

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**THÈSE PRÉSENTÉE À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC  
À TROIS-RIVIÈRES**

Comme exigence partielle  
au Doctorat en Biophysique

par  
Éliane SHAHUM

<p>Les mécanismes cellulaires du pouvoir adjuvant des liposomes</p>
---

Avril 1992

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.

*à mes hommes,*

## RÉSUMÉ

Le pouvoir adjuvant des liposomes qui se traduit par de très fortes réponses humorales a été constaté et décrit dans nombre de recherches. Pouvoir d'autant plus intéressant que non accompagné de toxicité comme la plupart des adjuvants classiques. Nous avons voulu comprendre les mécanismes cellulaires de cette immunopotentialisation en comparant l'effet, sur la réponse immune, de deux systèmes d'antigène liposomal: un antigène protéinique livré soit encapsulé dans des liposomes, soit ancré à leur surface par liaison covalente. Les réponses humorales des différentes populations de souris immunisées ont été mises en parallèle et comparées à la réponse induite par l'antigène proposé seul ou accompagné de liposomes non associés physiquement à la protéine. De façon très schématique, nous avons imaginé, au plan cellulaire, un scénario global de stimulation pour les antigènes liposomaux: les macrophages, reconnus pour être très friands de liposomes, vont avidement phagocyter l'antigène encapsulé, et l'activation subséquente sera donc macrophage-dépendante. Par contre, quand l'antigène est exposé en surface, il pourrait également y avoir interaction avec les récepteurs membranaires spécifiques de l'antigène sur les lymphocytes B, et, par là, activation selon une voie B-dépendante prédominante. Les liposomes servent donc de transporteurs d'antigène mais la différence fondamentale dans leur liaison avec l'antigène implique par le fait même de probables différences dans la prise en charge par l'organisme; et de là, des différences aussi dans les mécanismes de présentation aux cellules cibles et d'activation des diverses populations cellulaires.

En effet, on sait maintenant que les lymphocytes T helpers, qui jouent un rôle capital dans les mécanismes de toutes les réponses humorales ou à médiation cellulaire, par l'aide qu'elles apportent aux cellules effectrices, se subdivisent en deux sous-populations, les Th1 et les Th2, caractérisées par la sécrétion de lymphokines différentes et l'induction préférentielle d'immunoglobulines de classes et d'isotypes distincts. Par contre, les mécanismes qui sous-tendent l'activation préférentielle de l'une ou l'autre voie sont loin de faire l'unanimité. Dans ce contexte, chercher à comprendre les mécanismes du pouvoir adjuvant des liposomes revient à circonscrire les divers circuits d'activation et de présentation, et à définir le rôle respectif des différentes populations cellulaires impliquées dans la réponse immune.

L'étude s'est réalisée à deux niveaux :

1° *in vivo*, par la quantification des immunoglobulines spécifiques produites en réponse aux antigènes liposomaux; et ce, par dosage ÉLISA des Ig sériques.

2° *in vitro*, par l'analyse de la réponse proliférative des cellules spléniques stimulées avec les mêmes préparations antigéniques et incubées avec des anti-cytokines (anti-IL1, anti-IL4, anti-IFN $\gamma$ , anti-TNF $\alpha$ ).

L'analyse comparée et complémentaire des modulations enregistrées *in vivo* et *in vitro* selon le mode d'association de l'antigène avec les liposomes a mis en évidence:

- une égale potentiation de la réponse immune quel que soit le type d'antigène liposomal, mais une différence qualitative sur la production d'anticorps.
- l'encapsulation privilégie la voie Th2, génératrice d'IL-4 et IL-1 dépendante. Cette voie est préférentiellement stimulée par la présentation de

l'antigène encapsulé subséquente à une prise en charge rapide par les macrophages.

- l'ancrage met en action deux voies d'activation, Th1 et Th2, mais avec une nette prépondérance de la voie Th1, génératrice d'IL-2 et d'IFN $\gamma$ , non dépendante de l'IL-1. La prise en charge de l'antigène ancré est faite par les macrophages mais aussi et surtout par les cellules B.

Au milieu de tous les courants contradictoires, il semble qu'une présentation par les macrophages privilégie la stimulation des Th2, alors que les B puissent présenter d'une manière très efficace l'antigène aussi bien aux Th1 qu'aux Th2, pourvu que les signaux intracellulaires des Th2 soient prodigués à temps aux Th1.

Quant à l'immunopotentialisation elle-même, les deux modes d'association de l'antigène avec le véhicule liposomal la réalisent à un niveau analogue d'intensité, tout en opérant selon des mécanismes distincts: l'encapsulation parce qu'elle permet à de grosses quantités d'antigène d'être délivrées par les macrophages par à coups, maintenant un niveau de stimulation élevé et soutenu; l'ancrage parce qu'il favorise une prise en charge concomitante par les cellules B, une présentation plus efficace et l'implication d'un plus grand nombre de populations cellulaires.

## REMERCIEMENTS

À tout Seigneur tout honneur, je veux d'abord remercier ma directrice de thèse (à moins que ce ne soit ma directrice...), Hélène-Marie Thérien, pour sa présence constante et ses encouragements (amicaux quoique musclés) qui m'ont doctement et patiemment soutenue tout au cours de ce long périple que furent ma maîtrise et mon doctorat.

Je dois beaucoup également à Nicolas, sans qui certains schémas ou arrangements textuels ne seraient que d'infâmes gribouillis,

À Stéphane aussi, qui m'a "bousculée" chaque fois que je doutais de moi,

Enfin à tous ceux qu'il m'a fallu ne pas décevoir...

Et à part ça, j'ai quand même bien aimé faire cette recherche, surtout que je n'ai trouvé durant toutes ces années, aussi bien au laboratoire que dans tout le département, que chaleur et amitié autour de moi.

## TABLE DES MATIÈRES

	page
Résumé	i
Remerciements	iv
Table des matières	v
Liste des figures, tableaux et schémas	ix
Liste des abréviations	xii
 <b>INTRODUCTION</b>	 <b>1</b>
L'agression antigénique et la réplique de l'agressé	
 <b>PREMIER CHAPITRE</b>	 <b>6</b>
<b>1.1 Phase I de la cascade immune: prise en charge et présentation</b>	<b>6</b>
1.1.1 La capture par les cellules présentant l'antigène	6
✿ Zoom sur les récepteurs de l'antigène des cellules B	6
1.1.2 La dégradation de l'antigène	9
1.1.3 Le choix du peptide immunogénique par le CMH	9
✿ Zoom sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)	10
1.1.4 La présentation aux cellules T	14
<b>1.2 Phase II de la cascade immune: activation lymphocytaire</b>	<b>15</b>
1.2.1 L'activation des cellules T helpers	15
1.2.1.1 Le récepteur de l'antigène	15
1.2.1.2 Les lymphokines	16
✿ Zoom sur le rôle des cytokines	19



1.2.2	L'activation des lymphocytes B	21
1.2.2.1	L'activation des B naïfs	21
1.2.2.2	La production d'anticorps par les plasmocytes	22
✿	Zoom sur les anticorps : classification et fonctions	23
1.2.3	Hétérogénéité des cellules T helpers	26
1.2.3.1	Les deux sous-populations de T helpers	26
1.2.3.2	La régulation de la production d'immunoglobulines	27
1.2.3.3	La collaboration T/B	29
1.2.3.4	La différenciation des sous-populations Th1/Th2	29
1.2.3.5	Le rôle physiologique des Th1 et des Th2	30
<b>1.3</b>	<b>Les antigènes liposomaux</b>	<b>32</b>
1.3.1	Le liposome, docile outil de recherche	32
1.3.1.1	Définition	32
1.3.1.2	Principe de base de préparation	32
1.3.1.3	Paramètres physicochimiques et biochimiques	34
1.3.2	Les interactions liposomes / cellules	36
1.3.2.1	Mécanismes d'interactions	36
1.3.2.2	Utilisation des liposomes en immunologie	37
<b>1.4</b>	<b>La problématique de la recherche et la méthodologie envisagée</b>	<b>38</b>
1.4.1	Focalisation du problème	38
1.4.2	Le moyen d'entrer dans le jeu	39
1.4.3	Les CPAg : une fonction, deux méthodes	41
1.4.4	Application aux antigènes liposomaux	42
1.4.5	Les diverses thèses en présence	42
1.4.6	La méthodologie choisie	45
<b>CHAPITRE II</b>	<b>: LES MÉTHODES EXPÉRIMENTALES</b>	<b>46</b>

<b>2.1</b>	<b>Préparation des complexes antigéniques liposomaux</b>	<b>46</b>
2.1.1	Les liposomes	46
2.1.1.1	Composition	46
2.1.1.2	Synthèse du DPPE-DTP	46
2.1.1.3	Protocole de préparation des liposomes	48
2.1.2	Les protéines	49
2.1.3	Les associations liposomes / protéines	51
2.1.3.1	L'encapsulation	51
2.1.3.2	L'ancrage par liaison covalente	52
2.1.4	Les méthodes de dosage	53
2.1.4.1	Concentration en lipide des préparations liposomales	53
2.1.4.2	Concentration en protéine des préparations liposomales	53
2.1.4.3	Détermination de la taille des liposomes	55
<b>2.2</b>	<b>Immunisation des souris</b>	<b>55</b>
<b>2.3</b>	<b>Méthodes d'évaluation de la réponse humorale</b>	<b>57</b>
2.3.1	Numération des cellules productrices d'anticorps	57
2.3.2	Détermination du taux sérique d'anticorps	60
2.3.3	Dosage de la prolifération lymphocytaire	62
<b>2.4</b>	<b>Errements, tâtonnements et ... choix</b>	<b>64</b>
<b>2.5</b>	<b>Réactifs et solutions</b>	<b>68</b>
<b>CHAPITRE III</b>	<b>: LES RÉSULTATS</b>	<b>72</b>
<b>3.1</b>	<b>La réponse anticorps in vivo</b>	<b>72</b>
3.1.1	Les modèles antigéniques spécifiques aux tests in vivo	72
3.1.2	Numération des PFC totales, à IgM et à IgG	73
3.1.3	Mesure de la production des IgM et IgG sériques	74

3.1.4	Cinétique de la sécrétion des Igs sériques	75
3.1.4.1	Cinétique des Igs totales	75
3.1.4.2	Cinétique des IgM et IgG	76
3.1.5	Mesure de la production et cinétique des isotypes d'IgG	76
3.1.6	Influence du rapport protéine/lipide sur la réponse humorale	78
<b>3.2</b>	<b>La réponse proliférative in vitro</b>	<b>81</b>
3.2.1	Les modèles antigéniques spécifiques aux tests in vitro	81
3.2.2	Résultats des cinétiques	82
3.2.3	Mesure de la lymphoprolifération en fonction de la nature et de la concentration de l'antigène	83
3.2.4	Mesure de l'inhibition par l'anti-interleukine 1	84
3.2.5	Action de l'interleukine 1	86
3.2.6	Action de 3 anti-cytokines sur les cellules spléniques totales et sans macrophages	87
	a) Effet de l'anti-IL4	88
	b) Effet de l'anti-IFN $\gamma$	89
	c) Effet de l'anti-TNF $\alpha$	89
3.2.7	Effet de l'anti-IL1 sur les splénocytes sans macrophages	90
<b>3.3</b>	<b>Résumé des résultats</b>	<b>91</b>
	<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSIONS</b>	<b>122</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>135</b>

## LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET SCHÉMAS

Schéma 1	Structure d'une immunoglobuline	7
Schéma 2	Structure des molécules du CMH	11
Schéma 3	La cascade des lymphokines	18
Schéma 4	Voies d'activation et sous-populations de cellules T helpers	28
Schéma 5	Structure des deux états d'une couche de phospholipides	34
Schéma 6	La réaction de couplage vésicules / protéine	47
Figure 1	Nombre de PFC totales	94
Figure 2	PFC à IgM et IgG	94
Figure 3	Production des Igs totales, IgM et IgG	95
Figure 4a	Cinétique de l'immunopotentialisation en réponse primaire	96
Figure 4b	Cinétique de l'immunopotentialisation en réponse secondaire	97
Figure 5	Cinétique de la production des IgM et IgG en réponse IIre	98
Figure 6	Production des isotypes IgG1, IgG2a et IgG3	99
Figure 7	Cinétique de la production des IgG1, IgG2a et IgG3	100
Figure 8	Influence du rapport protéine/lipide lors de la réponse anticorps à l'antigène encapsulé	101
Figure 9	Influence du rapport protéine/lipide lors de la réponse anticorps à l'antigène ancré	102
Figure 10	Test de prolifération (souris immunisées avec Ag libre)	103
Figure 11	Test de prolifération (souris immunisées avec liposomes)	104
Figure 12	Influence de l'anti-IL1 sur la prolifération lymphocytaire (souris préimmunisées avec Ag libre)	105
Figure 13	Influence de l'anti-IL1 sur la prolifération lymphocytaire (souris préimmunisées avec liposomes)	106

Figure 14	Mesure de l'inhibition de la prolifération par l'anti-IL1 (souris préimmunisées avec 4 préparations antigéniques différentes)	107
Tableau A	Réponse proliférative en fonction de la nature et de la concentration en antigène	108
Tableau B	Pourcentage d'inhibition de la prolifération par l'anti-IL1 (souris immunisées avec 4 préparations antigéniques)	109
Tableau C	Pourcentage d'inhibition de la prolifération par l'anti-IL1 (souris immunisées avec cAlb ancrée)	110
Tableau D	Action de l'interleukine 1 sur la prolifération	111
Tableau E	Mesure de l'effet de 2 concentrations de 3 anti-cytokines sur la réponse proliférative in vitro	112
Figure 15a	Action de l'anti-IL4 sur la prolifération des cellules spléniques	113
Figure 15b	Action de l'anti-IL4 sur la prolifération des splénocytes sans macrophages	114
Figure 16a	Action de l'anti-IFN $\gamma$ sur la prolifération des cellules spléniques	115
Figure 16b	Action de l'anti-IFN $\gamma$ sur la prolifération des splénocytes sans macrophages	116
Figure 17a	Action de l'anti-TNF $\alpha$ sur la prolifération des cellules spléniques	117
Figure 17b	Action de l'anti-TNF $\alpha$ sur la prolifération des splénocytes sans macrophages	118
Tableau F	Action des anti-cytokines (anti-IL4, anti-IFN $\gamma$ , anti-TNF $\alpha$ ) sur les cellules totales	119

Tableau G	Action des anti-cytokines (anti-IL4, anti-IFN $\gamma$ , anti-TNF $\alpha$ ) sur les cellules sans macrophages	120
Figure 18	Action de l'anti-IL1 sur la prolifération des splénocytes sans macrophages	121

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABTS	2,2'-azinobis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonate)
BSA	Albumine bovine sérique
cAlb	Conalbumine
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPAg	Cellule présentant l'antigène
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DPPE	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine
DPPE-DTP	DPPE - pyridyldithiopropionate
DTT	Dithiothreitol
GRM	Globule rouge de mouton
HEPES	(N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonicacid])
IFN $\gamma$	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
Igm	Immunoglobuline de membrane
IL-1, -2, -3,...	Interleukines 1, 2, 3, ...
IODOGEN	1,3,4,6-tétrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphénylglycouril
OGP	N-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside
2-ME	2-Mercaptoéthanol
PBS	Phosphate buffer saline
PBSN	Phosphate buffer saline sodium (Na)
PBSNT	Phosphate buffer saline Na -Tween 20
PFC	Plaue forming cell (cellules formant des plages)
POPOP	1,4,-[2-(5-phényloxazolyl)]benzène
PPO	2,5-diphényloxazole

RPMI	Milieu de culture cellulaire (RPMI 1640)
SPDP	N-hydroxysuccinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate
SVF	Sérum de veau foetal
T	Température
T <sub>c</sub>	Température de transition de phase
T <sub>h</sub>	Lymphocyte T helper
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor



## INTRODUCTION

### **L'agression antigénique et la réplique de l'agressé**

Qu'un élément étranger (virus, bactérie, parasite quelconque) s'introduise dans un organisme, et aussitôt entrent en jeu les défenses immunitaires c'est-à-dire tout un ensemble de mécanismes de protection, avec pour objectif unique de rejeter systématiquement l'intrus. Ceci implique ipso facto que ce système soit d'abord capable de distinguer le soi du non soi, c'est-à-dire qu'il possède, pour être efficace, un pouvoir de discrimination entre ce qui est propre à l'organisme et ce qui lui est étranger.

