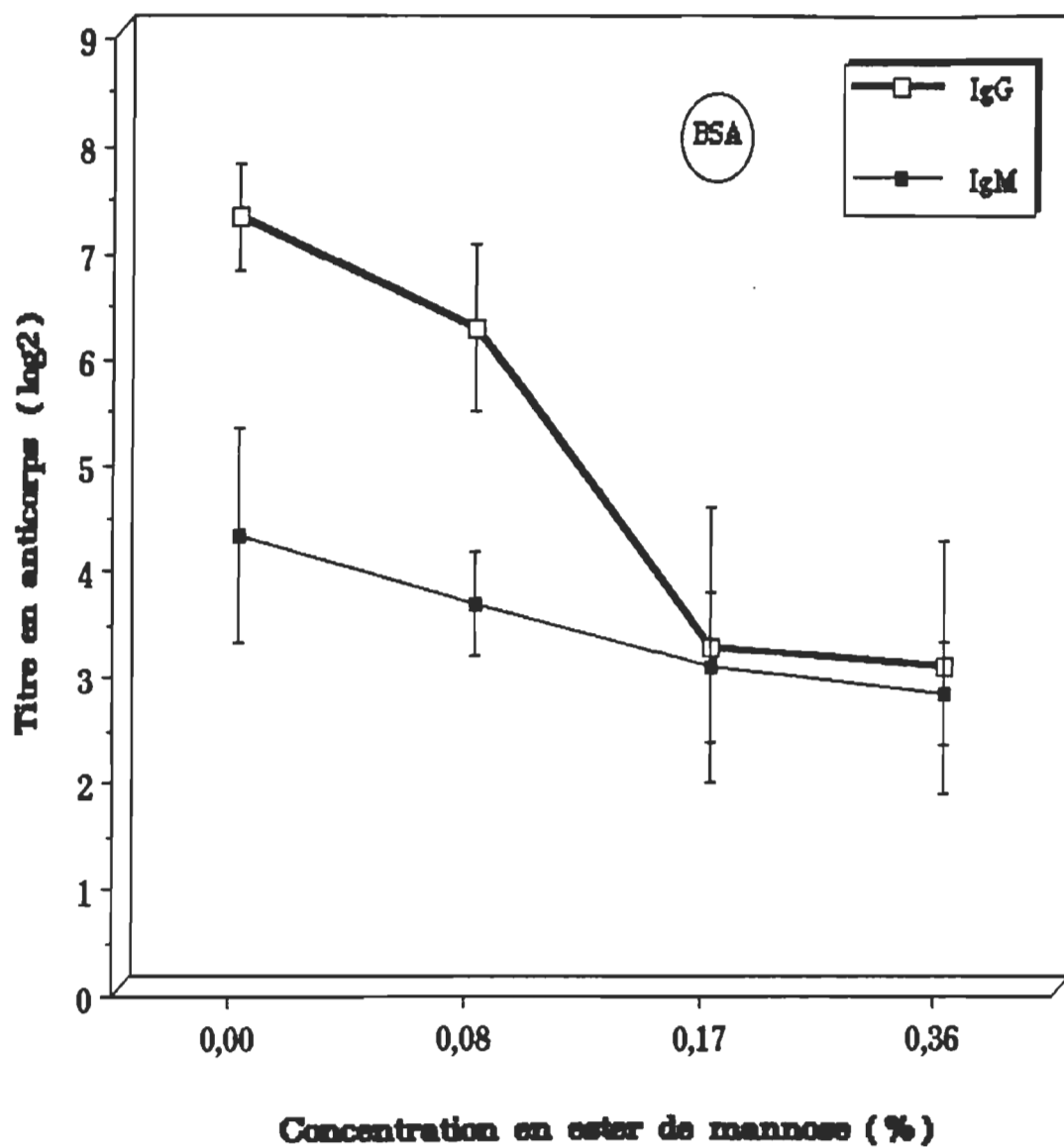
### **3.4. Impact des différentes préparations liposomales sur la production des isotypes d'immunoglobulines :**

L'ensemble des résultats concernant le titre total d'anticorps en réponse primaire comme secondaire indique que seul l'antigène encapsulé est influencé de façon spécifique par l'ester de mannose. La réponse anti-BSA induite par l'antigène encapsulé en présence d'ester de mannose a été étudiée plus en détails afin de déterminer si la diminution dans la production d'immunoglobulines totales pouvait s'expliquer par une diminution sélective d'une classe particulière d'immunoglobuline.

Les graphiques 12 et 13, comparent l'effet de la concentration en ester de mannose sur les titres en IgG et IgM au jour dix en réponse primaire et secondaire respectivement.

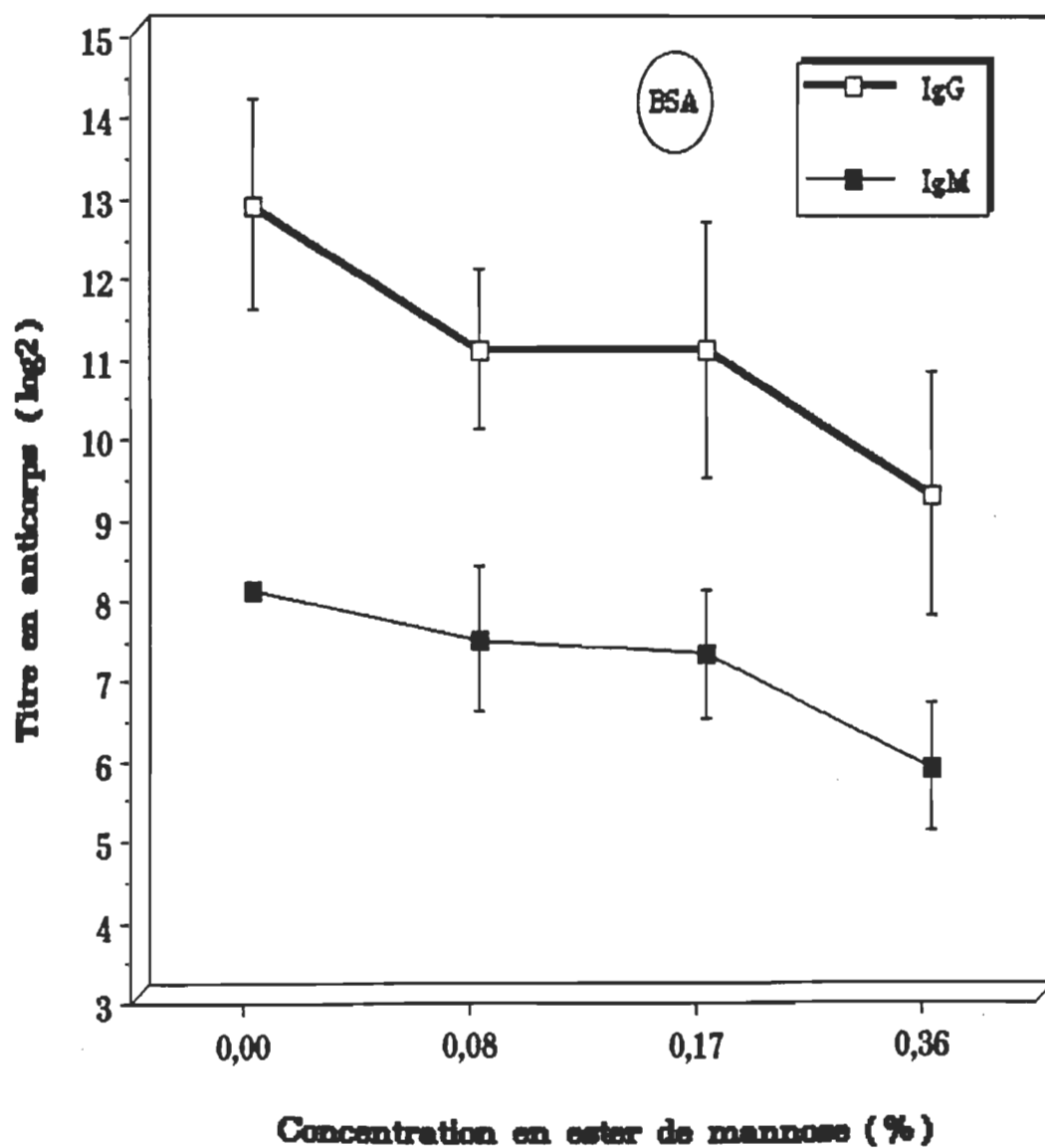
On constate qu'en réponse primaire comme en réponse secondaire les titres en IgG et les titres en IgM diminuent tous deux en accord avec la diminution en immunoglobulines totales observée. D'une part, en réponse primaire (graphique 12), la diminution en IgM est moins importante que la diminution en IgG, soit 2,8 et 19 fois respectivement par rapport à l'antigène encapsulé sans ester. D'autre part, après restimulation (graphique 13), les diminutions en IgM et IgG (4,6 et 12 fois par rapport à l'antigène sans ester) sont du même ordre de grandeur qu'en réponse primaire bien que le titre soit plus élevé. On observe donc dans les deux cas une diminution du rapport IgG/IgM en fonction de la concentration d'ester.