Les composantes de ce système sont multiples, de nature cellulaire et moléculaire. Ce sont en premier lieu les cellules qui captent l'antigène, l'internalisent et le dégradent de façon à le présenter sous une forme adéquate à des cellules préparées à le recevoir. Ce transfert, première étape d'une coopération entre cellules immunocompétentes, se fait entre les CPAg (cellules présentant l'antigène) et les lymphocytes T qui reconnaissent l'antigène associé aux molécules du soi que sont les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les CPAg sont soit des cellules phagocytaires de type macrophage qui ingèrent l'antigène par phagocytose, soit des lymphocytes B qui fixent l'antigène par leurs anticorps membranaires spécifiques et internalisent le complexe par endocytose. Les clones de lymphocytes T spécifiques de l'antigène sont activés par celui-ci, prolifèrent et induisent à leur tour la prolifération des lymphocytes B et leur différenciation terminale en cellules sécrétant des anticorps, les plasmocytes.

C'est la réponse humorale proprement dite, et en même temps la seconde étape de coopération intercellulaire, régie et régulée, comme la première d'ailleurs, par un grand nombre de facteurs non spécifiques, les cytokines, molécules de croissance et de différenciation produites par les diverses populations cellulaires activées. De plus, l'organisme va dès lors garder le souvenir du premier contact avec l'antigène grâce à des cellules mémoire qui lui permettront de réagir plus vite et plus efficacement lors d'une éventuelle deuxième exposition.

Cette "réplique à l'agression" a été volontairement simplifiée et schématisée pour mettre en relief dans un premier temps l'essence même de ce qui caractérise le système immunitaire, à savoir la spécificité, la diversité et la mémoire. En réalité, à mesure que de nouvelles techniques élargissent le champ des connaissances en immunologie, la complexité du système immunitaire ne cesse d'augmenter.... Grâce aux marqueurs de surface, les cellules T ont été subdivisées en deux sous-populations exprimant des antigènes de différenciation distincts de même que des fonctions effectrices différentes. Ce sont les CD4<sup>+</sup> ou cellules T auxiliaires (ou helper), et les CD8<sup>+</sup> ou cellules T cytotoxiques / suppressives. Ces sous-populations sont en fait hétérogènes; c'est ainsi qu'on sépare maintenant au niveau clonal, chez la souris, les T helpers (Th) en deux types distincts caractérisés par la sécrétion de lymphokines différentes et l'induction d'isotypes spécifiques d'immunoglobulines: les Th1 sécrètent l'interleukine 2 (IL-2) et l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) , sont activés de façon autocrine par l'IL-2 et induisent une augmentation de la production des isotypes IgG2a, IgG3 et IgM. Les Th2 sécrètent les interleukines 4, 5 et 6 (IL-4, IL-5 et IL-6), sont activés de

façon autocrine par l'IL-4 et provoquent une plus forte production d' IgG1 et d' IgE.

Cependant, les connaissances de plus en plus approfondies en immunologie font surgir de nouvelles questions et parmi celles-ci certaines restent en suspens....Par exemple, à la lecture du paragraphe précédent, on se demande quel est le mécanisme régulateur de l'activation préférentielle des Th1 ou des Th2 par certains antigènes. C'est une question que beaucoup se sont posée, sur laquelle beaucoup ont travaillé, mais où il reste encore un énorme travail à faire! Nous avons justement opté de nous atteler à cette tâche. Pour exécuter un travail, il faut un outil, et pour outil nous avons choisi quant à nous, dans ce cas précis, les liposomes.

Les liposomes sont des vésicules artificielles synthétisées à partir de phospholipides qui s'organisent spontanément en bicouches lamellaires closes en solution aqueuse. Ils sont utilisés depuis maintenant près de 30 ans comme systèmes modèles dans les études portant sur les fonctions des biomembranes et le mode d'action de certaines molécules sur la membrane lipidique. Par ailleurs, très vite, on a remarqué que ces vésicules pouvaient encapsuler des petites molécules hydrosolubles et ainsi les protéger du milieu extérieur. Vu leur énorme versatilité, leur biodégradabilité, leur toxicité quasi nulle et leur comportement en milieu vivant, les liposomes étaient alors tout indiqués comme agents thérapeutiques, en tant que transporteurs de composés actifs ou de médiateurs chimiques vers une cible privilégiée. Pourtant l'utilisation en pharmacologie, avec idée de ciblage préférentiel, s'est avérée quelque peu difficile si ce n'est décevante puisque les liposomes se dirigent sélectivement vers les cellules phagocytaires. Par contre, au niveau de l'immunologie fondamentale, cette restriction devient en fait d'un intérêt inespéré, puisque

ces cellules sont comme on l'a vu les initiateurs de la réaction immunitaire. À l'heure actuelle, après quelque 15 années de recherches *in vivo* et *in vitro*, les liposomes sont reconnus comme des puissants stimulateurs de la réponse immune, tant spécifique que non spécifique. C'est toutefois surtout *in vivo* que ce caractère adjuvant a été démontré, bien que le pourquoi et le comment n'aient pas encore été élucidés.

Nous avons mis au point un système modèle d'antigène liposomal. L'antigène est soit encapsulé dans les vésicules lipidiques, soit ancré en surface par liaison covalente. Les liposomes servent donc de transporteurs d'antigène mais la différence fondamentale dans leur liaison avec l'antigène implique par le fait même de probables différences dans la prise en charge par l'organisme, les phénomènes de présentation aux cellules cibles et l'activation des diverses populations cellulaires.

Dans ce contexte, la recherche entreprise a pour but d'analyser la nature des interactions liposomes-cellules immunes pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les phénomènes de potentiation. La problématique de la recherche est donc double et se traduit par une méthodologie à deux niveaux : d'une part, une approche *in vivo*, pour analyser les conséquences de l'immunopotentialisation par l'étude qualitative et quantitative des immunoglobulines produites lors des réponses immunes modulées par les antigènes liposomaux utilisés. D'autre part, une approche fondamentale, au niveau cellulaire, *in vitro*, pour analyser les circuits cellulaires préférentiellement activés, par la mesure du taux de prolifération cellulaire. Les variations de la réponse tant humorale qu'à médiation cellulaire reflètent la façon dont les liposomes s'insèrent dans le circuit immunitaire et la voie qu'ils empruntent à l'antigène. Dans les deux cas, j'ai

étudié l'influence du mode d'association de l'antigène avec le liposome, en créant, pour l'étude in vitro, des milieux artificiels déprimés ou non en population macrophagique et incubés avec des anticorps anti-cytokines (anti-IL-1 ou 4, anti-IFN $\gamma$ , anti-TNF $\alpha$ ). L'analyse comparée des modulations enregistrées doit mener à une meilleure compréhension des phénomènes de présentation, de macrophage-dépendance et de T-dépendance, en même temps qu'elle est susceptible de fournir des hypothèses sur les mécanismes de l'effet adjuvant des liposomes.

## CHAPITRE I

La cascade des évènements engendrée par l'intrusion d'un agent pathogène dans un organisme peut être regroupée en deux grands ensembles de mécanismes :

- la capture et la présentation de l'antigène par les CPAg
- l'activation lymphocytaire

Ils constitueront les deux premiers points de ce chapitre. Le troisième point traitera du "groupe d'intervention" mis au point dans le but de s'immiscer au début de la cascade immune, les antigènes liposomaux. Suivra le quatrième point qui expose en détail la problématique de la recherche et la méthodologie choisie.

### **1.1 Phase I de la cascade immune: prise en charge et présentation**

#### **1.1.1 La capture par les cellules présentant l'antigène**

Les macrophages et les cellules B utilisent des stratégies différentes pour capturer les agents étrangers. Les macrophages adsorbent l'antigène de façon aspécifique et l'internalisent par phagocytose classique ou par pinocytose en phase fluide, alors que les B l'internalisent selon une endocytose par intermédiaire de récepteur, après avoir capté l'antigène via leurs récepteurs membranaires spécifiques qui sont les immunoglobulines (Ig) de surface (Ashwell J.D. 1988; Chesnut *et al.* 1982 et 1985).



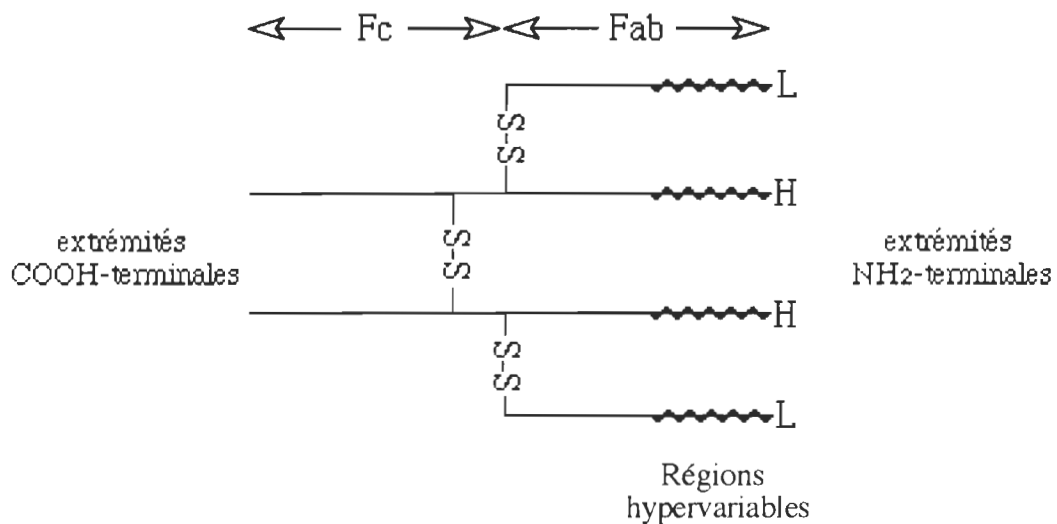
sur les récepteurs de l'antigène des cellules B

Les cellules B expriment à leur surface beaucoup de molécules avec fonction de récepteur pour des ligands définis. Parmi celles-ci, les molécules d'immunoglobulines, présentes en très grand nombre à la surface cellulaire, fonctionnent comme les récepteurs primaires de l'antigène.

Les différentes classes d'immunoglobulines et leurs fonctions seront décrites en détail au paragraphe 2 de ce chapitre (voir le ZOOM sur les anticorps, page 20). De façon schématique, une Ig est constituée de 2 types de chaînes polypeptidiques:

- deux chaînes lourdes (H) de 50 kdal environ chacune
- deux chaînes légères (L) de 25 kdal chacune,

réunies par un nombre variable de ponts disulfure, suivant la classe d'Ig considérée.



**Schéma 1: structure d'une immunoglobuline**

Du point de vue fonctionnel, elle se décompose en deux parties: l'une, le fragment Fc, du côté C-terminal des chaînes lourdes, est un médiateur d'activités biologiques; les deux autres, les fragments Fab, du côté N-

terminal, portent les sites de combinaison à l'antigène. Cette partie contient des régions variables quant à la séquence des acides aminés (les premières 110 positions), à l'intérieur desquelles se retrouvent des zones d'hypervariabilité, ce qui donne des spécificités différentes et très variables à ces sites. C'est la région hypervariable dont l'extrême diversité n'a d'équivalent que l'extrême diversité des antigènes!

La présence d'Ig membranaires (Igm) a été mise en évidence par la fixation d'anticorps anti-Ig fluorescents. Leur structure ne diffère de celle des Ig sériques que par la permutation des 18 résidus C-terminaux en 45 résidus, dont une portion cytoplasmique de 3 résidus et un peptide-membrane extrêmement hydrophobe de 25 acides aminés, qui va permettre à l'Ig de s'ancrer dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. La partie variable des récepteurs, porteuse de la spécificité de liaison avec l'antigène, est exposée à la surface des lymphocytes. Il est à noter que les déterminants antigéniques des Ig de membrane sont ceux des Ig sécrétées.

Les cellules B internalisent également l'antigène par pinocytose, mais l'efficacité d'une internalisation par leurs récepteurs de surface est augmentée par plusieurs ordres de magnitude ( $\times 10^3$ ) (Abbas, A.K. 1987; Casten *et al.* 1988; Singer *et al.* 1990). En effet l'activation par les B ne nécessite qu'une concentration d'antigène extrêmement faible comparée à celle requise par les macrophages. L'ingestion du complexe récepteur-ligand s'effectue au niveau des "puits enveloppés", sortes de dépressions en surface recouvertes d'une couche protéique à base de clathrine du côté cytoplasme. Les vésicules d'ingestion dans ce cas sont beaucoup plus petites que dans le cas de la phagocytose, de l'ordre de 0,1 à 0,2  $\mu\text{m}$ , comparativement à 1 ou 2  $\mu\text{m}$ , pour une particule phagocytée.



### **1.1.2 La dégradation de l'antigène**

Une fois l'antigène internalisé, les CPAg dégradent partiellement la molécule en peptides, c'est-à-dire en fragments aptes à être présentés aux cellules T. Cette transformation ou "processing" est un phénomène qui prend place dans divers compartiments intracellulaires à bagage hydrolytique différent de l'un à l'autre.