Enfin, l'effet de l'ester de mannose peut également être observé sur la production des isotypes d'IgG soit : IgG1, IgG2a et IgG3 illustré au graphique 14. Les résultats pour ces trois sous-classes d'anticorps ne sont cependant montrés qu'en réponse

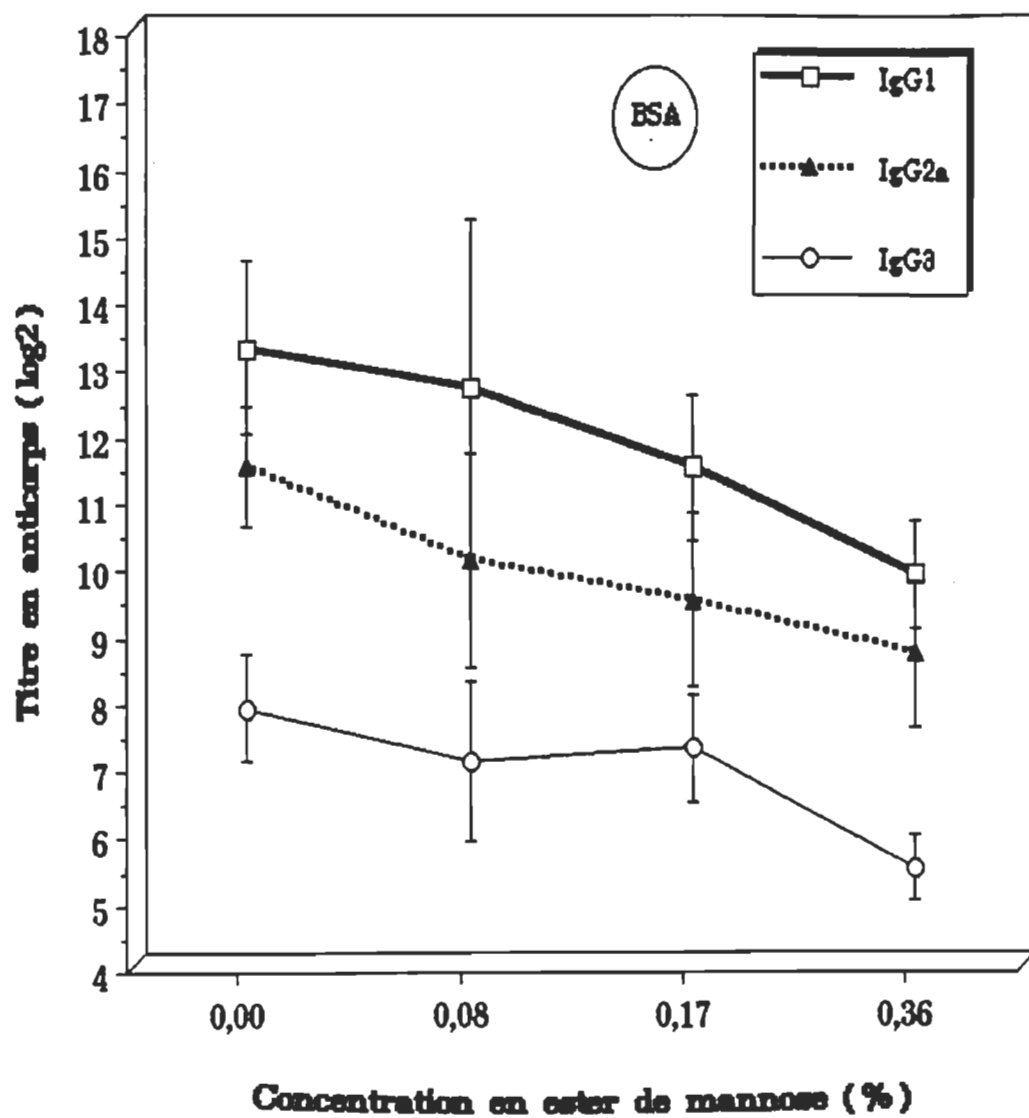


Graphique 12 – Effet de la concentration en ester de mannose sur les titres en IgG & IgM en réponse primaire.





Graphique 13 – Effet de la concentration en ester de mannose sur les titres en IgG & IgM en réponse secondaire.



Graphique 14 - Effet de la concentration en ester de mannose sur les titres en IgG1, IgG2a et IgG3 en réponse secondaire.

secondaire, puisque suite à la première immunisation (jour dix) les taux mesurés s'avéraient trop faibles pour être significativement interprétables. On constate une diminution quasi parallèle des trois classes d'IgG.

De ces résultats, on peut conclure que l'ester de mannose incorporé dans la bicouche liposomale (lorsque la BSA est encapsulée), diminue préférentiellement la production d'IgG mais n'affecte aucune sous-catégorie d'IgG particulièrement.

Comme c'était le cas pour la réponse totale, le niveau de signification (Tableau IV) de la différence entre la réponse obtenue à chacune des concentrations d'esters de mannose et la réponse obtenue en absence de l'ester s'accroît avec l'augmentation de la concentration d'ester. Ces résultats à la fois supportent et confirment l'effet général observé quant à la diminution de l'intensité de la réponse humorale induite par l'antigène encapsulé en présence d'ester de mannose. Les mêmes mesures du titre des différentes classes d'immunoglobulines pour des liposomes contenant l'ester de sucrose confirment le manque d'effet de ce sucre apparenté.

**TABLEAU IV**

Niveaux de signification de la différence entre la réponse  
obtenue à chaque concentration (%) d'ester de mannose et la réponse  
obtenue en absence d'ester, avec l'antigène encapsulé  
(Test de Student)

		0,08 %	0,17 %	0,36 %
<u>Rép. prim.</u>	<b>Ig totales</b>	NS	<0,001	<<0,001
	<b>Ig G</b>	<0,10	<0,001	<<0,001
	<b>Ig M</b>	<0,10	<0,05	<0,05
<u>Rép. sec.</u>	<b>Ig G</b>	<0,05	<0,05	<0,002
	<b>Ig M</b>	<0,50	<0,20	<0,001
	<b>Ig G1</b>	NS	<0,05	<0,001
	<b>Ig G2a</b>	<0,10	<0,02	<0,005
	<b>Ig G3</b>	<0,50	<0,50	<0,005

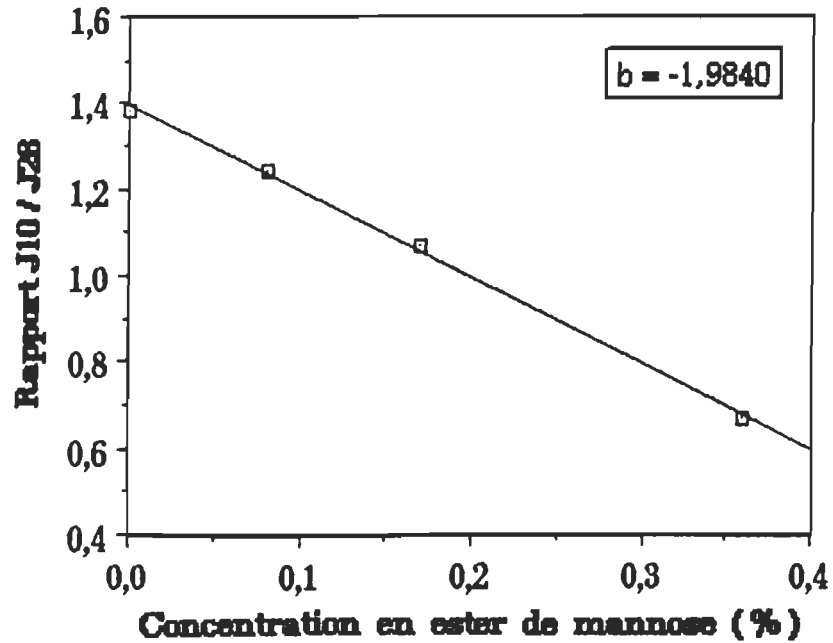
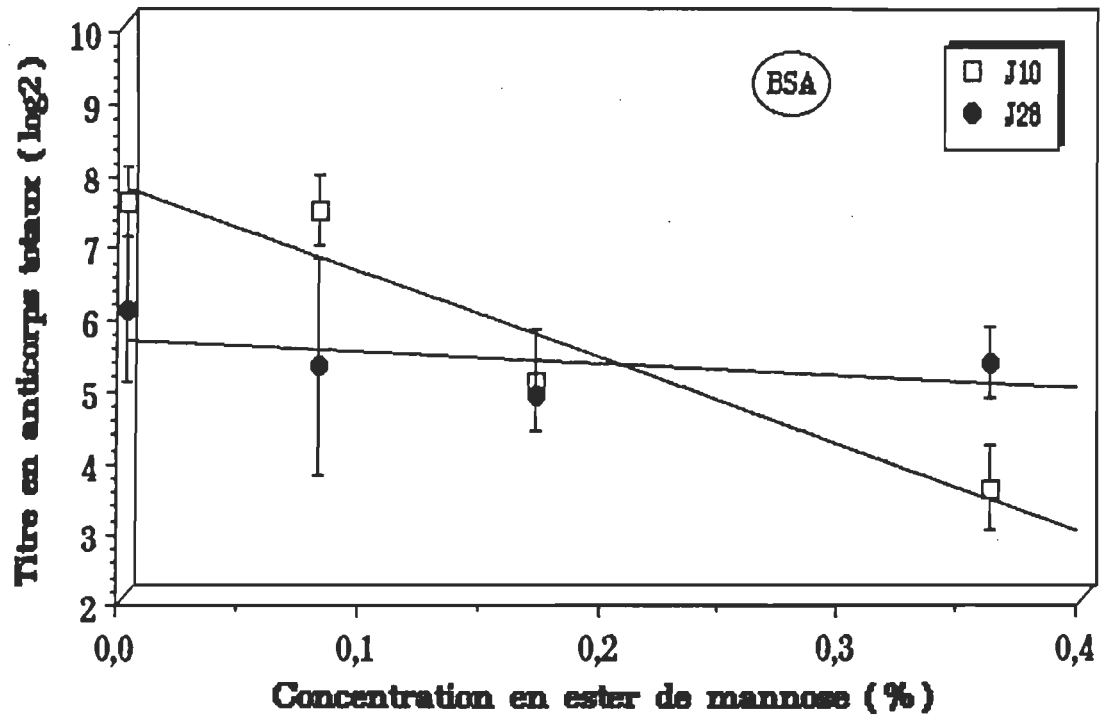
### 3.5. Effet des esters de sucrose et de mannose sur la durée de la réponse humorale :

L'ester de mannose non seulement influence l'intensité de la réponse immune mais encore sa durée.