- Dans le cas de la phagocytose, la grosse vésicule formée par la membrane plasmique ayant englobé la particule antigénique fusionne avec les lysosomes pour former un phagolysosome où les protéases, en environnement acide, dégradent le matériel ingéré.
- Dans le cas de l'endocytose par récepteur, le complexe récepteur-ligand, ingéré en tant que puits enveloppé ou petite vésicule, se dissocie au cours de la voie endocytaire, probablement au niveau des endosomes; puis, l'antigène subit au cours de l'acidification du contenu de l'endosome une dégradation qui sera cependant plus lente et plus partielle que dans les lysosomes.

### **1.1.3 Le choix du peptide immunogénique par le CMH**

L'antigène est maintenant dans la cellule présentatrice, sous forme de peptides, soit dans les endosomes, soit dans les lysosomes. Les molécules du CMH synthétisées par les CPAg vont entrer en contact avec ces peptides immunogéniques. Les molécules du CMH présentent une grande affinité pour les peptides antigéniques, et même une incapacité à former un complexe avec un antigène natif, c'est-à-dire un antigène n'ayant encore subi aucune

protéolyse intracellulaire (Leserman, L.D 1987; Sette *et al.* 1989). Structure et fonctions de ces molécules sont maintenant à détailler :



### sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

L'étude comparée de la structure des molécules du CMH et des Ig a mené à l'hypothèse selon laquelle un gène ancestral unique codant pour un domaine de 110 acides aminés environ serait à l'origine de tout un ensemble de glycoprotéines impliquées dans les phénomènes de reconnaissance immune : notamment les Ig, les molécules du CMH et les récepteurs de l'antigène des cellules T. Une "superfamille" en quelque sorte...

Les protéines du CMH impliquées dans les phénomènes de reconnaissance immune se répartissent en 2 classes de structure différente :

a) Les molécules de classe I, que l'on trouve à la surface de toutes les cellules nucléées, composées de :

\* une chaîne lourde  $\alpha$  de 45 kdal (339 aa) subdivisée en :

- 3 domaines extracellulaires, côté N-terminal,  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$  (90 aa chacun)

- 1 " transmembranaire de 25 aa

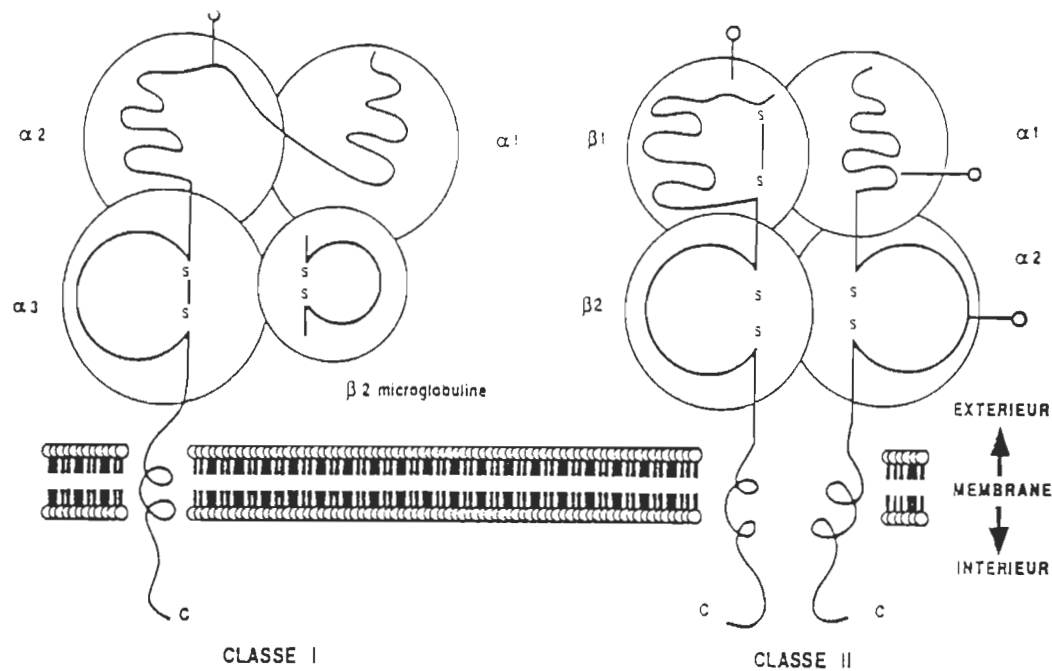
- 1 " cytoplasmique, C-terminal de 30 aa environ.

\* une chaîne de 12 kdal, la  $\beta$ -microglobuline, extracellulaire, associée à  $\alpha$ .

b) Les molécules de classe II exprimées principalement sur les B, les macrophages, les cellules dendritiques et certaines cellules T activées, c'est-à-dire en bref les cellules immunocompétentes. Elles comportent 2 chaînes,  $\alpha$  et  $\beta$ , chacune composée de :

- 2 domaines extracellulaires, côté N-terminal (90 à 100 aa chacun)

- 1 domaine transmembranaire
- 1 queue cytoplasmique de 10-15 aa, C-terminale.



### Schéma 2: Structure des molécules du CMH (J.M.Bastide, 1989)

L'étude de la structure tridimensionnelle révèle l'existence d'une poche formée par les régions hélicoïdales de  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  reposant sur un sillon composé des 8 feuillets  $\beta$  appartenant à ces deux domaines, dans le cas de la molécule de classe I. Cette donnée est primordiale puisqu'il s'agirait du site de fixation des peptides immunogéniques. D'après la taille de cette poche ( $25\text{\AA} \times 10\text{\AA} \times 11\text{\AA}$ ), ces fragments peuvent avoir jusqu'à 20 aa (Donermeyer *et al.* 1989; Brown *et al.* 1988). Pour les molécules de classe II, cette poche serait située entre les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ . Elle est constituée de façon à recevoir des peptides variés selon la position qu'ils adoptent ou selon leur état de compaction. Ceci explique qu'une même molécule du CMH puisse présenter une très grande diversité d'antigènes.

La fonction des protéines du CMH est de lier et de présenter les peptides antigéniques aux cellules T. De façon générale, les récepteurs des

CD8 (cytotoxiques) reconnaissent les peptides liés aux molécules de classe I, et ceux des CD4 (helpers) reconnaissent les peptides liés aux molécules de classe II. En fait, il n'y a pas de totale ségrégation dans les fonctions de présentation. Il est plus pertinent de dire que les molécules de classe I lient les peptides provenant de protéines synthétisées de façon endogène, alors que celles de classe II lient et présentent les peptides provenant d'antigènes exogènes capturés par les cellules. La différence est plutôt due à un site différent de liaison intracellulaire, les phases de transport intracellulaire lors de la dégradation n'étant pas les mêmes pour tous les antigènes. La prise en charge de l'antigène par les deux types de CPAg, macrophage ou cellule B, prend dans ce contexte toute son importance.

Le cas qui nous intéresse est celui des antigènes exogènes qui se retrouvent associés aux produits de classe II du CMH. De toutes récentes études (Stockinger *et al.* 1989; Brodsky *et al.* 1991) proposent que les antigènes de classe II du CMH restent liés à une chaîne invariante (I) dans le reticulum endoplasmique puis dans l'appareil de Golgi, puis passent dans les endosomes où ils restent tant qu'ils demeurent accolés à la chaîne I. Quand cette dernière se dissocie du CMH par protéolyse, la molécule du CMH devient alors capable de lier sélectivement un peptide immunogénique. Le complexe CMH-peptide emprunte la voie de recyclage et migre alors en surface où a lieu la reconnaissance par les cellules T.

La structure de la chaîne invariante est simple. C'est une glycoprotéine de 31 ou 43 kd, comportant :

- 1 domaine extra-cellulaire C-terminal de 64 acides aminés environ
- " transmembranaire de 26 aa

- 1 domaine cytoplasmique N-terminal de 46 ou 30 aa

La molécule est trouvée associée aux protéines de classe II du CMH à certaines phases du transport dans la voie endocytaire, aux stades intermédiaires, endosomal tardif ou pré-lysosomal. Une de ses fonctions probables serait d'agir en molécule chaperonne, c'est-à-dire de maintenir intact le site de liaison du peptide sur le CMH jusqu'à ce que le CMH arrive au lieu de rencontre avec le peptide. Son rôle pourrait même être de guider la molécule jusqu'au site où se trouve l'antigène dégradé à prendre en charge. Il semblerait, de plus, que la molécule du CMH adopte des changements conformationnels de sorte que le peptide soit physiquement englobé par lui et que par conséquent le complexe ainsi formé soit extrêmement stable d'une part, et d'autre part, qu'il devienne résistant à une éventuelle protéolyse pouvant intervenir à la surface cellulaire.

Le peptide minimal requis pour donner une réponse maximale est de 11 à 12 résidus, mais 7 ou 8 résidus seulement suffisent pour obtenir une réponse quelle qu'elle soit. Si la liaison CMH-peptide ne se fait pas, l'antigène poursuit sa route vers les lysosomes où il est complètement dégradé. On peut dire que c'est en fait la molécule du CMH qui protège l'antigène d'une totale dégradation.

Fait important à souligner, il y a un recyclage permanent, rapide et continu des molécules impliquées dans tous les mécanismes de prise en charge. Recyclage :

- des molécules qui assurent la liaison avec l'antigène: Ig de membrane ou récepteurs macrophagiques.

- de la membrane plasmique : phénomène important surtout dans le cas de la phagocytose où une énorme surface cellulaire est ingérée à chaque fois. Le recyclage assure le retour du matériel membranaire à la surface cellulaire.

#### **1.1.4 La présentation aux cellules T**

Les T helpers ne peuvent reconnaître un antigène que s'il a été au préalable partiellement dégradé puis présenté associé avec une molécule du CMH. Une cellule T reconnaît en même temps, sur la même cellule, un agent étranger et une protéine de son propre CMH. Ce stimulus quelque peu "hétérogène" est ce qu'on appelle la restriction au CMH, qui est le signal de départ de la réaction immunitaire. Le complexe est reconnu par le biais d'un récepteur spécifique à la surface cellulaire des T. On sait maintenant que c'est un récepteur unique qui remplit cette fonction.

Le "processing" est donc essentiel à la fonction de présentation, au même titre que le CMH, et nombre de recherches (Lanzavecchia, A. 1990; Brodsky *et al.* 1991) prouvent que la présentation d'un antigène soluble natif est inhibée par des anti-protéases telles que la leupeptine, ou des substances telles que la chloroquine qui réduisent l'activité protéolytique en augmentant le pH des organites intracellulaires, endosomes ou lysosomes.

Ces inhibiteurs peuvent cependant agir à deux niveaux : ils inhibent la présentation soit parce que la dégradation partielle de l'antigène est arrêtée et que les T ne reconnaissent pas une molécule native; soit parce que la dissociation de la chaîne invariante et du CMH a été inhibée dans les endosomes, et le site de liaison du peptide n'ayant pas été libéré, le CMH ne peut remplir son rôle de présentateur.

## **1.2 Phase II de la cascade immune : l'activation lymphocytaire**

La phase I de la cascade immune représentée par la fonction de présentation s'ouvre sur la phase II qui est l'ensemble des phénomènes d'activation des deux composantes immunes spécifiques de l'antigène : les lymphocytes T et B; activation qui se traduit par leur prolifération, leur différenciation et la mise en place de toutes les activités effectrices ou régulatrices, par l'intermédiaire de nombreux médiateurs chimiques, les lymphokines.

### **1.2.1 L'activation des cellules T helpers**

#### **1.2.1.1 Le récepteur de l'antigène**

Le récepteur de l'antigène sur les cellules T est le TCR (T cell receptor). Le TCR seul, quoique probablement suffisant pour stimuler les cellules T différenciées, ne peut induire les réponses prolifératives des T immatures. En réalité, il ne peut transmettre les signaux sans certaines molécules associées à lui de façon non covalente: il forme une structure complexe à la fois avec le récepteur CD3, dont la longue région cytoplasmique sert de relais pour les phénomènes intracellulaires générés suite à la présentation de l'antigène, et, dans le cas des T helpers, avec le récepteur de la molécule de classe II du CMH (CD4).

En effet, ce signal primaire d'activation est suivi de l'activation séquentielle des gènes menant à la sécrétion de nouvelles molécules de surface, récepteurs divers, et de lymphokines qui vont elles-mêmes entraîner l'expansion clonale des T spécifiques de l'antigène et l'activation des lymphocytes B.

### 1.2.1.2 Les lymphokines

C'est sous ce vocable ou celui plus général de cytokines que l'on désigne les divers messagers intercellulaires, polypeptides de 15 à 30 Kd en moyenne, qui contrôlent tous les phénomènes de prolifération, de différenciation et de régulation lors de la réponse immune. On les trouve dans les surnageants des cellules activées par un antigène ou un mitogène. Elles peuvent induire, modifier ou supprimer les fonctions de nombreux types cellulaires, et par là, jouent un grand rôle dans beaucoup de réactions d'ordre physiologique. Elles agissent à la façon d'une hormone ou d'un médiateur endogène, et leurs effets sont multiples, souvent divergents et même antagonistes. Le terme "interleukine" a été créé en 1979 suite aux besoins d'unification de nomenclature de tous ces médiateurs (Watson *et al.* 1979).

#### a) Mécanismes d'action :

Une cytokine peut agir sur la cellule qui l'a produite (action autocrine) ou de concert avec une autre pour stimuler le même type cellulaire (action synergique), ou encore, induire divers effets sur différentes cellules (action pléiotropique). Elle peut aussi être sécrétée par des types cellulaires distincts et combiner à l'envi n'importe lesquelles des actions énumérées ci-haut. Par contre, le mode d'action sur les cellules cibles est unique et se fait en trois temps:

- fixation sur un récepteur membranaire
- déclenchement de mécanismes intracellulaires
- induction d'évènements biochimiques aboutissant à l'effet spécifique de la lymphokine dans une cellule donnée.



Quand la lymphokine se détache de son récepteur, l'activation cesse. Quand la concentration de l'antigène dans l'organisme diminue, le nombre des récepteurs de la lymphokine diminue également. On voit tout de suite l'utilisation potentielle d'un tel mécanisme d'action, semblable en tout point à l'interaction hormone / récepteur, pour augmenter ou supprimer l'effet engendré par une lymphokine donnée, aussi bien *in vivo* que *in vitro*.

b) Moyens d'intervention :

On possède plusieurs méthodes, utilisées soit en thérapeutique, soit pour l'étude *in vitro* des effets des cytokines ou des mécanismes cellulaires du système immunitaire, pour supprimer l'action d'une lymphokine. On peut faire agir :

- un anticorps contre la molécule elle-même
- un anticorps contre son récepteur
- des récepteurs solubles de cette cytokine

c) Action des principales lymphokines sur la réponse immune

Les cytokines ne se réduisent pas à leur rôle à l'intérieur du système immunitaire. Les cellules productrices et les cellules cibles peuvent appartenir à des systèmes variés, en particulier nerveux, endocrinien ou hématopoïétique, dans des relations étroites et souvent fort complexes. Notre propos ici ne peut déborder le système immunitaire, mais il ne faut pas perdre de vue que cette vision est réductrice.