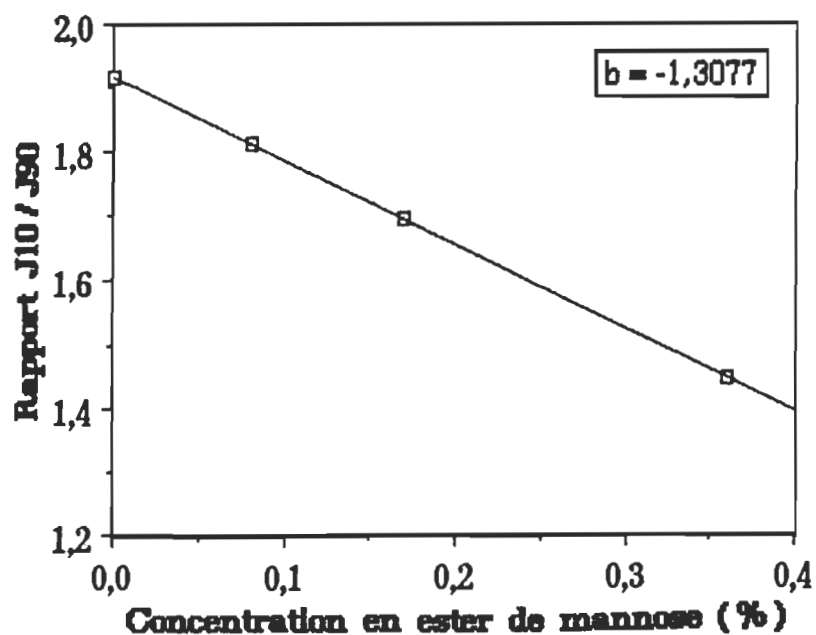
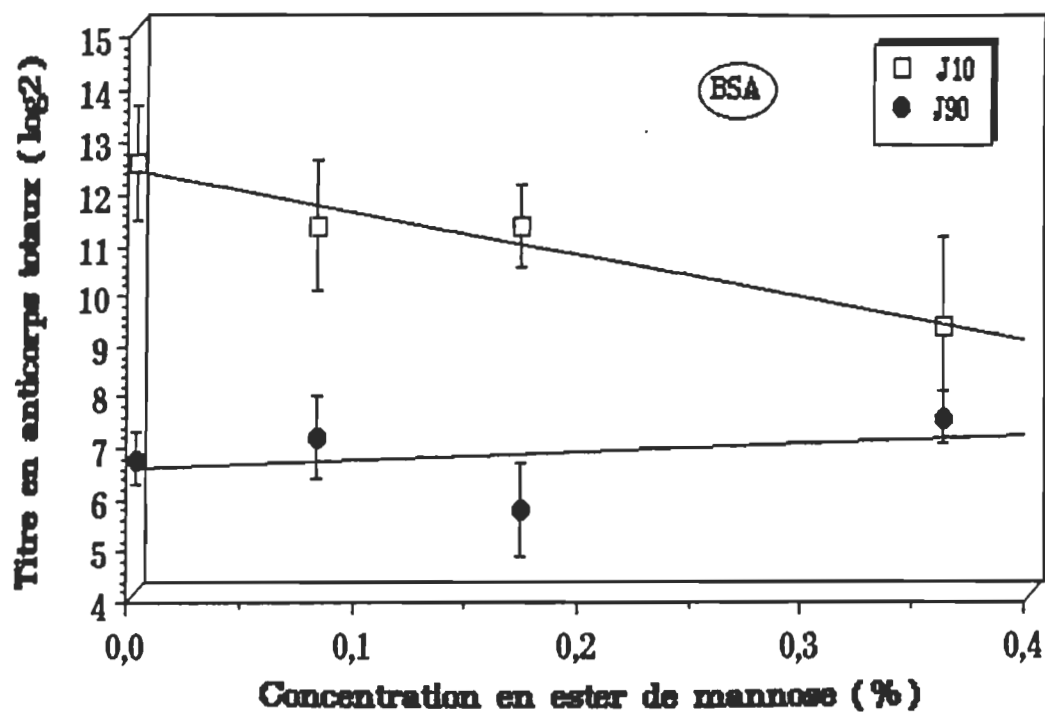
L'effet sur la durée de la réponse primaire pour l'antigène encapsulé est montré au graphique 15. Les deux droites représentent les données obtenues en titre d'anticorps totaux aux jours 10 ( $r=0,959$ ) et 28 ( $r=0,510$ ) suivant l'immunisation. Les pentes très différentes obtenues pour les deux droites montrent que la présence d'ester de mannose contribue à maintenir la réponse au niveau maximal atteint dans les premiers jours suivant l'immunisation. Le même effet peut être observé en réponse secondaire (graphique 16) où les titres d'anticorps ont été mesurés à des temps plus distancés soit jour 10 et 90 compte tenu de la durée normalement plus longue de cette réponse secondaire. On constate une diminution significative au jour 10 ( $r=0,973$ ) mais aucun effet important au jour 90 ( $r=0,645$ ).

On a déjà mentionné le manque d'effet de l'ester de mannose sur l'intensité de la réponse induite par l'antigène ancré. Ce manque d'effet est aussi observé sur la durée de la réponse (graphiques 17 et 18). On constate, en réponse primaire, aucun effet à jour 10 ( $r=0,135$ ) et un effet inversé mais très faible au jour 28. En réponse secondaire, les résultats plus dispersés ne montrent aucune relation linéaire forte ni au jour 10 ( $r=0,453$ ) ni au jour 90 ( $r=0,867$ ).

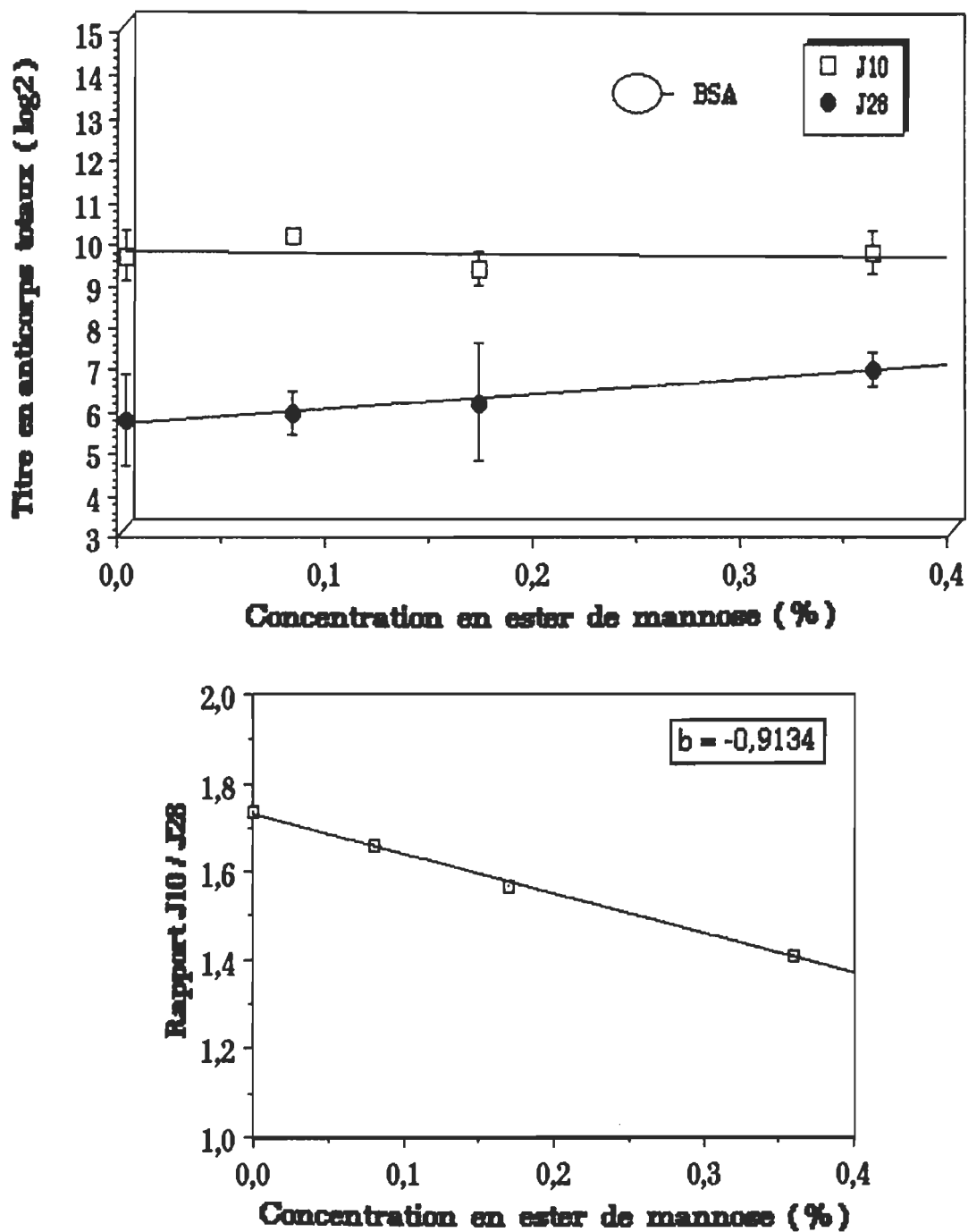
Afin de vérifier la spécificité de l'effet de l'ester de mannose sur l'intensité et la durée de la réponse, on a voulu voir si l'ester d'un sucre apparenté, le sucrose, avait une telle influence sur la réponse humorale. Comme l'illustre bien le graphique 19 (réponse primaire; BSA encapsulée), on ne dénote pas d'effet significatif sur les



Graphique 15 – Effet de la concentration en ester de mannose sur la durée de la réponse primaire induite par la BSA encapsulée.

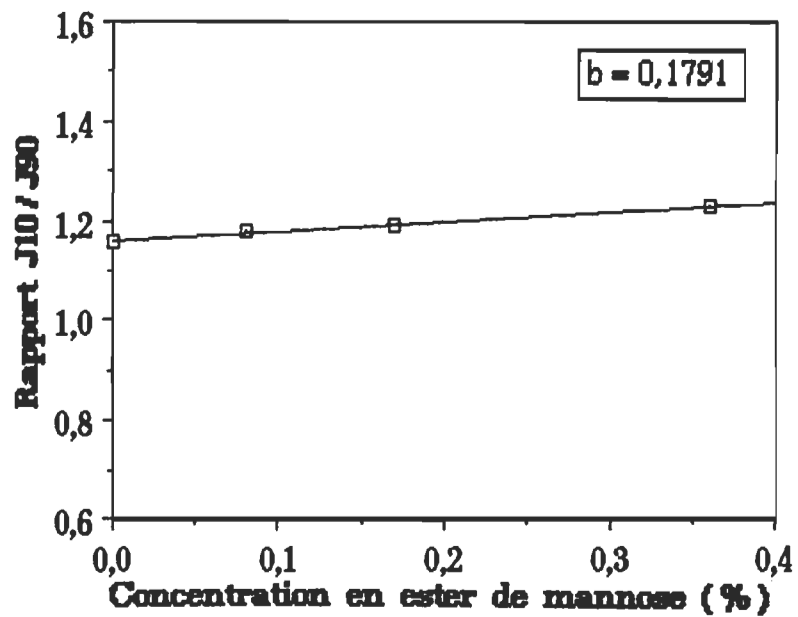
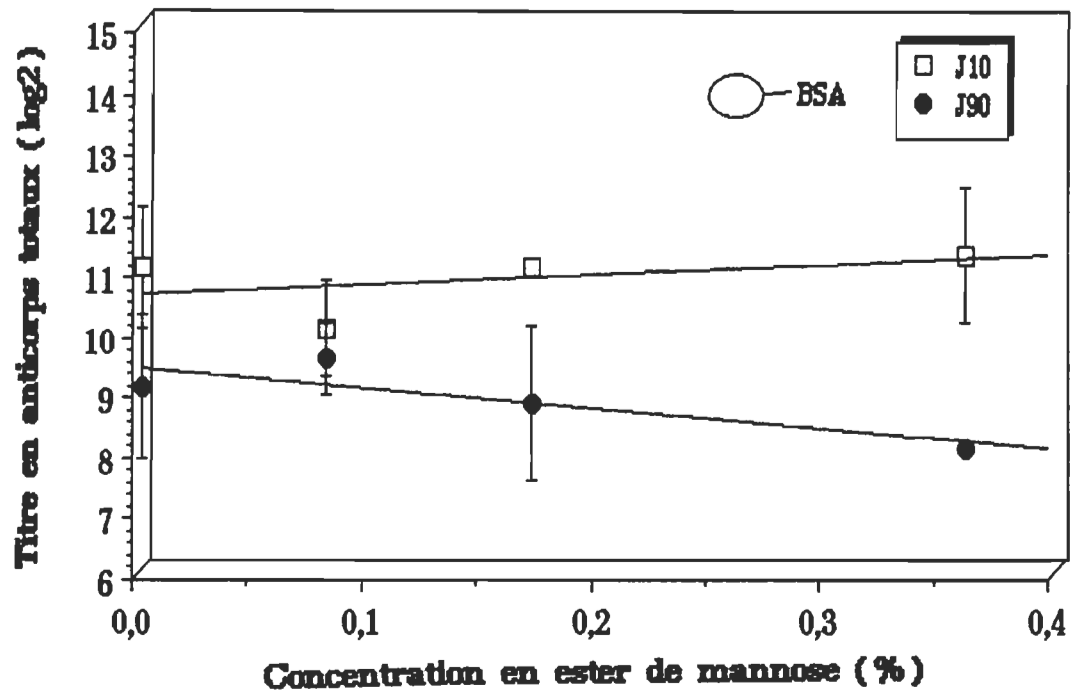


Graphique 16 - Effet de la concentration en ester de mannose sur la durée de la réponse secondaire induite par la BSA encapsulée.



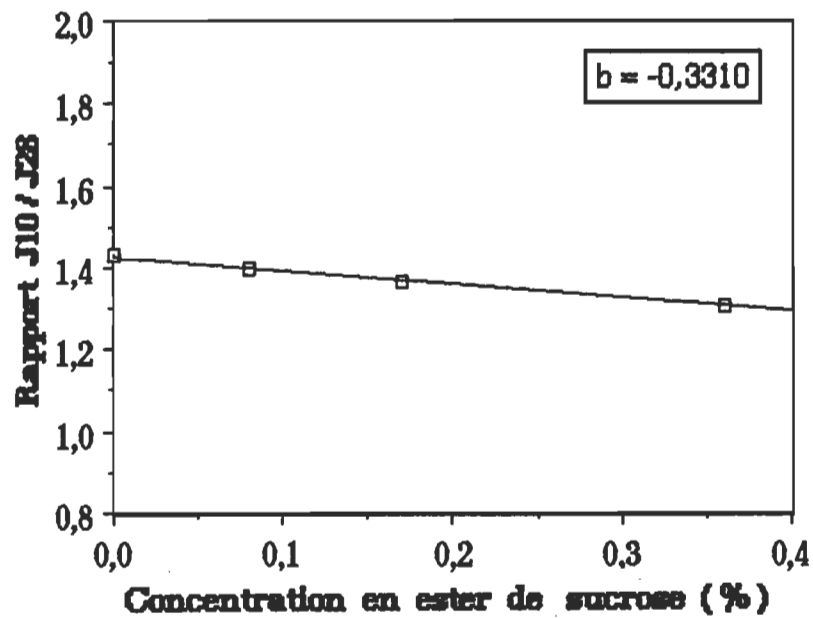
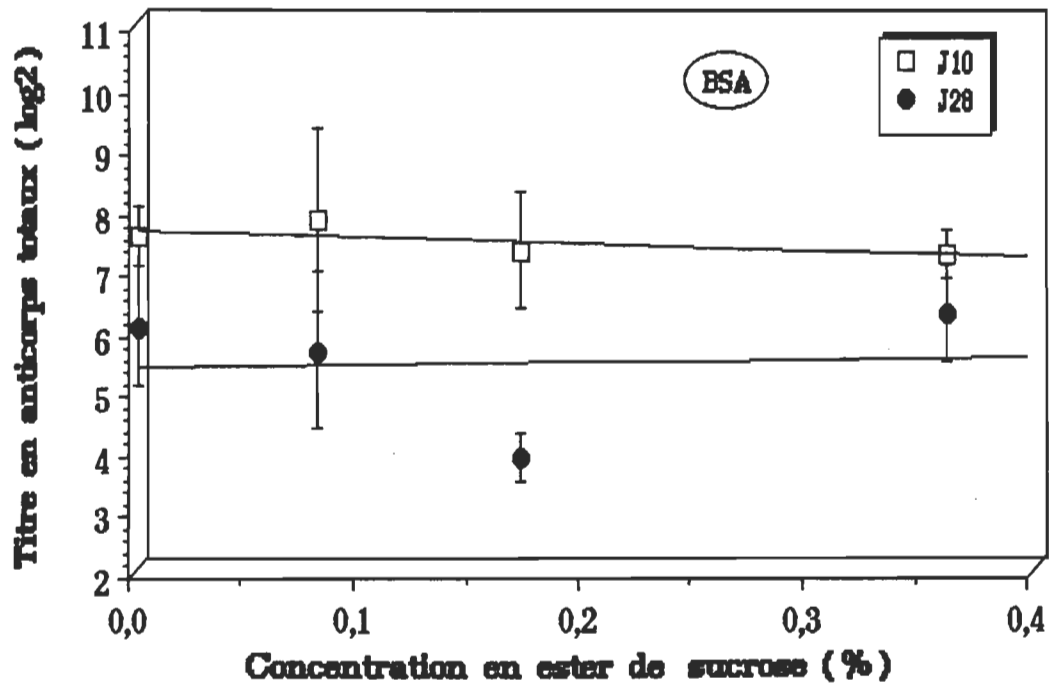
Graphique 17 – Effet de la concentration en ester de mannose sur la durée de la réponse primaire induite par la BSA ancrée.