### sur le rôle des cytokines

Je parlerai des interleukines 2, 4, 5, 6, 10, de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$ , produits par divers sous-types de cellules T et sous diverses conditions de stimulation, de même que de l'IL-1 et du TNF $\alpha$ , produits par les macrophages. Je mettrai l'accent sur leur action sur les lymphocytes T et B ainsi que sur les macrophages (Schéma 3).

- Effets sur les T

Le principal facteur de croissance des T est l'IL-2; c'est un puissant agent immunorégulateur dès les tout premiers stades de la réponse immune, qui agit aussi bien sur les T helpers que les T cytotoxiques et les NK ("natural killer", les cellules tueuses naturelles qui éliminent les cellules tumorales ou infectées).

IL-4 : • en conjonction avec un agent mitogène, induit la prolifération des thymocytes et des T matures, de même que la maturation des thymocytes en cellules soit CD4 soit CD8.

- en coopération avec IL-1, stimule les sous-populations de cellules Th2 et bloque la production d'IFN $\gamma$  des Th1

IFN $\gamma$  : puissant rôle anti-prolifératif sur les clones Th2,  
inhibition de la sécrétion d'IL-4 et de la formation des  
conjugués T/B favorisée par l'IL-4.

IL-5 : induction du récepteur de l'IL-2 sur les T helpers,  
maturation des thymocytes en T cytotoxiques

IL-6 : avec l'IL-2, induit la prolifération des T helpers et cytotoxiques

- Effets sur les B

Trois interleukines constituent les principaux facteurs de stimulation des B à différents niveaux:

IL-4: \* activation première des B au repos: cellule pro-B, pré-B, puis immature

\* induction de l'expression des molécules de classe II du CMH sur les B

IL-5: croissance et expansion clonale des B activées

IL-6: différenciation des B et induction de la production des anticorps

Mais, les IL-4 et 5 sont aussi impliquées dans la commutation d'isotypes, dépendante des T, et induisent la sécrétion des IgG1, IgE et IgA. L'IL-6 est celle qui agit le plus tard dans la réponse et lors des réponses secondaires plutôt que primaires. Enfin, l'IL-1 est un cofacteur d'activation avec l'IL-4 pour la production d'anticorps. La grande différence entre l'IL-5 et les IL-4 et 6 est que l'IL-5 agit sur un nombre restreint de types cellulaires (Tc, B activé, éosinophiles), à l'encontre des deux autres et surtout de l'IL-4 qui a une action fort diversifiée et pléiotropique. En ce qui concerne l'IL-4, elle augmente la capacité des B spécifiques de l'antigène de former des conjugués avec les cellules T (Sanders *et al.* 1987), donnée primordiale dans les phénomènes de présentation et d'amplification de la réponse humorale.

- Effets sur les macrophages

Diverses actions sont exercées sur les macrophages par l'IFN $\gamma$ , les IL-4 et -6:

IFN $\gamma$  : régule l'expression des antigènes de classe II du CMH sur les macrophages et augmente leur activité antivirale.

IL-6 : assure leur différenciation

IL-4 :a un effet inhibiteur sur la production des cytokines inflammatoires: IL-1, 6, et TNF $\alpha$ .

Le TNF agit en synergie soit avec l'IFN $\gamma$  dans une action antitumorale et antiproliférative, soit avec l'IL-1 dans la stimulation des fibroblastes à produire de l'IL-6. Produite par les macrophages, son action en est une de renforcement des effets d'autres cytokines impliquées dans la régulation des fonctions macrophagiques.

- Un point spécialement pour une toute nouvelle interleukine: l'IL-10, ou la CSIF (cytokine synthesis inhibitory factor), sécrétée par les Th2 et qui serait responsable de l'effet inhibiteur sur la synthèse des cytokines produites par les Th1. Son action est donc le pendant de celle de l'IFN $\gamma$ , produit par les Th1, sur la prolifération des Th2 (Mosmann *et al.* 1990; Street *et al.* 1990).

## 1.2.2 L'activation des lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les seules cellules à produire des anticorps, mais les différentes étapes de leur maturation les menant au stade de cellules sécrétant des anticorps va nécessiter l'aide des cellules T, aide qui se matérialise comme nous venons de le souligner par le grand nombre de lymphokines produites et leurs effets pléiotropiques. Cette collaboration T/B est essentielle aux mécanismes de la réponse humorale, même si l'activation première des B naïfs, c'est-à-dire n'ayant jamais été en contact avec l'antigène, se fait par le contact de l'antigène avec les immunoglobulines de surface (Vitetta *et al.* 1987; Gosselin *et al.* 1988; Abbas *et al.* 1990).

### 1.2.2.1 L'activation des B naïfs

La réponse, spécifique de l'antigène, des cellules B est fonction de l'interaction de l'antigène avec les récepteurs Ig de membrane. Les B immatures expriment seulement des IgM en surface, alors que les B matures expriment à la fois des IgM et des IgD. Les IgM, comme toutes les molécules de surface, sont mobiles dans la membrane cellulaire. Sous l'influence d'anticorps anti-Ig, il y a agrégation passive des Ig de surface induite par la formation de réseaux d'Ig ("crosslinking"): c'est le phénomène de "patching", observé avec des anticorps divalents. On peut ensuite voir la formation de "caps" qui correspond à un mouvement actif des Ig vers un pôle de la cellule. Les antigènes multivalents, c'est-à-dire présentant plusieurs déterminants antigéniques identiques, induisent le "capping" des récepteurs. Ce sont des mécanismes très importants dans la compréhension des phénomènes de stimulation des B par certains antigènes.

L'activation des B naïfs par leur ligand naturel, c'est-à-dire l'antigène, les sensibilise aux facteurs solubles délivrés par les T helpers et les rend plus réceptifs à l'aide accordée par ceux-ci. Le second signal d'activation a donc lieu par le biais des facteurs de croissance sécrétés par les T. Il entraîne maturation et prolifération des clones de cellules B activées.

#### 1.2.2.2 La production d'anticorps par les plasmocytes

Après l'étape de prolifération, les cellules B se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Elles vont alors produire de grandes quantités de molécules d'Ig ayant la même spécificité que celle exprimée par les Ig de membrane. La réponse immune humorale qui se traduit par la production des anticorps exige la collaboration étroite des cellules T qui sécrètent les principaux facteurs nécessaires à cette production. Les antigènes vis-à-vis desquels la sécrétion des anticorps nécessite l'intervention des

cellules T sont les antigènes T- ou thymo-dépendants. Toutefois, certaines molécules de grande taille comme le lipopolysaccharide de E.Coli (LPS) ou la flagelline polymérisée, molécules à forte densité de déterminants identiques répétitifs provoquent l'activation polyclonale des B et la production d'anticorps sans l'aide des T. Les antigènes T-indépendants persistent longtemps dans l'organisme parce que dégradés lentement.



### **sur les anticorps : classification et fonctions**

Les anticorps sont des protéines sériques produites par un organisme en réponse à une molécule étrangère; ils se lient spécifiquement à l'antigène qui a induit leur synthèse. Bien que de structure générale analogue, ils constituent une famille très diversifiée, tant par leurs propriétés physicochimiques que par leurs fonctions.

Il existe deux types de chaînes légères:  $\kappa$  et  $\lambda$ . Elles s'associent indifféremment avec cinq types de chaînes lourdes:  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$ , qui donnent leur nom aux cinq classes d'immunoglobulines, respectivement les IgM, IgG, IgE, IgD et IgA. La classe des IgG comporte, chez la souris, 4 sous-classes : IgG1, IgG2a et b, IgG3 qui se distinguent par la séquence en acides aminés de leurs chaînes lourdes, codée par des gènes différents, et par l'arrangement des ponts sulfure intercaténaires.

Les IgM sont les premières à apparaître lors de la réponse, et les premières formées par le nouveau-né. Elles jouent donc un rôle précoce de défense contre les agents infectieux. On a déjà vu qu'elles constituent le récepteur primaire de l'antigène sous leur forme monomérique membranaire; sous leur forme sécrétée, elles sont pentamériques, c'est-à-dire

composées de 5 unités attachées entre elles par des ponts disulfure et offrant ainsi 10 sites de fixation à l'antigène. Elles comptent pour 10% des Ig sériques environ. Les IgM ont la propriété de fixer le complément (système enzymatique complexe de protéines plasmatiques à multiples effets biologiques) et d'activer les protéines de ce système, entraînant la phagocytose des complexes immuns formés ou la lyse des cellules infectées.

Les IgG représentent 70 à 75% des immunoglobulines sériques; elles apparaissent plus tardivement que les IgM dans la réponse primaire mais dominent la réponse secondaire. Elles ont pour fonction de neutraliser les toxines bactériennes. Les IgG1 et IgG3, comme les IgM, ont aussi la capacité de fixer le complément après avoir lié l'antigène.

Les IgA prédominent sous forme de dimères dans les sécrétions des muqueuses nasales, trachéo-bronchiques, la salive, les larmes etc..C'est la première ligne de défense de l'organisme contre les agressions externes.

Les IgE sont surtout connues en immunopathologie dans les réactions d'hypersensibilité et les désordres allergiques. Elles se fixent aux basophiles et aux mastocytes par leur région Fc; quand plusieurs molécules d'anticorps sont pontées par un antigène, la cellule libère des amines vasoactives. Elles ont néanmoins un rôle dans la défense antiparasitaire.

Les plus mal connues sont probablement les IgD qui ne représentent que moins de 1% des anticorps sériques. Elles ont un rôle de récepteur membranaire de l'antigène, surtout sur les cellules B naïves.

### **La commutation isotypique**

Les médiateurs libérés par les Th activés vont influencer l'expression de différentes classes d'Ig par les cellules B stimulées en induisant la commutation d'une classe à une autre. C'est la commutation isotypique, ou



"switch" d'isotype. Elle se fait d'une façon séquentielle selon l'ordre des gènes codant pour la région constante des chaînes lourdes sur le chromosome:

$C\mu$  ,  $C\delta$  ,  $C\gamma 3$  ,  $C\gamma 1$  ,  $C\gamma 2b$  ,  $C\gamma 2a$  ,  $C\epsilon$  ,  $C\alpha$

Les clones de cellules B qui commutent continuent à exprimer la même région variable de la chaîne légère et de la chaîne lourde de sorte que la spécificité à l'antigène demeure inchangée. Les cellules B matures produisant une Ig quelle qu'elle soit, ont d'abord été des cellules B exprimant des IgM, à un stade plus précoce de leur développement. La règle générale est que chaque clone de cellules B ne puisse produire qu'un type d'immunoglobuline à un moment donné, mais dans certains cas, on peut voir une sorte de chevauchement de production et donc deux isotypes à la fois, pendant un court laps de temps toutefois.

### **Le mécanisme de régulation**

La nature de l'antigène et les cellules T, par l'intermédiaire des cytokines sécrétées, déterminent sur les plans qualitatif et quantitatif la production des immunoglobulines par les plasmocytes; mais on ne peut dire avec assurance si elles induisent le switch d'un isotype donné par les cellules B, ou si elles induisent la prolifération et la différenciation des B qui sont destinés à la synthèse d'un isotype donné. En fait, tout dépendrait probablement de la lymphokine considérée; ainsi, l'IFN $\gamma$  augmente la production des IgG2a par les cellules B déjà programmées pour en produire, mais n'induit pas la commutation de classe, comme l'IL-4 le ferait pour les clones de B synthétisant les IgE (Finkelman *et al.* 1990; Bossie *et al.* 1991).



- l'IL-4 induit l'expression du CMH-classe II sur les B
- inhibe la production d'IFN $\gamma$
- favorise les composés T/B

Par ailleurs, l'IL-4 est un facteur de croissance autocrine pour les Th2, de la même façon que les Th1 productrices d'IL-2 développent les récepteurs pour cette lymphokine et l'utilisent comme facteur de croissance autocrine.

D'autres conditions de stimulation diffèrent. Ainsi l'IL-1, sécrétée par les macrophages, est un cofacteur nécessaire à la stimulation des clones Th2 en même temps que l'IL-4 (Chang *et al.* 1990). Au contraire, les clones Th1 n'ont pas de récepteurs pour IL-1 et ne répondent pas à cette cytokine. Il est donc logique de penser que les Th2 seront activés et proliféreront suite à une présentation de l'antigène effectuée par les macrophages puisqu'elle leur fournira du même coup l'IL-1 nécessaire; parallèlement, une présentation par les B pourra se faire plus adéquatement avec les cellules Th1, sans besoin d'IL-1. Pourtant il ne faut pas perdre de vue que les Th1 activent mieux les macrophages par le biais de l'IFN $\gamma$  qui induit l'expression des molécules du CMH sur ceux-ci, et que les Th2 activent mieux les B grâce à l'IL-4. Le moins que l'on puisse dire est que les deux sous-populations de T helpers n'entretiennent pas des rapports très simples! et il y a autre chose...

#### 1.2.3.2 La régulation de la production d'immunoglobulines

La principale différence entre les deux sous-populations de T helpers réside dans leur capacité de stimuler la production d'isotypes d'immunoglobulines différents (McKearn *et al.* 1982; Vitetta *et al.* 1987; Snapper *et al.* 1987; Boom *et al.* 1988).

- Avec les clones Th1, on a une hausse de la sécrétion des IgG2a  
IgM  
IgG3
- Avec les clones Th2, on a une hausse de la sécrétion des IgG1  
IgE  
IgA

Cette production préférentielle, et même jusqu'à un certain point exclusive, est directement reliée à la sécrétion de lymphokines différentes par les deux populations de cellules, plus précisément l'IFN $\gamma$  et l'IL-4. C'est ainsi que l'IL-4 sécrétée par les Th2 inhibe fortement les IgM, IgG2a et IgG3, tout comme l'IFN $\gamma$ , sécrété par les Th1, inhibe l'expression des IgG1 et des IgE. Ces effets inhibiteurs réciproques ont aussi été observés in vivo.

Nous verrons plus loin les implications biologiques de ce jeu d'influence des deux lymphokines. Pour le moment, un schéma s'impose pour visualiser les deux voies d'activation à partir de l'entrée en scène de l'antigène, lors de la présentation par les CPAg, jusqu'à la production des anticorps.