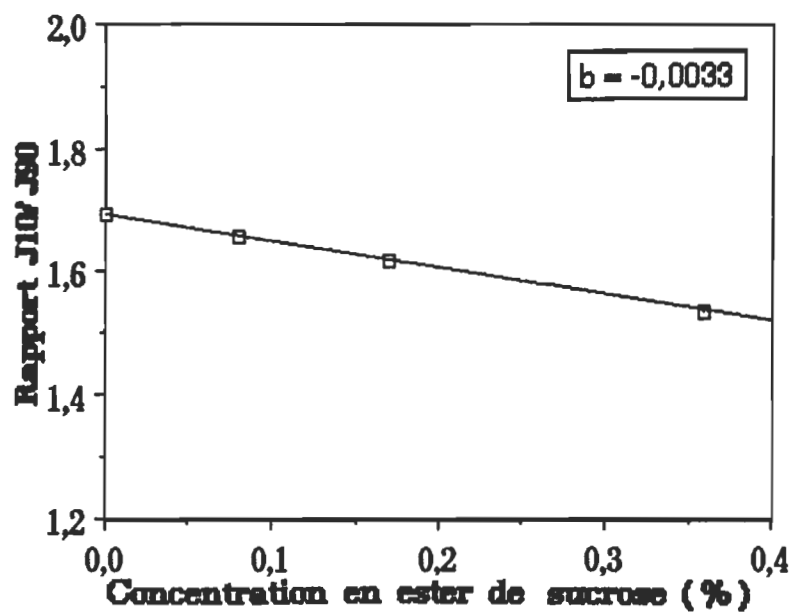
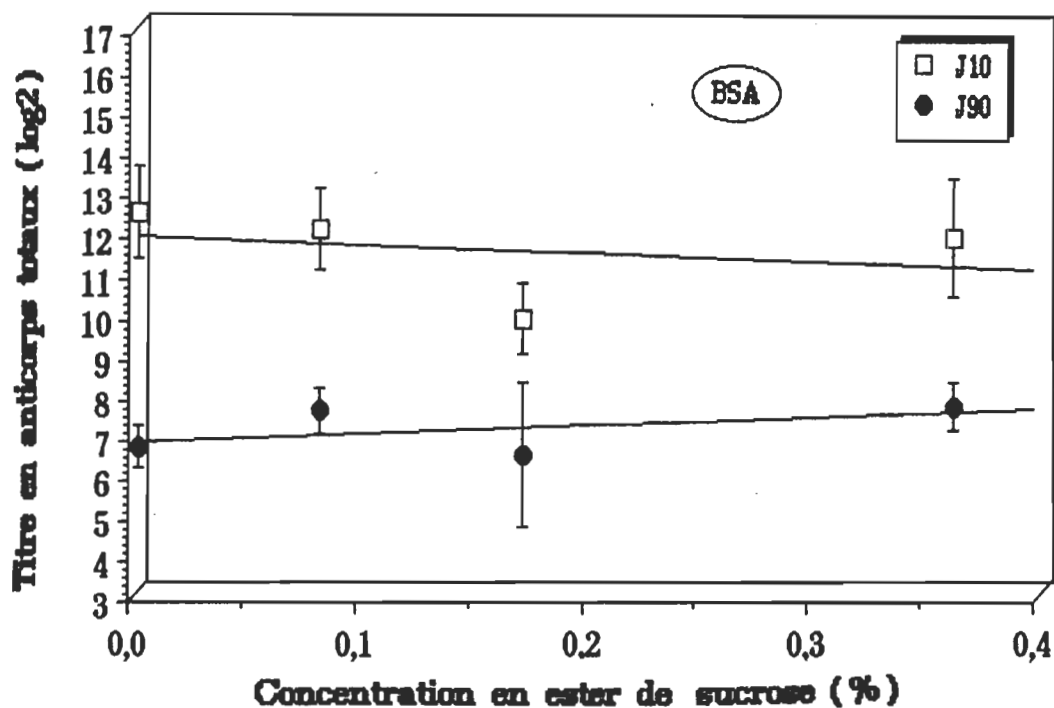


Graphique 18 – Effet de la concentration en ester de mannose sur la durée de la réponse secondaire induite par la BSA ancrée.

titres en anticorps aux jours 10 ( $r=0,721$ ) et 28 ( $r=0,063$ ) en fonction de la concentration en ester et par conséquent sur la durée étant donné les pentes quasi nulles et parallèles. Enfin, en réponse secondaire toujours avec la BSA encapsulée (graphique 20), on observe le même phénomène soit : au jour 10 ( $r=0,169$ ) et au jour 90 ( $r=0,487$ ). Le même phénomène est obtenu en réponse primaire et secondaire en réponse à l'antigène ancré en fonction de la concentration en ester de sucrose (résultats non montrés).



Graphique 19 – Effet de la concentration en ester de sucrose sur la durée de la réponse primaire induite par la BSA encapsulée.



Graphique 20 – Effet de la concentration en ester de sucrose sur la durée de la réponse secondaire induite par la BSA encapsulée.

## **DISCUSSION & CONCLUSIONS**

Le présent chapitre vise à fournir une vue d'ensemble finale des résultats déjà discutés ponctuellement au chapitre précédent et à établir un lien avec la littérature existante dans le domaine.

Nos résultats confirment le fait que l'association physique d'un antigène avec le liposome est un moyen efficace pour stimuler la réponse humorale, que cette association se fasse par encapsulation ou par liaison covalente. Ainsi, une augmentation sensible de la réponse a été observée après stimulation avec les formulations liposomales comparativement à la réponse observée avec l'antigène libre. L'augmentation encore forte de la réponse suite à une restimulation suggère la mise en place d'une mémoire immunologique, caractéristique des antigènes T-dépendants.

Bien que certaines études aient montré l'existence de différences importantes dans la réponse induite par l'antigène ancré ou encapsulé que ce soit en terme d'intensité (Van Rooijen, N. & Van Nieuwmegen 1982, Vannier, W. E. & Snyder, S. L. 1988; Latif, N. & Bacchawat, B. K. 1988), de cinétique d'induction (Thérien, H.-M. et al. 1990), de dépendance de la voie d'administration (Vannier, W. E. & Snyder, S. L. 1988) ou encore de production sélective d'immunoglobulines (Shahum, E., Thérien, H.-M. 1988), dans les conditions précises de notre étude (i.e. forte dose, fort rapport protéine:lipide, temps fixe de mesure), la seule différence observée réside dans la décroissance moins rapide de la production d'anticorps avec l'antigène ancré. L'absence de différence entre les profils d'immunoglobulines induites par les deux formulations liposomales reflète les conditions particulières de notre protocole

expérimental et confirme les résultats obtenus dans une étude parallèle menée dans notre laboratoire sur l'influence du rapport protéine:lipide sur la réponse induite montrant qu'à des rapports protéine:lipide autour de  $50\mu\text{g}/\mu\text{mole}$  et à des doses supérieures à  $15\mu\text{g}$ , les deux préparations liposomales induisent sensiblement les mêmes profils d'immunoglobulines. Des différences marquées entre les deux types de formulations ne se manifestent qu'à des doses ou des rapports plus faibles.

Ainsi, les résultats présentés ici, ne nous permettent donc pas d'établir une relation simple entre l'utilisation privilégiée d'une cellule de présentation et l'activation préférentielle d'une sous-population de lymphocytes T auxiliaires avec induction d'un patron d'immunoglobulines particulier.

Bien que l'hypothèse généralement avancée pour expliquer l'augmentation de la réponse humorale par les liposomes invoque le ciblage plus rapide et plus efficace de l'antigène vers les cellules de présentation, l'idée d'augmenter cette rapidité de prise en charge du véhicule liposomal par les cellules de présentation a été peu exploitée comme moyen d'amplifier la réponse immune spécifique. L'intérêt de ce ciblage a été récemment démontré dans un système complètement différent utilisant des anticorps bispécifiques pour cibler l'antigène vers les cellules de présentation ( Snider, D.P., 1991, Congrès Société Canadienne d'Immunologie, Lac Louise).

Si le ciblage de l'antigène a été pour le moment peu exploité pour amplifier la réponse, l'idée même du ciblage a été et est encore largement utilisée pour diriger vers des cellules spécifiques des liposomes chargés de modulateurs de leur activité (ex. MDP comme activateur des macrophages : Roche, A.-N. et al. 1985; Barratt, G.M. et al. 1987) en utilisant dans tous les cas un ligand spécifique d'une protéine

membranaire que ce soit par utilisation d'anticorps monoclonaux ou de ligands naturels.

L'utilisation du récepteur macrophagique du mannose comme moyen efficace et spécifique est déjà bien reconnu. Dans quelques rares études (Garçon, N. et al. 1988; Latif, N.A., Bacchawat, B.K. 1984), ce récepteur a été utilisé pour amplifier la réponse humorale induite par un antigène encapsulé dans les liposomes.

Notre idée de départ était de mettre à profit ce ciblage efficace afin, non seulement d'induire une réponse humorale plus intense pour l'antigène encapsulé présumément uniquement pris en charge par les macrophages, mais aussi afin d'abolir ou tout au moins de diminuer la contribution d'une voie de prise en charge autre que la voie macrophagique pour l'antigène ancré.