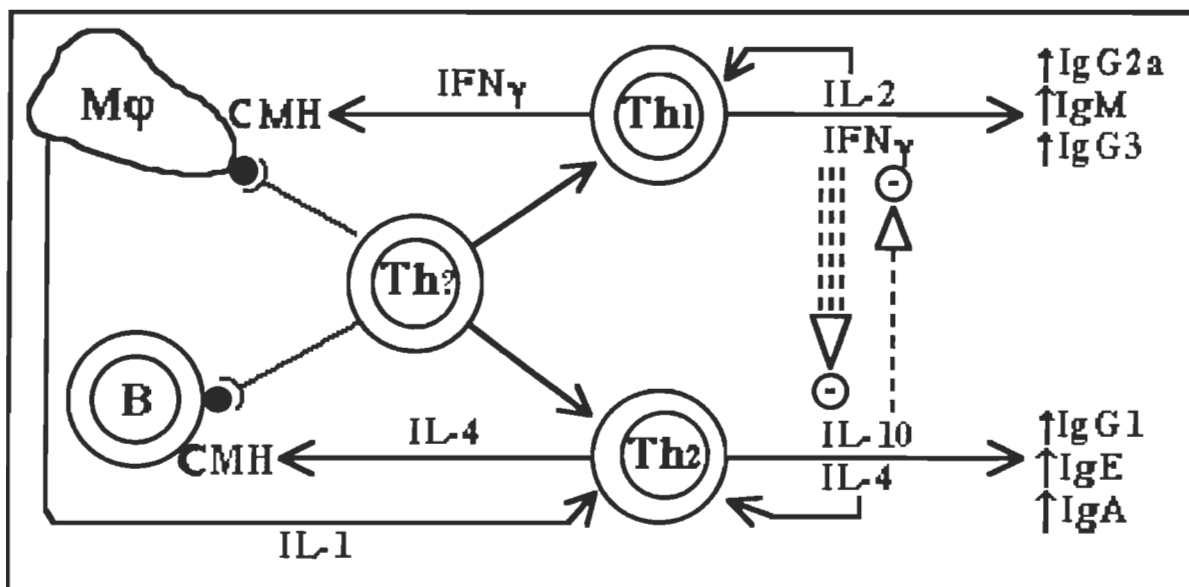


Schéma 4: Voies d'activation et sous-populations T helpers

### 1.2.3.3 La collaboration T/B

L'action des Th1 et des Th2 sur les B a été étudiée avec les clones murins (Snow *et al.* 1987). Il y a activation des B soit par contact direct avec les Th2 activés, soit par l'intermédiaire de l'IL-4 et de l'IL-5 des surnageants de culture; dans ce cas, on a une prolifération maximale avec production optimale d'anticorps. Les B non naïfs n'ont pas besoin du contact pour proliférer, les lymphokines constituant un stimulus suffisant. L'IL-4 produite par les Th2 entraîne l'augmentation de la taille des cellules B et stimule l'expression des molécules de classe II du CMH sur les B, favorisant du même coup les interactions cellule à cellule ("cognate interactions") et les conjugués T/B (Vitetta *et al.* 1987).

L'aide apportée par les Th1 est plus difficile à apprécier: on observe une prolifération des B mais pas d'augmentation de production d'Ig, probablement parce que la sécrétion d'IL-2 diminue beaucoup dans les cultures à long terme *in vitro*, et de plus, une forte concentration d'IFN $\gamma$  dans le milieu peut être immunosuppressive.

### 1.2.3.4 La différenciation des sous-populations Th1 / Th2

Les écarts que l'on a soulignés au niveau aussi bien des fonctions des Th1 et des Th2 que de leurs activités effectrices et régulatrices confèrent une extrême importance au problème de la différenciation de ces deux sous-populations.

On ne sait pas si les sous-populations de T helpers représentent des lignées différentes ou si ce sont les différentes étapes de maturation d'une même lignée (Street *et al.* 1990). Mais beaucoup de recherches sur les populations de T normales concluent que, pour les cellules spléniques de

souris en tout cas, et lors d'une première stimulation, il y a sécrétion de IL-2 et d'IFN $\gamma$ , mais aucune production significative de IL-4 ou 5. Une restimulation avec le même antigène mène à la sécrétion de quantités notables de ces deux dernières lymphokines (Swain *et al.* 1988; Powers *et al.* 1988).

Les Th1 apparaîtraient donc plus tôt dans la réponse immune. Ce fait indique que leur fonction pourrait être différente de celle des Th2, notamment en ce qui concerne les voies de différenciation des cellules B et les phénomènes de régulation de la réponse. Les cellules Th2, qui produisent l'IL-4, jouent quant à elles un rôle important dans la réponse immune contre un antigène qui persiste dans l'organisme ou qui l'attaque de façon répétitive.

Travaillant sur des clones de T helpers, beaucoup d'auteurs (Chang *et al.* 1990) arrivent à la conclusion que les Th1 prolifèrent en réponse à un antigène présenté par les B naïfs ou par les macrophages sans besoin d'IL-1 exogène, alors que les Th2 nécessitent une source d'IL-1 pour répondre à un antigène présenté par des B. En d'autres termes, la présentation de l'antigène aux clones Th1, est toujours d'emblée effective, qu'elle soit réalisée par les B ou par les macrophages; mais les clones Th2 ne répondent de façon optimale aux B naïfs que s'il y a adjonction d'IL-1.

#### 1.2.3.5 Le rôle physiologique des Th1 et des Th2

L'existence des deux types de cellules T helpers a été démontrée *in vitro*, mais plusieurs études tendent à la confirmer également *in vivo*, tout au moins chez la souris. À cause de leurs fonctions profondément différentes, ces deux sous-types sont des régulateurs importants de la réponse immune.

- Dans le cas des réponses allergiques, on observe une très forte sécrétion d'anticorps, due surtout à l'augmentation de la production d'IgE,

induite par l'IL-4 produit de sécrétion des Th2; et une nette amélioration est observée avec l'IFN $\gamma$ . Les Th2 semblent aussi préférentiellement activés lors de certaines infections parasitaires et dans les cas d'hypersensibilité de type immédiat.

- Les réactions DTH (hypersensibilité de type retardé) et les réponses inflammatoires, caractérisées par une faible production d'anticorps passent par la voie Th1. L'IFN $\gamma$  produit en grande quantité active les macrophages qui ont une action antivirale, antibactérienne et antitumorale. Par ailleurs, les IgG2a sécrétées augmentent la cytotoxicité des macrophages dépendante des anticorps et des cellules NK qui ont les récepteurs pour les IgG2a.

Les données recueillies *in vivo* sur les effets antagonistes de l'IFN $\gamma$  et l'IL-4 ont permis de confirmer qu'il doit effectivement exister deux voies qui sont mutuellement inhibitoires, assurant par le fait même la régulation de la réponse immune qui est alors traduite par un équilibre dans le rapport Th1/Th2. À titre d'exemple, la forte production d'IgE qui caractérise les clones Th2 peut être inhibée par l'IFN $\gamma$  ou un antisérum anti-IL-4. Le fait que l'IFN $\gamma$  ait un effet inhibiteur sur l'IL-4 tend à montrer que les Th1 peuvent agir comme cellules suppressives quant à la production d'IgE.

Ce ne sont que quelques exemples du rôle physiologique des sous-populations de T helpers joué par l'intermédiaire des lymphokines et des immunoglobulines sécrétées. Mais ils montrent à quel point il est important de considérer l'interrégulation de ces deux voies quand on induit une réponse immune thérapeutique. Il faut donc trouver qui "tire les ficelles" dans le jeu de l'activation préférentielle de l'une ou l'autre voie, c'est-à-dire au tout début de la partie.

### **1.3. Les antigènes liposomaux**

#### **1.3.1 Le liposome, docile outil de recherche**

En 1964, les liposomes ne s'appelaient pas encore liposomes: c'étaient des phospholipides qui formaient d'étonnantes structures closes en milieu aqueux, tel que l'avaient observé Bangham et Horne en microscopie électronique. Très vite, d'autres éminents chercheurs, tels que Papahadjopoulos et Grégoriadis notamment, ont fait leur marque dans ce domaine qui a suscité dès le début une vive exaltation, due à l'extraordinaire souplesse de ce matériau de recherche. Je n'ai pas la place ici pour faire même un résumé succinct de la somme des travaux s'y rapportant, depuis maintenant presque 30 ans. Je vais me contenter de présenter les liposomes du point de vue biochimique et physicochimique et de discuter des mécanismes d'internalisation et de ciblage liposomes / cellules. C'est le domaine qui nous intéresse en priorité si nous voulons comprendre les interactions, spécifiques ou non, avec les cellules du système immunitaire. Je citerai en dernier lieu quelques modèles antigéniques liposomaux, qui ont le mérite d'être à la fois les plus originaux et les plus pertinents à notre recherche.

##### **1.3.1.1 Définition**

Les liposomes sont des vésicules artificielles synthétisées à partir de phospholipides qui s'organisent spontanément, en milieu aqueux, en bicouche enserrant un espace clos aqueux. Les molécules lipidiques sont tête-bêche dans la bicouche, leurs têtes hydrophiles orientées vers l'intérieur ou l'extérieur, en contact avec la solution aqueuse; elles emprisonnent les chaînes hydrocarbonées hydrophobes à l'intérieur de la bicouche. Les



liposomes peuvent être préparés à partir de lipides naturels ou synthétiques, d'une seule variété ou d'un mélange, en présence ou non de cholestérol.

#### 1.3.1.2 Principe de base de préparation

a) Les lipides dissous dans un solvant organique sont évaporés jusqu'à obtention d'un film sec adhérant aux parois d'un ballon à col rodé, sous atmosphère d'azote pour contrer l'oxydation des lipides, et à une température (T) légèrement supérieure à leur température de transition de phase ( $T_c$ ).

b) Le film de lipides est délicatement décollé avec des billes de verre en même temps que resuspendu dans le tampon voulu, puis laissé pour hydratation au moins 2 heures à  $T > T_c$ . Si on veut encapsuler une substance dans les vésicules, elle doit être mise en solution dans le tampon de réhydratation.

c) On obtient à ce moment-là des gros liposomes multilamellaires. Beaucoup de méthodes existent pour obtenir par la suite des vésicules plus petites, unilamellaires et de taille assez homogène : sonication, extrusion sur filtres à pores de diamètre variable, extrusion à l'aide d'une presse de French.

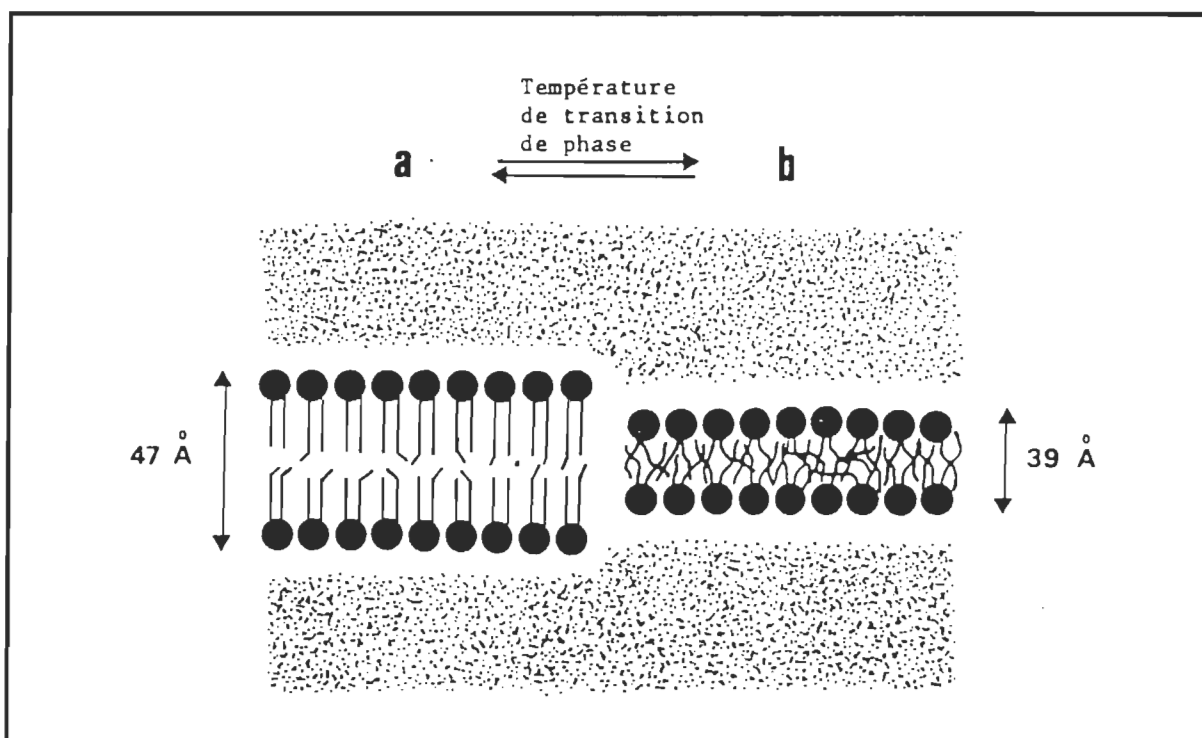
Si on veut coupler une protéine en surface, les liposomes "vides" sont incubés avec la protéine, lipides et protéine ayant subi auparavant une modification à l'échelle moléculaire.

D'autres méthodes de préparation permettent l'obtention de plus gros liposomes mais unilamellaires, l'évaporation du solvant en phase inversée et l'élimination de détergent par dialyse étant les plus utilisées. Le choix final

reste une question de convenance personnelle selon les critères privilégiés, puisqu'il en résulte des différences dans les résultats.

### 1.3.1.3 Paramètres physicochimiques et biochimiques

L'hydrophobicité des membranes lipidiques leur confère une certaine imperméabilité aux ions et aux molécules hydrophiles. Ce paramètre est fonction cependant de la température de transition de phase, elle-même fonction de la longueur des chaînes d'acides gras et de leur degré d'insaturation. Les liposomes maintenus à une température inférieure à la  $T_c$  sont considérés comme solides, à l'état gel; au contraire, à une température supérieure à la  $T_c$ , les lipides sont fluides, à l'état cristal liquide. Les chaînes acylées sont rigides et moins mobiles dans le premier cas que dans le second, ce qui entraîne une faible perméabilité.



**Schéma 5: Structure des deux états d'une couche de phospholipides**

a= phase gel solide b= phase cristal liquide (Machy & Leserman, 1987)

Le cholestérol, utilisé de façon quasi généralisée dans leur fabrication, permet de stabiliser la structure des bicouches en éliminant la transition de phase et en inhibant le mouvement des chaînes acylées. À une concentration molaire de 50%, on a une augmentation de la largeur de la bicouche en même temps qu'une réduction de la perméabilité aux ions et aux petites molécules polaires.