Bien que nos résultats n'aient pas confirmé cette hypothèse de départ, certaines particularités de la réponse ont été observées qui permettent de mieux comprendre les mécanismes à la base de l'élaboration de la réponse humorale. Dans nos conditions expérimentales, l'ester de mannose influence la réponse humorale induite par l'antigène encapsulé mais non celle de l'ancré. Le manque d'effet de l'ester de mannose sur la réponse à l'antigène ancré pourrait s'expliquer par une inaccessibilité du mannose inclus à la surface liposomale où la BSA est ancrée. Dans cette situation, la BSA étant beaucoup plus "encombrante", il est possible qu'elle masque le résidu de mannose ou tout au moins empêche son interaction avec le récepteur macrophagique alors que dans la situation d'encapsulation, aucun obstacle stérique ne nuit à l'interaction du mannose avec le récepteur. Des résultats préliminaires obtenus quant à la possibilité d'interaction de nos liposomes mannosylés avec BSA ancrée et encapsulée avec un gel de Sépharose-ConA, lectine

spécifique du mannose, tendent à confirmer cette hypothèse. Pour détourner l'antigène ancré, il aurait probablement fallu associer le mannose à la surface liposomale via un "bras d'ancrage" hydrophile permettant de l'éloigner de la bicouche lipidique.

L'influence du mannose sur la réponse humorale induite par l'antigène encapsulé apparaît cependant spécifique puisque l'ajout d'un sucre apparenté, le sucrose, est sans effet modulateur tant en réponse primaire que secondaire.

Nos résultats ont également fait ressortir deux effets intéressants de l'ester de mannose sur la réponse humorale à l'antigène encapsulé : l'ester de mannose diminue l'intensité de la réponse induite mais prolonge la durée de production des immunoglobulines.

Le fait que l'ester de mannose diminue l'intensité de la réponse (malgré que l'effet contraire nous était apparu prévisible) est en accord avec une étude similaire faite par Latif, N. & Bacchawat, B.K. (1984) montrant une diminution de la réponse humorale induite par la BSA associée à des liposomes  $\alpha$ -man (à comparer avec les liposomes  $\beta$ -gal et neutres). Dans leur étude, l'effet bénéfique de l'encapsulation est complètement éliminé puisque la réponse induite par l'antigène encapsulé demeure équivalente à celle induite par l'antigène libre. Les résultats ont été interprétés comme résultant d'une destruction rapide de l'antigène liposomal empêchant l'initiation d'une réponse immune significative. Nos résultats sont en accord avec ceux de Latif & Bacchawat et semblent en plus suggérer un effet non seulement sur les mécanismes d'induction mais aussi sur les mécanismes de suppression normalement mis en jeu dans l'élaboration d'une réponse immune (Figure 17).



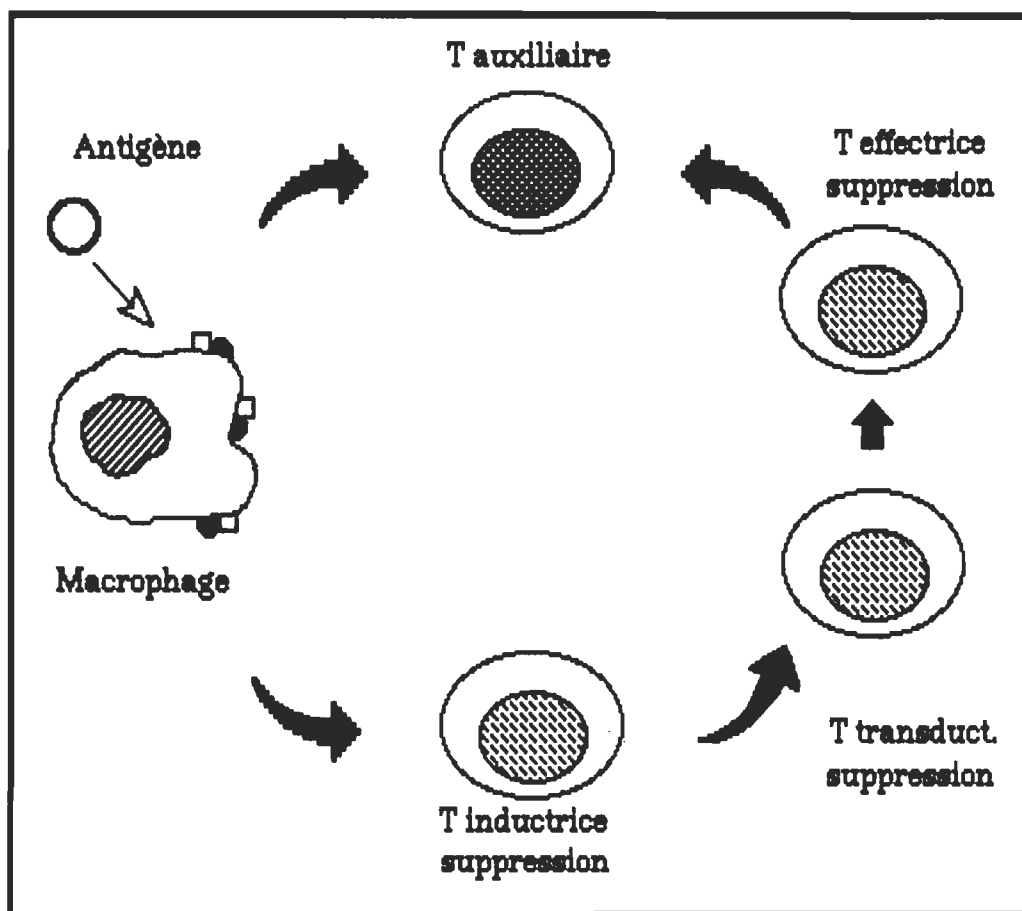


Figure 17 – Interactions des voies d'activation et de suppression.

Ainsi, l'induction d'une réponse immune fait intervenir aussi bien des signaux positifs que des signaux négatifs. On associe généralement les signaux positifs à l'activation (lymphocytes T auxiliaires) et les signaux négatifs à la suppression (lymphocytes T inducteurs de suppression). De plus, l'activation tant des T auxiliaires que des T inducteurs dépend, de la dose antigénique et du temps de contact avec l'antigène. La suppression contribue au contrôle homéostatique de toute réponse immune de telle sorte que, même lorsque l'immunisation induit une réponse vigoureuse (suite à l'injection d'une forte dose), cette réponse est limitée dans le temps. Enfin, la suppression requiert pour s'installer soit une dose antigénique plus forte, soit un temps de contact plus long avec le système et implique l'activation de toute une chaîne cellulaire (cellules initiatrice, transductrice et effectrice de suppression) aboutissant à la suppression proprement dite (Figure 17).

Dans une réponse immune normale, l'antigène, pris en charge par le macrophage est digéré et présenté aussi bien aux lymphocytes T auxiliaires qu'aux lymphocytes T inducteurs de suppression. La suppression (signaux négatifs) s'installe plus lentement que l'activation permettant la mise en place d'une réponse, suivie d'un contrôle de l'intensité et de la durée de cette réponse.

En présence d'ester de mannose, le ciblage vers le macrophage via le récepteur de surface mannose-spécifique (Haensler, S. & Shuber, F. 1988) est plus rapide, entraînant une diminution du temps de contact du liposome mannosylé avec le système. Cette diminution du temps de contact diminue par le fait même la durée des signaux d'activation des T auxiliaires et des T inducteurs de suppression.

D'une part, si des signaux moins soutenus sont dirigés vers les T auxiliaires, l'activation des T auxiliaires moins intense pourrait expliquer la diminution d'in-

tensité de la réponse puisque moins de cellules T auxiliaires seraient disposées ou aptes à activer le système immunitaire. D'autre part, si des signaux moins soutenus sont dirigés vers les T inducteurs de suppression, l'activation plus limitée, soit empêche la suppression de s'installer, soit retarde son apparition. Ainsi, l'activation des lymphocytes T auxiliaires par les liposomes mannosylés étant moins rapidement freinée, cela pourrait expliquer l'augmentation de la durée de la réponse observée dans nos résultats, parallèlement à une baisse d'intensité.

Ce modèle montrant cet effet de régulation de l'ester de mannose sur la réponse immunitaire par action sur la balance des signaux, et par conséquent sur la réponse humorale induite est supporté par les travaux de Muchmore, A.V. et al. 1990, qui suggèrent un rôle potentiel fonctionnel des structures carbohydratées dans la régulation de la réponse immunitaire. De plus, plusieurs autres observations ont mis en évidence l'effet immunosuppresseur de divers dérivés mannosylés dans une variété d'activités biologiques telles la cytotoxicité à médiation cellulaire (Forbes, J.T. et al. 1981) et la prolifération spécifique de l'antigène (Muchmore, A.V. et al. 1984), événement pouvant être relié à la diminution du temps de contact du système avec l'antigène.

Enfin, à la lumière des résultats et interprétations exposés dans la présente étude, on peut affirmer que le phénomène de présentation de l'antigène est un sujet très controversé et complexe. La route d'immunisation (Vannier, W.E. & Snyder, S.L. 1988), le type de cellule de présentation de l'antigène, la dose antigénique (Gregoriadis, G. et al. 1987; Latif, N.A., Bacchawat, B.K. 1988; Thérien, H.-M. et al. 1991) ou le rapport protéine:lipide (Davis, D., Gregoriadis, G. 1987; Thérien, H.-M. et al. 1991) influencent la réponse tout comme la vitesse de clairance de l'antigène du système par les cellules de présentation de l'antigène. Notre étude a permis de

mettre en lumière certains aspects mal compris, en l'occurrence l'effet immuno-suppresseur des sucres (Muchmore, A.V. et al. 1988) et la diminution de l'intensité de la réponse induite par un antigène mannosylé (Latif, N.A. et al. 1988), tout en proposant un mécanisme possible pour les événements précoces de l'initiation d'une réponse immune.