On voit tout de suite les conséquences, au niveau biologique, de la nature des deux composants principaux des liposomes :

- On peut choisir le phospholipide ayant la Tc la plus adéquate selon l'utilisation envisagée, à des fins thérapeutiques ou de recherche *in vitro* .

- Le cholestérol est un composant naturel des membranes cellulaires; il est considéré comme un régulateur de la fluidité membranaire. Il est très important de l'incorporer dans les liposomes devant être utilisés dans les milieux de culture *in vitro* ou bien injectés *in vivo* , et ce, pour diminuer l'interaction avec les lipoprotéines plasmatiques qui déstabilisent les liposomes. On sait aussi que ses effets varient selon sa concentration, on peut donc jouer sur ce paramètre.

- Outre la composition lipidique qui peut varier à l'infini, il y a aussi la charge électrique et la taille des vésicules. Le diamètre peut aller de 0,02  $\mu\text{m}$  pour les petits liposomes unilamellaires, jusqu'à 2 ou 3  $\mu\text{m}$  pour les plus grands liposomes uni- ou multilamellaires, selon la méthode d'obtention choisie. Ce dernier paramètre est très important à cause de son évidente influence sur la distribution et l'élimination des liposomes *in vivo* , et aussi sur la prise en charge par les cellules dans les cultures *in vitro* . Et nous abordons avec lui le problème des interactions liposomes / cellules.

### 1.3.2 Interactions liposomes / cellules

Les liposomes interagissent avec les cellules du système immunitaire selon divers mécanismes qui ne s'excluent pas mutuellement mais qui prévalent à tour de rôle suivant la composition lipidique, la taille, le type cellulaire rencontré ou les conditions du milieu. Les liposomes sont ciblés naturellement vers les macrophages du système réticuloendothélial, mais on peut les cibler de façon préférentielle en incluant dans leur bicouche des ligands spécifiques de certains récepteurs de membrane des cellules cibles.

#### 1.3.2.1 Mécanismes d'interactions

- Ces interactions peuvent être aspécifiques : les vésicules sont adsorbées en surface puis, soit fusionnent avec la cellule et relarguent leur contenu dans le cytoplasme, soit sont internalisées par phagocytose ou endocytose. Dans ce dernier cas, il y a séquestration des liposomes dans des compartiments intracellulaires puis dégradation in situ ou dans des lysosomes ou endosomes.

- Des interactions spécifiques peuvent avoir lieu pourvu que l'on insère dans la bicouche liposomale des molécules qui vont reconnaître un ligand donné sur une cellule. On induit ainsi un effet spécifique sur une population de cellules cibles. De tels exemples sont très nombreux dans la littérature: couplage d'anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules du CMH et étude de la fixation sur des cellules cibles (Leserman *et al.* 1980); couplage de molécules du CMH sur les liposomes pour ciblage vers les cellules immunocompétentes (Walden *et al.* 1986).

### 1.3.2.2 Utilisation des liposomes en immunologie

Même si le pourquoi et le comment de leur caractère adjuvant n'ont pas été explicités jusqu'ici, il n'en demeure pas moins que sa réalité a été démontrée par beaucoup de recherches aussi bien sur le plan appliqué que fondamental (Gregoriadis *et al.* 1987; Van Rooijen *et al.* 1989). L'effet adjuvant se caractérise par une très forte augmentation de la production d'anticorps, de la cytotoxicité lymphocytaire et macrophagique, antibactérienne et antitumorale, et de la sécrétion de médiateurs solubles.

Les liposomes peuvent être utilisés comme de très efficaces adjuvants de vaccins, tels par exemple les immunosomes antirabiques (Oth *et al.* 1987), ou ceux contre la toxine tétanique (Davis *et al.* 1986 et 1987), le choléra et la malaria (Alving *et al.* 1986), ou encore pour le traitement de certaines parasitoses telles que la leishmaniose (Alving C.R.1986). Les articles de revue sur le sujet sont extrêmement nombreux : Gregoriadis G.(1974), Alving C.R. (1989), Van Rooijen N.(1990), pour n'en citer que quelques-uns. Deux avantages primordiaux à cette utilisation:

- a) la quantité requise d'antigène de beaucoup diminuée
- b) l'instauration d'une forte mémoire immunologique vis-à-vis de l'antigène

Sur le plan fondamental, l'action potentiatrice des liposomes sur la réponse humorale a d'abord été étudiée, dès le début des années 80, avec des antigènes protéiniques divers, présentés soit encapsulés soit ancrés en surface (Shek *et al.* 1981 et 1982; Shek *et al.* 1983; Van Rooijen *et al.* 1980, 1981 et 1983; Snyder *et al.* 1984 et 1988; Vannier *et al.* 1988). Ces études étaient

faites sur un plan très pragmatique dans le but de voir quel meilleur parti l'on pouvait tirer d'eux quant à une utilisation essentiellement thérapeutique.

Depuis, une autre approche s'est considérablement développée et un nombre incalculable de recherches toutes récentes utilisent les liposomes comme outils en biologie cellulaire, pour analyser la réponse immune au niveau cellulaire ou caractériser des fonctions cellulaires précises :

- \* induction de changements conformationnels des molécules de classe II qui les rendraient plus aptes à lier des peptides immunogéniques (Roof *et al.* 1990).

- \* effet du couplage de l'IL-1 sur la surface des liposomes sur les cellules cibles (Bakouche *et al.* 1987).

- \* étude de l'interaction CPAg / cellule T, et pour ce faire, mimer la cellule présentatrice en incorporant aux liposomes un antigène, la molécule de classe II du CMH et de l'IL-1 $\alpha$  membranaire (Bakouche *et al.* 1990).

- \* étude de l'internalisation de l'antigène (Harding *et al.* 1991) et comparaison entre les macrophages et les cellules B (Dal Monte *et al.* 1989).

#### **1.4. Problématique de la recherche et méthodologie envisagée**

##### **1.4.1 Focalisation du problème**

Les deux pièces maîtresses du jeu de la problématique sont à présent posées, à savoir le squelette de la réponse immune et l'outil pour le disséquer, les antigènes liposomaux. Ce que nous voulons comprendre, ce sont les mécanismes cellulaires qui sous-tendent l'immunopotentialisation engendrée par les liposomes. De prime abord, d'après le schéma des voies d'activation de la réponse immune, on voit que l'on a, à différents niveaux, des points de repère qui se rejoignent quant aux conclusions éventuelles :

\* au niveau des anticorps sécrétés : les techniques pour les doser en sont simples et éprouvées depuis longtemps.

\* au niveau de la production des lymphokines par les sous-populations de T helpers : travail plus complexe mais avec les anticorps mono et polyclonaux, la tâche devient de jour en jour plus aisée.

Ces deux "produits" de la réponse sont en réalité les conséquences tangibles, si l'on peut dire, d'un évènement qui se passe plus en amont et qui est le phénomène de prise en charge de l'antigène par les CPAg. Ce mécanisme va être responsable de l'activation préférentielle de l'une ou l'autre sous-population, avec la cascade d'évènements que l'on connaît.

Cette prise en charge, on ne peut pas s'attendre à ce qu'elle soit exercée uniquement par les macrophages ou par les cellules B. Quand il y a intrusion antigénique, tous les moyens dont dispose l'organisme sont mobilisés à la seule fin d'élimination systématique. L'heure n'est pas au choix mais il peut y avoir, dans certains cas, canalisation d'une grosse partie des effectifs dans une voie privilégiée; et ce, que ce soit au moment de la prise en charge ou de l'activation des voies Th1/Th2. Ceci étant posé, même si nous comptons justement sur une telle orientation dirigée, nous éliminons une fois pour toutes toute espèce de manichéisme de notre discours...

#### **1.4.2 Le moyen d'entrer dans le jeu**

Une des façons de dissocier les divers mécanismes afin de pouvoir les étudier par comparaison, c'est de présenter l'antigène sous différentes formes. Nous avons comme point de départ toutes les études faites au début des années 80, dont on a parlé plus haut, qui analysaient les réponses

humorales suite à l'immunisation avec un antigène encapsulé ou un antigène ancré en surface.

Forts de tous ces essais, erreurs, recherches etc., nous avons concocté notre outil personnel d'investigation, pièce centrale de notre méthodologie. Il s'agit de provoquer une réponse immune avec un antigène protéinique associé ou non à des liposomes: donc, soit libre c'est-à-dire en solution aqueuse, soit encapsulé dans les liposomes ou ancré à leur surface par liaison covalente, après modification des lipides et de la protéine avec un agent hétérobifonctionnel. Dans un deuxième temps, les réponses humorales des différentes populations de souris immunisées sont comparées. De façon très schématique, nous avons imaginé, au plan cellulaire, un scénario global de stimulation, noyau d'une hypothèse de travail sur laquelle se greffent à mesure les idées dérivant des données expérimentales recueillies:

- \* Quand l'antigène est en solution ou exposé en surface, il peut y avoir interaction avec les récepteurs membranaires spécifiques de l'antigène, et, par là, activation selon une voie B-dépendante prédominante.

- \* Quand l'antigène est encapsulé, on a une impossibilité de contact avec les récepteurs, et l'activation subséquente serait donc macrophage-dépendante.

L'hypothèse de travail de départ se place donc au tout début de la réponse immunitaire, au niveau des cellules qui prennent en charge l'antigène dès son introduction dans l'organisme.



### 1.4.3 Les CPAg : une fonction, deux méthodes

Les deux principaux types de cellules présentatrices montrent une profonde dissimilitude au niveau de la réalisation d'une même fonction. Les macrophages sont de grosses cellules à faire "le ménage par le vide", par phagocytose en l'occurrence, alors que les lymphocytes B sont des cellules dont la fonction première est de produire les anticorps, et qui se retrouvent dans les organes les plus actifs immunologiquement, à savoir la rate et les ganglions. Mais ces lymphocytes ont aussi pour fonction de présenter des antigènes.

Selon Roosnek (1988) et Singer (1990), la conséquence d'un tel fait est que le travail du macrophage est beaucoup plus rapide que celui de la cellule B: 60 minutes contre 6 à 8 heures pour B, entre le moment de l'internalisation et la présentation des peptides immunogéniques aux lymphocytes T dans le contexte du CMH. On ne sait trop si c'est une question de surface cellulaire, mais les auteurs précisent que la densité des complexes CMH-Ag sur les macrophages après 1 heure est égale à celle à la surface des B au bout de 6-8 heures. Et à densité égale, on a stimulation égale des cellules T. La densité est donc un paramètre plus important que le nombre absolu.

En d'autres termes, le processing de l'antigène par les macrophages est un phénomène beaucoup plus rapide que celui par les cellules B. Pourtant, quand l'internalisation se fait via les récepteurs de surface spécifiques que sont les Ig de membrane des B, on arrive à une même stimulation des lymphocytes T avec une concentration d'antigène de l'ordre de 1000 fois moindre. Il y a donc rattrapage par l'efficacité.

#### 1.4.4 Application aux antigènes liposomaux

Si l'endocytose par entremise des récepteurs de surface des B est de beaucoup plus efficace que celle non spécifique par les macrophages, et si par ailleurs une présentation par un complexe Ag-liposome est beaucoup plus efficace par rapport à l'antigène présenté libre, on peut penser que le conjugué antigène liposomal est pris en charge via les récepteurs de membrane des B, en tout cas en ce qui concerne l'antigène présenté à la surface des liposomes.

En effet, ce qui importe c'est la densité des épitopes, c'est-à-dire la densité des déterminants antigéniques à la surface de la cellule présentatrice. Quand l'antigène est présenté ancré en surface, on a des dizaines de molécules qui peuvent réaliser le pontage des récepteurs Ig de membrane, et induire une activation des B de type thymo-indépendant. Il se peut également que l'antigène sous sa forme transformée réalise un réseau à la surface des B lors du contact avec la cellule T, et que ce contact en soit renforcé ou dure plus longtemps. L'activation, tout en demeurant T-dépendante, peut alors s'en trouver intensifiée (Vitetta *et al.* 1987).

Dans le cas de l'antigène encapsulé, beaucoup de molécules contenues dans un seul liposome sont délivrées d'un même coup dans un macrophage, donc il pourrait y avoir présentation de beaucoup de fragments immunogéniques à la fois (Dal Monte *et al.* 1989).

#### 1.4.5 Les diverses thèses en présence

Il est évident que beaucoup de chercheurs ont spéculé au sujet des circuits de stimulation et de leur activation préférentielle. Je ne dirais pas que

les avis sont partagés, mais plutôt que chacun met l'emphase sur tel ou tel évènement de la chaîne d'activation.

- La dichotomie Th1 / Th2, qui se traduit par l'action antagoniste de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-4 constitue le coeur du problème (Vitetta *et al.* 87; Mosmann *et al.* 89). L'activation préférentielle sera une résultante de la vitesse de distribution de l'antigène à l'un ou l'autre des clones, qui sera alors en mesure d'exercer en premier son action inhibitrice sur l'autre.

- La concentration de l'antigène est un paramètre à considérer (Abbas A. 1988): à basse concentration, les B spécifiques lient l'antigène, le présentent aux T qui sont stimulés et produisent les lymphokines qui induiront croissance et différenciation des B. À forte concentration, l'antigène peut également être présenté par des B n'ayant pas de récepteurs Igm ou même par d'autres cellules présentatrices. L'activation engendrée concernera alors tous les B, même ceux non présentateurs spécifiques.

- Pour la majorité des auteurs (Swain *et al.* 1988; Powers *et al.* 1988; Chang *et al.* 1990), le point important reste la sécrétion séquentielle des lymphokines : un T naïf, en contact pour la première fois avec l'antigène, sécrètera toujours IL-2 et IFN $\gamma$ , et lors de restimulations successives subséquentes, il sécrètera aussi de l'IL-4 .

- Une autre donnée de référence, défendue par nombre de chercheurs (Grun *et al.* 1989; Chang *et al.* 1990) sera l'indépendance ou la dépendance des clones de Th1 et de Th2 respectivement vis-à-vis de l'IL-1.

Les diverses données qui ont été énoncées constituent des "postulats" de base que je prendrai en compte lors de l'interprétation de mes résultats.

L'ensemble de la recherche devrait aussi nous permettre de répondre à quelques questions plus générales sur les mécanismes de la réponse immune :

=> Au moment où le macrophage ou la cellule B présente l'antigène, la dichotomie Th1 ou Th2 est-elle déjà réalisée ou la présentation se fait à une cellule T indéterminée qui se différenciera par la suite en Th1 ou Th2 ? Dans un cas comme dans l'autre, le choix se fait-il selon le mode d'association de l'antigène avec les liposomes ou selon la cellule présentatrice?