En conclusion, on constate que si l'effet d'un ciblage trop rapide ne semble pas un moyen très efficace pour augmenter l'intensité de la réponse humorale, il constitue un moyen efficace d'en prolonger la durée. Une meilleure compréhension du mécanisme d'action impliqué dans l'effet d'immunopotentialisation exercée par les liposomes est certainement un prérequis important dans la mise en place de systèmes adjuvants adaptés aux effets précis recherchés.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Abbas, A.K. A reassessment of the mechanisms of antigen specific T-cell-dependent B-cell activation. Immunology Today. 1988, 9(3), 89-94.
2. Allen, T.M., Chonn, A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. FEBS Letters. 1987, 223(1) 42-46.
3. Ashwell, J.D. Are B lymphocytes the principal antigen-presenting cells in vivo? The Journal of Immunology. 1988, 140(11)3697-3700.
4. Asselineau, J. Sur l'estérification partielle par l'acide palmitique du glucoside de méthyle et du glucose. J. Am. Chem. Soc. 1955, 62-69.
5. Baldeschweiler, J.D. Phospholipid vesicle targeting using synthetic glycolipid and other determinants. Ann. NY. Acad. Sci. USA. 1985, 446, 349-367.
6. Baratt, G.M., Tenu, J.-P., Yapo, A., Petit, J.-F. Preparation and characterization of liposomes containing mannosylated phospholipids capable of targeting drugs to macrophages. Biochimica and Biophysica Acta. 1986, 862 153-164.
7. Baratt, G.M., Nolibé, D., Yapo, A., Petit, J.-F., Tenu, J.-P. Use of mannosylated liposomes for in vivo targeting of a macrophage activator and control of artificial pulmonary metastases. Ann. Inst. Pasteur/Immunology. 1987, 138 437-450.

8. Beatty, J.D., Beatty, G.B., Paraskevas, F., Froese, E. Liposomes as immune adjuvants : T cell dependance. Surgery. 1984, 96 345-351.
9. Behling, U.H., Campbell, B., Chang, C.-M., Rumpf, C., Nowotny, A. Synthetic glycolipid adjuvants. The Journal of Immunology. 1976, 117(3) 847-851.
10. Carlsson, J., Drevin, H., Axen, R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. Biochemical Journal. 1978, 173 723.
11. Chesnut, R.W., Grey, H.M. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. The Journal of Immunology. 1981, 126 1075.
12. Claassen, E., Kors, N., Van Rooijen, N. Immunomodulation with liposomes : the immune response elicited by liposomes with entrapped dichloro-methylene-diphosphate and surface-associated antigen or hapten. Immunology. 1987, 60(4) 509-515.
13. Clifford, M., Snapper, C.M., William, E.P. Interferon- $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. Science. 1987, 236 944-947.
14. Dal Monte, P., Szoka, F.C. Jr. Effect of liposome encapsulation on antigen presentation in vitro - Comparison of presentation by peritoneal macrophages and B cells tumors. The Journal of Immunology. 1989, 142(5) 1437-1443.
15. Davis, D., Davies, A., Gregoriadis, G. Liposomes as adjuvants with immunopurified tetanus toxoid : the immune response. Immunology Letters. 1987, 14 341-347.

16. Davis, D., Gregoriadis, G. Liposomes as adjuvants with immunopurified tetanus toxoid : influence of liposomal characteristics. Immunology. 1987, 61, 229-234.
17. Feizi, T. et al. Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. Biochemical Journal, 1987, 245(1), 1-11.
18. Finkelman, F.D. et al. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. Annual Review of Immunology. 1990, 8, 303-333.
19. Firon, N., Ofek, I., Sharon, N. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of Escherichia coli. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1982, 105(4)1426-1432.
20. Fiske, C.H., Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 1925, 66, 375.
21. Forbes, J.T., Bretthauer, R.K., Oeltmann, T.N. Mannose 6-, fructose 1-, and fructose 6-phosphates inhibit human natural cell-mediated cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981, 78 5797.
22. Garcon, N., Gregoriadis, G., Taylor, M., Summerfield, J. Mannose-mediated targeted immunoadjuvant action of liposomes. Immunology. 1988, 64 743-745.
23. Gerlier, D., Bakouche, O., Dore, J.F. Liposomes as a tool to study the role of membrane presentation on the immunogenicity of MuLV-related tumor antigen. The Journal of Immunology. 1983, 131 485.

24. Ghosh, P., Bachhawat, B.K. Grafting of different glycosides on the surface of liposomes and its effect on the tissue distribution of  $^{125}\text{I}$ -labelled  $\gamma$ -globulin encapsulated in liposomes. Biochimica and Biophysica Acta.1980,632, 562-572.
25. Goldman, R. Characteristics of the beta-glucan receptor of murin macrophages. Exp. Cell. Res. 1988, 174(2) 481-490.
26. Gordon, S. Macrophage plasma membrane receptors : structure and function. The mannose receptor : structure and function. J. Cell Sci. 1988, suppl. 9, 122-125.
27. Gregoriadis, G. Liposome technology. (ed. G. Gregoriadis) CRC Press Inc. Florida. 1984.
28. Gregoriadis, G., Senior, J., Wolff, B., Kirby, C. Targeting of liposomes to accessible cells in vivo. Annals New York Academy of Sciences. 1985, 446, 319-340.
29. Gregoriadis, D., Davis, D., Davies, A. Liposomes as immunological adjuvants : antigen incorporation studies. Vaccine. 1987, 5, 145.
30. Gregoriadis, G. The immunoadjuvant action of liposomes : nature of immune response and influence of liposomal characteristics. Liposomes as drugs carriers. 1988, p.279.
31. Grun, J.L., Maurer, P.H. Different T-helper cell subsets elicited in mice utilizing 2 different adjuvant vehicles – The role of endogenous interleukin-1 in proliferative responses. Cellular Immunology. 1989, 121(1) 134-145.



32. Haensler, J., Shuber, F. Preparation of neo-galactosylated liposomes and their interaction with mouse peritoneal macrophages. Biochimica and Biophysica Acta. 1988, 946, 95-105.
33. Handman, E., Mc Conville, M.J., Goding, J.W. Carbohydrate antigens as possible parasite vaccines. A case for the Leishmania glycolipid. Immunology Today. 1987, 8(6), 181-185.
34. Hoekstra, D., Tomasini, R., Scherphof, G. Interactions of phospholipid vesicles with rat hepatocytes in vitro - Influence of vesicle-incorporated glycolipids. Biochimica and Biophysica Acta. 1980, 603, 336-346.
35. Hubscher, T., Boutello, A., Eisen, H.N. Human skin target cells : nature and fate in the immediate hypersensitivity reaction. J. Allergy Clin. 1974, 53, 150.
36. Ishizaka, T., Tomioka, H., Ishizaka, K. Degranulation of human basophil leukocytes by anti- $\gamma$ E antibody. The Journal of Immunology. 1971, 106, 705.
37. Johnston, R.B. Jr. Current concepts : immunology. Monocytes and macrophages. New England Journal of Medicine 1988, 318(12), 747-752.
38. Kölsch, E., Oberbarnscheidt, J., Bräuner, K., Hever, J. The Fc receptor : its role in the transmission of differentiation signals. Immunological Review. 1980, 49, 61.
39. Krieger, J.I., Grammer, S.F., Grey, H.M., Chesnut, R.W. Antigen presentation by splenic B cells : resting B cells are ineffective whereas activated B cells are effective accessory cells for T cell responses. The Journal of Immunology. 1985, 135, 2937.

40. Kurt-Jones, E.A., Liano, D., Hayglass, K.A., Benacerraf, B., Sy, M.-S., Abbas, A.K. The role of antigen-presenting B cells in T cell priming in vivo. Studies of B cell-deficient mice. The Journal of Immunology. 1988, 140(11)3773-3778.
41. Latif, N.A., Bacchawat, B.K. The effect of surface sugars on liposomes in immunopotentialiation. Immunology Letters. 1984, 8, 75-78.
42. Latif, N.A., Bacchawat, B.K. The effect of surface-coupled antigen of liposomes in immunopotentialiation. Immunology Letters. 1988, 15, 45.
43. Lennartz, M.R. et al . Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from rabbit alveolar macrophages. Biochemical Journal. 1987, 245(3) 705-711.
44. Lennartz, M.R., Cole, S., Stahl, P.D. Biosynthesis and processing of the mannose receptor in human macrophages. The Journal of Biological Chemistry. 1989, 264(4)2385-2390.
45. Leserman, L.D., Machy, P. Barbet, J. Covalent coupling of monoclonal antibodies and protein A to liposomes : specific interaction with cells in vitro and in vivo. A. Synthesis of dipalmitoyl phosphatidylethanolamine 3-(2-pyridyl-dithio) propionate (DPPE-DTP). Liposome Technology. CRC Press Inc. 1984, p.29-40.
46. Lichtenberg, D. et al. Liposomes : preparation, characterization and presentation. Methods Biochem. Anal. 1988, 33, 337-462.
47. Lifshitz, R., Gitler, C., Mozes, E. Liposomes as immunological adjuvants in eliciting antibodies specific to the synthetic polypeptide poly (L tyr, L glu)-poly

- (DL ala)-poly (L lys) with high frequency of site associated idiotypic determinants. Eur. J. Immunol. 1981, 11, 398.
48. Machy, P., Leserman, L. Les lectines : molécules de reconnaissance. Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie, 1986, 105-133.
  49. Malynn, B.A., Romeo, D.T., Wortis, H.H. Antigen-specific B cells efficiently present low doses of antigen for induction of T cell proliferation. The Journal of Immunology. 1985, 135, 980.
  50. Manca, F., Fenoglio, D., Kumkl, A., Cambiaggi, C., Li Pira, G., Celada, F. B cells on the podium : regulatory roles of surface and secreted immunoglobulins. Immunology Today, 1988, 9(10) 300-303.
  51. Matthews, B.F. Liposomes : Artificial membranes as emerging tools in biotechnology. Liposomes : tools in biotechnology, 1984, 157-167.
  52. Metzger, H., Kinet, J.-P. How antibodies work : focus on Fc receptors. FASEB J. 1988, 2, 3-11.
  53. Milsmann, M.H.W., Schwendener, R.A., Weder, H.-G. The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis. Biochimica and Biophysica Acta, 1978, 512, 147-155.
  54. Muchmore, A.V., Decker, J.M., Blaese, R.M., Nilsson, B. Purification and characterization of a mannose-containing disaccharide obtained from human pregnancy urine. A new immunoregulatory saccharide. J. Exp. Med. 1984, 160, 1672.

55. Muchmore, A.V., Sathyamoorthy, N. Decker, J., Sherblom, A.P. Evidence that specific high-mannose oligosaccharides can directly inhibit antigen-driven T-cell response. Journal of Leucocyte Biology. 1990, 48, 457-464.
56. Muller, C.D., Schuber, F. Neo-mannosylated liposomes : synthesis and interaction with mouse kupffer cells and resident peritoneal macrophages. Biochimica and Biophysica Acta. 1989, 986(1), 97-105.
57. Nigam, V.N., Bonaventure, J., Chopra, C., Brailovsky, C.A. Effects of structural variations in synthetic glycolipids upon mitogenicity for spleen lymphocytes, adjuvancy for humoral immune response and on anti-tumour potential. British Journal of Cancer. 1982, 46, 782-793.
58. Nigam, V.N. Antitumor and immunopotentiating effects of a synthetic glycolipid, maltose tetrapalmitate. INSERM. 1984, 126, 545-560.
59. Ofek, I., Sharon, N. Lectinophagocytosis : A molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. Infection & Immunity. 1988, 56, 539-547.
60. Ohsumi, Y. et al. Enhancement of macromolecular ligand binding by alveolar macrophages by mannose oligosaccharides and related compounds. Arch. Biochem. Biophys. 1988, 260(1) 241-249.
61. Osipov, L., Snell, F.D., York, W.C., Finchler, A. Fatty acid esters of sucrose. Ind. Engng. Chem. 1956, 48, 1459-1462.

62. Roche, A.-N., Bailly, P., Monsigny, M. Macrophage activation by MDP bound to neoglycoproteins : metastasis eradication in mice. Invasion Metastasis. 1985, 5, 218-232.
63. Rouse, B.T., Turtinen, L., Correa-Freire, M. Use of liposomes in immunology. Carriers and Adjuvants for Veterinary Biologics. 1986, 121-131.
64. Salacinski, P.R., McLean, C., Sykes, J.E., Clement-Jones, V.V., Lowry, P.J. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha, 6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). Anal. Biochem. 1981, 117(1) 136-146.
65. Schroit, A.J., Madsen, J., Nayar, R. Liposome-cell interactions : in vitro discrimination of uptake mechanism an in vivo targeting strategies to mononuclear phagocytes. Chemistry and Physics. 1986, 40, 373-393.
66. Shahum, E., Thérien, H.-M. Immunopotentialion of the humoral response by liposomes : encapsulation versus covalent linkage. Immunology. 1988, 65, 315-317.
67. Sharon, N., Ofek, I. Chap. 3: Mannose specific bacterial surface lectins. (p.35-81). Leffler, H., Svanborg-Edin, C. Chap.4: Glycolipids as receptor for *Escherichia coli* lectins or adhesins. (p.83-111). Keusch, G.T., Donohue-Rolfe, A., Jacewicz, M. Chap.13: Sugar binding bacterial toxins. (p.271-295). Maki, J.S., Mitchell, R. Chap.20: The function of lectins in interactions among marine bacteria, invertebrates, and algae (p.409-425). => Mirelman, D. (Ed.) Microbial lectins and agglutinins - Properties and biological activity. Wiley. 1986. 443 p.

68. Sharon, N., Firon, N. Oligomannoside units of cell surface glycoproteins as receptor for bacteria. Pure & Applied Chemistry, 1983, 55(4), 671-675.
69. Sharon, N. Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. Immunology Today, 1984, 5(5), 143-147.
70. Shek, P.N., Sabiston, B.H. Immune response mediated by liposome-associated proteins antigen. I. Potentiation of the plaque-forming cell response. Immunology, 1982, 45(2), 349-356.
71. Shek, P.N., Lukovick, S. The role of macrophages in promoting the antibody response mediated by liposome-associated protein antigens. Immunology Letters, 1982, 5, 305-309.
72. Shek, P.N., Heath, T.D. Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. III. Immunogenicity of bovine serum albumin covalently coupled to vesicle surface. Immunology, 1983, 50, 101-106.
73. Shek, P.N. Applications of liposomes in immunopotential. Immunotoxicology, 1984, 2, 103.
74. Six, H.R., Kramp, W.J., Kasel, J.A. Effect of liposomes on serological responses following immunization with adenovirus purified type 5 subunit vaccines. Liposomes and Immunobiology, 1980, p.115.
75. Snapper, C.M., Paul, W.E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. Science, 1987, 236(4804), 944-947.

76. Snapper, C.M., Paul, W.E. B cell stimulatory factor-1 (interleukin-4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. The Journal of Immunology. 1987, 139(1) 10-17.
77. Snapper, C.M., Finkelman, F.D., Paul, W.E. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. Journal of experimental medecine. 1988, 167, 183-196.
78. Snider, D.P., Segal, D.M. Efficiency of antigen presentation after antigen targeting to surface IgD, IgM, MHC, Fc $\gamma$  RII, and B220 molecules on murine splenic B cells. The Journal of Immunology. 1989, 143 59-65.
79. Snyder, S.L., Vannier, W.E. Immunologic response to protein immobilized on the surface of liposomes via covalent azo-bonding. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 772 288.
80. Stahl, P., Schlesinger, P., Sigardson, E., Rodman, J., Lee, J.C. Receptor-mediated pinocytosis of mannose-glycoconjugates by macrophages : characterization and evidence for receptor-recycling. Cell. 1980, 19 207-215.
81. Stahl, P., Gordon, S. Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primairy macrophages and their hybrids. The Journal of Cell Biology. 1982, 93, 49-56.
82. Stahl, P.D. The macrophage mannose receptor : current status. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1990, 2 317-318.
83. Su, D., Van Rooijen, N. The role of macrophages in the immunoadjuvant action of liposomes : effects of elimination of splenic macrophages on the im-

- mune response against intravenously liposome-associated albumin antigen. Immunology. 1989, 66, 466-470.
84. Thérien, H.-M., Shahum, E. Importance of physical association between antigen and liposomes in liposomes adjuvancity. Immunology Letters. 1989, 22, 253-258.
  85. Thérien, H.-M., Lair, D., Shahum, E. Liposomal vaccine : influence of antigen association on the kinetics of the humoral response. Vaccine. 1990, 8(16), 558-562.
  86. Thérien, H.-M., Shahum, E., Fortin, A. Liposome adjuvanticity : influence of doses and protein:lipid ratios on the humoral response to encapsulated and surface-linked antigen. Soumis à Cellular Immunology. 1991.
  87. Tom, B.H., Goodwin, T.J., Sengupta, J., Kahan, B.D., Turzky, L.P. A new approach for the immunogenic presentation of membrane-bound human colon tumor antigens. Immunol. Commun. 1982, 11, 315.
  88. Unanue, E.R., Allen, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. Science. 1987, 236, 551-557.
  89. Vannier, W.E., Snyder, S.L. Antibody responses to liposomes-associated antigen. Immunology Letters. 1988, 19, 59-64.
  90. Van Rooijen, N., Van Nieuwmegen, R. Immunoadjuvant properties of liposomes for targeting of drugs. Targeting of drugs. (ed. G. Gregoriadis & A. Trouet) Plenum Press. New-York. 1982, p.301.



91. Van Rooijen, N., Su, D. Immunoadjuvant action of liposomes : mechanisms. Immunological adjuvants and vaccines, 1989, 159-170.
92. Vitetta, E.S., Bossie, A., Fernandez-Botran, R., Myers, C.D., Oliver, K.G., Sanders, V.M., Stevens, T.L. Interaction and activation of antigen-specific T and B cells. Immunological Reviews, 1987, 99, 193-233.
93. Walden, P., Nagy, Z.A., Klein, J. Major histocompatibility complex-restricted and unrestricted activation of helper T cell lines by liposomes-bound antigens. Journal of Molecular & Cellular Immunology, 1986, 2, 191-197.
94. Warren, H.S., Vogel, F.R., Chedid, L.A. Current status of immunological adjuvants. Annual Review of Immunology, 1986, 4, 369-388.
95. Wileman, T., Boshans, R.L., Schlesinger, P., Stahl, P. Monensin inhibits recycling of macrophage mannose-glycoprotein receptors and ligand delivery to lysosomes. Biochemical Journal, 1984, 220(3) 665-675.
96. Wolff, B., Gregoriadis, G. The use of monoclonal anti-Thy<sub>1</sub>, IgG1 for the targeting of liposomes to AKR-A cells *in vitro* and *in vivo*. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 802, 259-273.
97. Yoshimoto, K., Tahara, K., Suzuki, S., Sasaki, K., Nishikawa, Y., Tsuda, Y. Regioselective synthesis of mono-O-acylglucoses. Chem. Pharm. Bull. 1979, 27(11) 2661-2674.