=> Peut-on obtenir, pour au moins l'un des schèmes d'antigène liposomal, une macrophage-indépendance ? Dans le cas positif, peut-on dissocier les deux fonctions du macrophage à savoir la fonction de présentation et celle de sécrétion d'IL-1 ?

=> Par quel "subterfuge" les préparations antigéniques liposomales déclenchent-elles un effet adjuvant ? Cet effet est-il relié à une macrophage-indépendance au profit d'une B-dépendance, doublée ou non d'une T-indépendance ? En d'autres termes, l'immunopotentialisation entre-t-elle en fonction dès la prise en charge de l'antigène ou se situe-t-elle au niveau de la collaboration T/B, c'est-à-dire plus loin dans la voie d'activation ?

Considérant tout ce qui a été dit ou admis jusqu'ici, dans les conditions d'expérimentation les plus diverses, nous avons le moyen d'aborder l'ensemble de cette problématique avec nos modèles antigéniques liposomaux, puisque nous avons le moyen d'entrer dans les circuits dès le tout début de la cascade immune, au moment de la capture de l'antigène, et ce, de façon différentielle. Reste à définir la méthodologie adéquate.

#### 1.4.6 La méthodologie choisie

Ma recherche a été faite sur les cellules spléniques de souris, à deux niveaux:

1) au niveau humoral, *in vivo*, pour détecter le taux d'anticorps produits en fonction du mode d'association de l'antigène (l'albumine bovine sérique) avec les liposomes, ainsi que les différents isotypes : IgM, IgG1, IgG2a, IgG3. Chacune des classes ou des isotypes d'Ig témoigne de la stimulation préférentielle d'une des deux sous-populations de T helpers. Les anticorps sont dosés par méthode ELISA ou par la numération des cellules formant des plages (méthode PFC, "plaque forming cells").

2) au niveau cellulaire, *in vitro*, pour analyser la prolifération cellulaire et la production des médiateurs solubles. Le paramètre prolifération est le témoin de l'activation d'une population cellulaire donnée. La sécrétion des lymphokines, IL-1, IL-4, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ , a été détectée par comparaison du taux de prolifération entre des cultures incubées ou non avec les anti-cytokines correspondantes. Si une voie a été privilégiée, il y a eu augmentation de la production de la ou des cytokines impliquées dans cette voie, avec leur effet propre de stimulation ou de suppression, selon le cas. Si on bloque cette production, l'analyse comparative de ces résultats avec ceux récoltés dans les tests sans anti-cytokines nous permet de repérer la voie Th1 ou Th2 activée préférentiellement. La prolifération est dosée par le taux d'incorporation de thymidine tritiée par les cellules.

Tous les tests sont faits en parallèle sur des populations de cellules spléniques soit totales, soit déprimées en macrophages. L'antigène utilisé *in vitro* est la conalbumine, de taille à peu près équivalente à l'albumine bovine, mais présentant l'avantage de ne pas entrer en compétition avec l'albumine du sérum de veau employé dans les milieux de culture.

## CHAPITRE II

### LES MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

#### 2.1 Préparation des complexes antigéniques liposomaux

##### 2.1.1 Les liposomes

###### 2.1.1.1 Composition

Tous les liposomes entrant dans l'élaboration des préparations antigéniques liposomales sont composés de dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC), dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine (DPPE), cholestérol, dans un rapport molaire 63:6:31. Dans les cas où une protéine doit être ancrée par la suite à la surface des liposomes préformés, le DPPE est d'abord modifié par réaction avec un réactif hétéro-bifonctionnel, le N-hydroxysuccinimydyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), pour donner le DPPE-DTP (DPPE-pyridyldithiopropionate) qui est alors incorporé au mélange de lipides (Leserman *et al.* 1984; Carlsson *et al.* 1978).

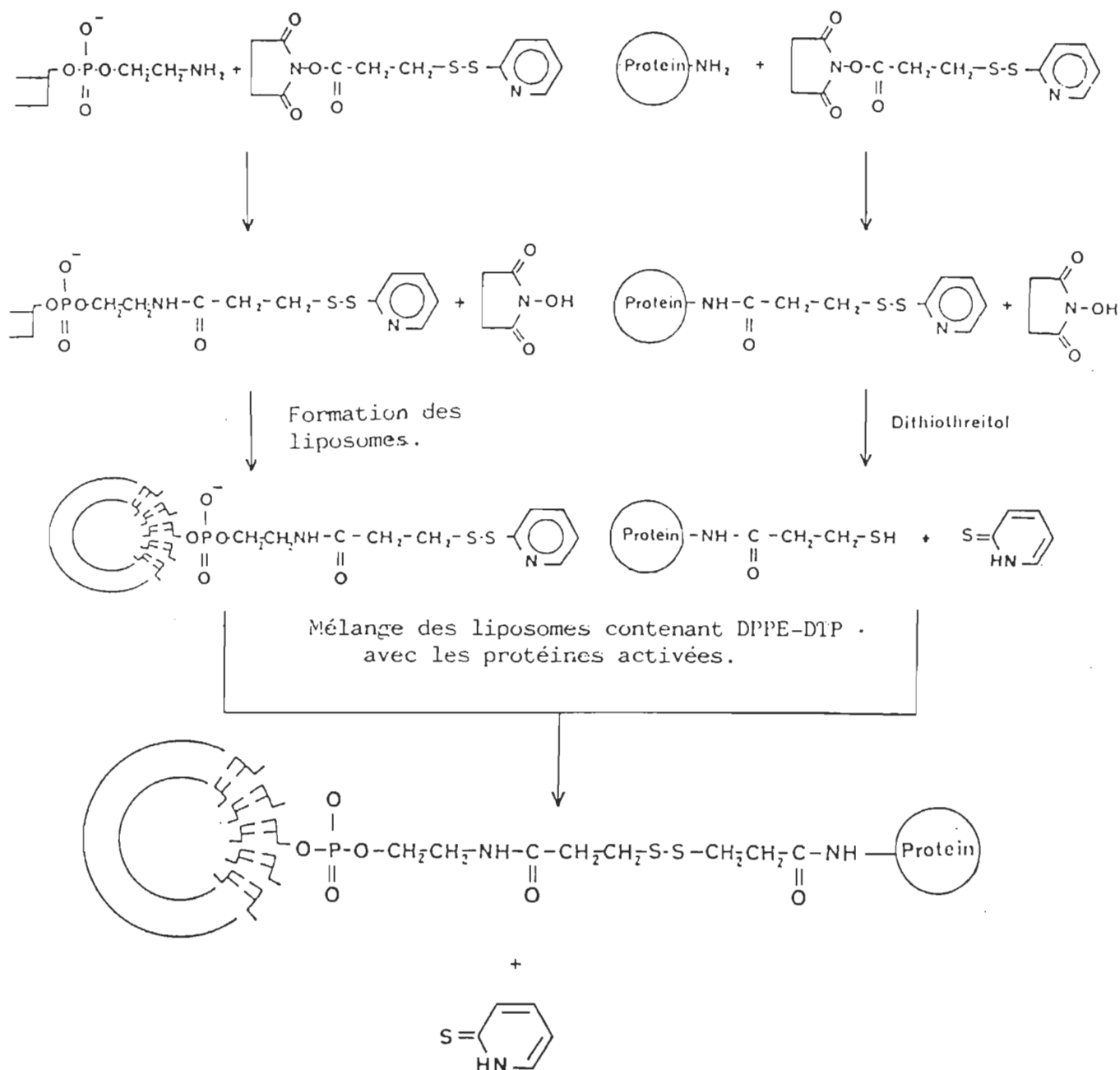
###### 2.1.1.2 Synthèse du DPPE-DTP (schéma 6)

Dans un tube en verre, on mélange : 10  $\mu$ moles de DPPE (6,9 mg) dissous dans 700  $\mu$ L de chloroforme / méthanol (rapport volumique 9:1), 12  $\mu$ moles de SPDP (3,75 mg) dissous dans 300 mL de méthanol rigoureusement anhydre et 20  $\mu$ moles de triéthylamine (3  $\mu$ L de la solution commerciale).

**Schéma 6: La réaction de couplage vésicules / protéine**  
(Barbet *et al.* 1982)

Modification du DPPE par le SPDP  
et incorporation dans les liposomes

Modification de la protéine par le  
SPDP et activation par réduction



**Protéine couplée de façon covalente aux liposomes**

- ❶ incubation 2 heures à T ambiante, sous agitation constante.
- ❷ ajout de 2 mL de tampon phosphate 0,1 M, NaCl 0,9%, pH 7,4 et mélange au vortex. La phase organique (inférieure) est récupérée après centrifugation à 700 x g, 10 minutes.
- ❸ 2 lavages avec 2 mL d'eau distillée et récupération analogue de la phase organique.
- ❹ ajout de méthanol goutte à goutte jusqu'à ce que la phase organique devienne limpide.
- ❺ rotoévaporation de ce mélange sous atmosphère d'azote.
- ❻ dissolution du film sec dans un volume de chloroforme / méthanol (9:1) tel que la concentration finale en 2-thiopyridine soit environ de 4 mM. Ce calcul se fait par la mesure de l'absorption à 343 nm de la 2-thiopyridine ( $\epsilon_M=8080$ ) libérée par le dithiothreitol (DTT): un aliquot de 60  $\mu$ L dans un volume total de 1,2 mL de méthanol contenant du DTT 50 mM est laissé 20 minutes à T ambiante puis la densité optique de l'échantillon est lue à 343 nm.
- ❼ stockage à -20°C jusqu'à utilisation.

#### 2.1.1.3 Protocole de préparation des liposomes

Dans un ballon de 50 mL à col rodé, on mélange : 10  $\mu$ mol de DMPC (6,78 mg), 0,9  $\mu$ mol de DPPE (0,62 mg) ou de DPPE-DTP et 5  $\mu$ mol de cholestérol (125  $\mu$ L d'une solution 0,04 M dans chloroforme / méthanol).

- ❶ solubilisation dans un volume total de 1 mL de chloroforme / méthanol (9:1)
- ❷ rotoévaporation pendant 40 minutes à 35°C, T supérieure à la T<sub>c</sub> du DMPC (= 23°).



- ③ le film sec de lipides est réhydraté dans 2 mL de tampon phosphate pH 7,4 contenant le détergent N-octyl- $\beta$ -glucopyranoside (OGP) 150 mM, de façon à obtenir un rapport molaire détergent : phospholipide égal à 10 / 1.
- ④ incubation 1 à 2 heures à T ambiante
- ⑤ 4 dialyses successives à 35°C (durée totale = 48 heures) envers 250 mL de tampon PBS pH 7,4 pour élimination totale du détergent.

Cette méthode de formation des liposomes, par élimination de détergent, (Millsman *et al.* 1978; Schwendener *et al.* 1981; Mimms *et al.* 1981; Zumbuehl *et al.* 1981) a été utilisée dans le cas de toutes les préparations destinées aux tests de dosage de la réponse anticorps, *in vivo*. Pour les tests de dosage de la réponse proliférative *in vitro*, la méthode employée est celle de l'ultrafiltration qui se détaille comme suit après les étapes 1 et 2 :

- ③' le film sec de lipides est réhydraté dans 1 mL de tampon HEPES 10 mM, NaCl 135 mM, pH 8,0.
- ④' incubation 1 à 2 heures à 35°C
- ⑤' homogénéisation de la suspension avec un homogénéisateur téflon (10 coups) suivie de l'extrusion par 10 passages à travers deux filtres accolés de polycarbonate (pores de 0,2 $\mu$ m ou 0,4 $\mu$ m de diamètre), sous pression d'azote, à 35°C (Appareil Nucléopore Corp., Pleasanton, CA).

### 2.1.2 Les protéines

La protéine utilisée pour les tests *in vivo* est l'albumine bovine sérique (BSA). Celle choisie pour les tests *in vitro* est la conalbumine (cAlb) qui

présente l'indéniable avantage de ne pas interférer avec l'albumine du sérum de veau employé dans les milieux de culture *in vitro*.

Quand l'une ou l'autre protéine doit être ancrée en surface, elle doit subir une modification au SPDP avant d'être mise en incubation avec les liposomes préformés modifiés également (schéma 5).

Modification de la protéine (Leserman *et al.* 1984) :

20 mg de BSA ou de conalbumine sont dissous dans 1 mL de tampon PBS ou HEPES respectivement, pH 7,4.

- ❶ 150  $\mu$ L ou 30  $\mu$ L d'une solution 40 mM de SPDP (3,15 mg dans 250  $\mu$ L de méthanol anhydre) y sont ajoutés de façon à obtenir un rapport molaire SPDP / protéine égal à 20 et à 5 respectivement pour la BSA et la conalbumine. Cette différence sera expliquée ultérieurement (section 2.4).
- ❷ on laisse la réaction se poursuivre pendant 30 minutes à T ambiante.
- ❸ le mélange est ensuite débarassé du SPDP n'ayant pas réagi et des groupements N-hydroxysuccinimide par passage sur colonne de Séphadex G-25 (0,9 x 13 cm). Cette colonne est équilibrée dans du tampon Tris-acétate, pH 4,5, dans le cas de la BSA, pour acidifier le milieu et ainsi prévenir le clivage des ponts disulfure intrinsèques de la protéine par le DTT, à l'étape subséquente de réduction. Par contre, pour la conalbumine, la colonne est équilibrée dans du tampon HEPES pH 7,4 pour empêcher la précipitation de cette protéine particulièrement sensible au contact acide; le pH de la

solution de protéine récupérée après passage sur la colonne est ajusté par la suite seulement à 5,5 avec le tampon Tris-acétate.

- ④ l'activation des protéines se réalise en les incubant 20 minutes avec du DTT (50 mM final). L'excès de DTT et la 2-thiopyridine sont éliminés par passage sur colonne de Séphadex G-25 (0,9 x 13 cm) équilibrée dans du tampon HEPES pH 8. La protéine sort juste après le volume mort.

#### Contrôle de la modification :

Un aliquot de 120  $\mu$ L de l'étape 3 est incubé avec 60  $\mu$ L d'une solution de DTT 1 M (50 mM final) dans un volume total de 1,2 mL. Après 20 minutes, la densité optique est lue à 343 nm et le taux de modification calculé d'après la quantité de 2-thiopyridine libérée ( $\epsilon_M = 8080$ ). On arrive en général à un rapport molaire SPDP / protéine de 13 ou 14 pour la BSA et de 3 ou 4 pour la conalbumine, donc autant de groupements pyridyldithio propionate substitués par molécule de protéine.

### **2.1.3 Les associations liposome / protéine**

#### **2.1.3.1 L'encapsulation**

Quand on veut encapsuler une protéine à l'intérieur des vésicules lipidiques, il suffit de réhydrater le film sec de lipide (à l'étape 3 ou 3' du protocole de préparation des liposomes) avec le tampon contenant la protéine en solution :

[10  $\mu$ mol DMPC + 10 mg protéine ] dans 1 mL de tampon

C'est-à-dire qu'à chaque 10  $\mu\text{mol}$  de DMPC on rajoute 10 mg de protéine. Il est bien entendu que le mélange contient aussi 0,9  $\mu\text{mol}$  de DPPE et 5  $\mu\text{mol}$  de cholestérol. Suivent les étapes de dialyses ou d'ultrafiltration, selon le cas. Il faut ensuite séparer la protéine restée libre du complexe liposome / protéine encapsulée. Cette séparation est faite soit sur gel de Sepharose Cl-4B, colonne de 0,9 x 56 cm, soit par ultracentrifugation à 165 000 x g, 2 fois 30 minutes, à 10°C (centrifugeuse LKB, rotor 70.1 Ti).

### 2.1.3.2 L'ancrage par liaison covalente

Pour réaliser le couplage covalent liposome / protéine, il faut mettre en incubation, 16 heures, à température ambiante, les liposomes et la protéine, tous deux modifiés. La réaction est effectuée à pH 8 parce que les rendements obtenus sont significativement meilleurs qu'à pH 7,4 (Barbet *et al.* 1982).

[10  $\mu\text{mol}$  de DMPC + 5 mg BSA modifiée] dans un volume total de 1 mL.

[10  $\mu\text{mol}$  de DMPC + 2,2 mg cAlb modifiée] dans un volume de 1,7 mL.

Les milieux d'incubation affichent une certaine disproportion dans les concentrations, dans le but de maintenir des rapports d'ancrage similaires pour les deux protéines, compte tenu de l'efficacité d'ancrage de la méthode employée pour la conalbumine. La séparation finale pour ôter la protéine non liée du complexe liposomal se fait, comme dans le cas de l'encapsulation, par chromatographie sur gel de Sepharose ou ultracentrifugation.

## 2.1.4 Les méthodes de dosage

### 2.1.4.1 Concentration en phospholipide des liposomes

La quantité de phospholipides contenue dans les vésicules conjuguées est dosée selon la méthode colorimétrique de Fiske et SubbaRow (1925), modifiée selon Bartlett (1959). Un aliquot de chacun des mélanges liposomaux est prélevé en toute fin de préparation, juste avant l'emploi pour les immunisations *in vivo* ou *in vitro* :

100  $\mu$ L échantillon + 900  $\mu$ L d'eau distillée

+ 100  $\mu$ L acide perchlorique

➤ 1 heure à 240°C

puis + 4 mL d'eau distillée

Dosage : 1 mL de la solution ci-dessus à doser

+ 113  $\mu$ L de réactif au molybdate

+ 63  $\mu$ L de réactif de Fiske et SubbaRow

➡ Lectures au spectrophotomètre, à 660 nm, après 30 minutes de latence; la valeur des échantillons est calculée d'après une courbe étalon de phosphate de potassium.

### 2.1.4.2 Concentration en protéine des préparations liposomales

On suit le cheminement de la protéine à travers toutes les étapes de la fabrication des antigènes liposomaux puis sa concentration finale en y ajoutant dès le départ une microquantité de protéine marquée à l'iode radioactif ( $^{125}\text{I}$ ). J'ai utilisé soit le marquage à la chloramine T dans le cas de la BSA, soit celui à l'IDDOGEN (1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycouril) dans le cas de la conalbumine.

a) Iodation à la chloramine T (Garvey *et al.* 1977)

Elle se fait à 0°C, sur lit de glace.

- ❶ ajouter goutte à goutte 500  $\mu\text{Ci}$  d' $^{125}\text{I}$  (dans 200  $\mu\text{L}$  de tampon PBS) à la solution de protéine (1 mg de BSA dans 500  $\mu\text{L}$ ), sous agitation constante.
- ❷ ajouter rapidement 0,2 mg de chloramine T fraîchement dissous dans 0,2 mL de tampon et laisser 5 minutes.
- ❸ stopper la réaction en ajoutant 0,2 mL d'une solution 0,1% de métabisulfite de sodium.
- ❹ appliquer le mélange sur une colonne de Sephadex G-25 (Pharmacia PD-10) saturée en BSA, puis faire passer 0,3 mL de iodure de potassium (3mg/mL), et enfin le tampon d'élution. La fraction de 1,2 mL contenant la protéine iodée sort juste après les 2,5 mL de volume mort de la colonne.

b) Iodation à l'IDOGEN (Markwell *et al.* 1978; Fraker *et al.* 1978; Salacinski *et al.* 1981).

Toutes les opérations peuvent se faire à 0°C ou à T ambiante.

- ❶ assécher sous azote 50  $\mu\text{L}$  (=10  $\mu\text{g}$  ou 23 nmol) d'une solution de 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycouril ou IDOGEN (1mg dans 5 mL de dichlorométhane) dans un tube de 75 mm en verre.
- ❷ ajouter 10  $\mu\text{L}$  de tampon HEPES pH 7,4.
- ❸ + 500  $\mu\text{Ci}$  d'  $^{125}\text{I}$

- ④ + 42  $\mu\text{L}$  d'une solution de conalbumine à 5 mg / mL (= 210  $\mu\text{g}$  ou 2,5 nmol) dans du tampon HEPES et laisser à T ambiante 10 minutes.
- ⑤ ajouter 500  $\mu\text{L}$  de tampon pour stopper la réaction et laisser 15 minutes.
- ⑥ faire passer le mélange sur une colonne de Sephadex G-25 (Pharmacia PD-10) saturée en conalbumine. La protéine iodée sort juste après les 2,5 mL de volume mort de la colonne.

#### 2.1.4.3 Détermination de la taille des liposomes

La taille des liposomes a été parallèlement déterminée par deux méthodes: la microscopie électronique avec coloration négative des échantillons (microscope Philips PW 6006/00) et la diffusion quasi-élastique de la lumière (spectrophotomètre modèle HN5-90, Nicomp Instruments) avec les mesures d'autocorrélation.

## 2.2 Immunisation des souris

Les souris utilisées sont des BALB/c mâles ou femelles âgées de 8 à 12 semaines. Les immunisations sont réalisées par voie intrapéritonéale.

⊗ Pour l'étude *in vivo*, les souris ont subi une première injection de 25  $\mu\text{g}$  de BSA, soit libre, soit en conjugaison avec les liposomes (encapsulation ou ancrage), dans un rapport moyen de 30  $\mu\text{g}$  par  $\mu\text{mole}$ , ou bien encore de liposomes seuls, 1  $\mu\text{mole}$  par injection. La deuxième injection a été faite 28 jours après, respectivement avec les mêmes préparations antigéniques et les mêmes quantités. Le prélèvement sanguin est fait par ponction cardiaque le 4<sup>ième</sup> jour suivant la 2<sup>ième</sup> immunisation, puis les

souris sont tuées par dislocation cervicale et leur rate prélevée pour en extraire les cellules, dans le cas des tests PFC.

☞ Pour les tests *in vivo*, les tests en parallèle avec les différentes préparations antigéniques ont été faits sur des groupes de 3 à 6 souris.

⊗ Pour l'étude *in vitro*, les souris ont subi une première injection avec 50  $\mu\text{g}$  de conalbumine libre, ou 20  $\mu\text{g}$  encapsulée, ou 4  $\mu\text{g}$  ancrée, ou 1  $\mu\text{mole}$  de liposomes seuls. [On remarquera que les quantités injectées sont très variables selon la préparation: ce sont les résultats obtenus dans la première phase de l'étude qui ont guidé notre choix. Il est à noter cependant que le rapport liposome / protéine reste le même, dans les mêmes limites de variation d'une préparation à l'autre]. Les souris immunisées sont sacrifiées 4 jours après par dislocation cervicale, leur rate est prélevée en milieu stérile et les cellules spléniques recueillies. La 2<sup>ème</sup> immunisation a lieu alors *in vitro* avec respectivement le même antigène, mais avec des quantités moindres, et également une fourchette de concentrations :

- 0,1 à 2,5  $\mu\text{g}$  de conalbumine libre
- 0,1 à 2,5  $\mu\text{g}$  de conalbumine encapsulée ou ancrée avec 2 à 50 nmol de lipides.
- 5 à 50 nanomoles de phospholipide (DMPC)

☞ Pour tous les tests *in vitro*, j'ai utilisé un pool de cellules spléniques provenant de 3 souris minimum pour gommer autant que possible les inévitables différences individuelles.



### ⊗ Calendrier des tests cinétiques :

Dans le cas de l'étude *in vivo* , il a d'abord fallu choisir le temps optimal pour faire la 2<sup>ème</sup> injection; on a donc travaillé en réponse primaire et fait varier le temps entre la première injection et la ponction cardiaque (entre 2 et 60 jours). Une fois la date de la seconde injection choisie, on a fait varier le temps entre la 2<sup>ème</sup> injection *in vivo* et la ponction cardiaque (entre 2 et 50 jours).

Dans le cas de l'étude *in vitro* , la première cinétique a porté sur l'écart de temps entre les deux immunisations, celle *in vivo* et celle *in vitro* (2 à 14 jours); la deuxième, sur le nombre de jours de mise en culture des cellules avec les divers antisérums (entre 1 et 5).

## **2.3 Méthodes d'évaluation de la réponse humorale**

La fonction de production d'anticorps par les cellules lymphoïdes peut être étudiée à l'aide de nombreuses méthodes. Pour la première partie de ma recherche, l'expérimentation *in vivo* , j'ai utilisé la technique des plages d'hémolyse ou méthode PFC (plaque-forming cells) et la méthode ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). La deuxième partie, plus axée sur les circuits cellulaires activés durant cette réponse, a nécessité la mise au point des milieux de culture *in vitro* pour les mesures classiques de lymphoprolifération.

### **2.3.1 Numération des cellules productrices d'anticorps**

Le principe de la méthode PFC repose sur la mise en évidence des cellules sécrétrices d'anticorps, et ce, en incubant une suspension de lymphocytes avec des globules rouges de mouton (GRM), adsorbés avec

l'antigène, en présence de complément de cobaye; les anticorps libérés entraînent la lyse des hématies dans le voisinage immédiat de la cellule sécrétant les anticorps, créant ainsi une plage claire visible au microscope optique. Les anticorps hémolytiques capables de provoquer une lyse dépendante du complément des hématies recouvertes du complexe antigène/anticorps sont des IgM : elles forment les plages directes. Si on veut révéler les cellules formant les IgG, il faut ajouter un sérum de chèvre anti-IgG de souris. On aura alors les plages indirectes aussi.

#### a) Préparation de la suspension des cellules de rate

La rate est prélevée sur les souris immunisées avec la BSA et tuées par dislocation cervicale, selon le calendrier exposé en 2.2. Les cellules spléniques en sont délicatement extraites avec un scalpel et mises en suspension homogène à l'aide d'une pipette Pasteur dans du RPMI 1640 (milieu de culture cellulaire). Après un lavage, suivi d'une centrifugation de 10 minutes, à 500 x g (centrifugeuse de table, vitesse 4), les hématies sont éliminées par choc hypotonique :

- culot de cellules spléniques + 2 mL d'eau distillée
- on laisse exactement 15 à 20 secondes pour ne lyser que les hématies
- on ajoute très rapidement 10 mL de RPMI pour rétablir la concentration en NaCl, et on centrifuge. Le culot de cellules est resuspendu dans un volume de RPMI adéquat pour obtenir la concentration désirée. Les lymphocytes viables sont comptés dans un hématocytomètre : 50  $\mu$ L suspension + 50  $\mu$ L solution de bleu de Trypan 0,4% dans NaCl 0,9%. Le

nombre de cellules par carré  $\times 16 \times 2 \times 10^4$  = le nombre de cellules par millilitre.

b) Technique des plages d'hémolyse :

(Jerne *et al.* 1974; Lefkovits *et al.* 1979; Cunningham *et al.* 1968; Cunningham, 1973)

Protocole revu et personnalisé : ajouter en ordre :

❶ 150  $\mu\text{L}$  GRM 10% ( $10^9$  cell./mL) couplés à la BSA par adsorption au chrome (c'est-à-dire: 200  $\mu\text{L}$  GRM 50% + 400  $\mu\text{L}$   $\text{CrCl}_3$  0,5 mM + 1mL BSA 1mg/mL => 45 minutes à 30°C, puis 2 lavages avec une solution saline, NaCl 0,9%).

❷ 37,5  $\mu\text{L}$  suspension de cellules spléniques à  $50 \times 10^6$  cellules / mL

❸ 37,5  $\mu\text{L}$  RPMI ou sérum de chèvre anti-IgG de souris, dilution 100

❹ garder à 42°C, 30 minutes

❺ 112,5  $\mu\text{L}$  complément de cobaye, dilution 1:4, adsorbé avec GRM

❻ 37,5  $\mu\text{L}$  agarose 0,5% dans RPMI maintenu à 42°C

➤ Souffler très vite, avec une pipette Pasteur, environ 100  $\mu\text{L}$  du mélange dans chacune des deux chambres de Cunningham\*, sceller avec de la paraffine chauffée et incuber 1h30 à 37°C, dans une atmosphère saturée en  $\text{H}_2\text{O}$  et à 5% en  $\text{CO}_2$ .

---

\* Trois bandes de papier adhésif double face, collant ensemble 2 lames de microscope, délimitent 2 espaces de 100  $\mu\text{L}$  environ. Ce sont les chambres de Cunningham qui contiennent donc, à elles deux, dans nos conditions,  $1 \times 10^6$  cellules spléniques.

➤ Le nombre de plages d'hémolyse est compté sous microscope optique après ce laps de temps. Les échantillons sans antisérum donnent le nombre de plages directes, c'est-à-dire le nombre de cellules sécrétant les IgM; ceux avec antisérum, les plages directes et indirectes, c'est-à-dire le nombre de cellules sécrétant les IgM et les IgG.

### 2.3.2 Détermination du taux sérique d'anticorps

Elle se réalise par une méthode plus spécifique et plus sensible que la précédente, le test ELISA, qui dose directement la quantité des immunoglobulines des différentes classes dans le sérum des animaux immunisés. Le principe en est également très simple : l'antigène est fixé sur une microplaque; le sérum à doser est ajouté et les anticorps spécifiques présents dans le sérum s'y lient. L'addition, dans un premier temps, d'anticorps anti-Ig couplés à une enzyme (la peroxydase du raifort), puis du substrat de cette enzyme en solution avec une substance chromogène, permettent de détecter les anticorps du sérum par une réaction colorimétrique.

#### a) Obtention du sérum

Le sang est prélevé par ponction cardiaque sur les souris immunisées. Les échantillons de sang sont laissés 1 à 2 heures à T ambiante pour permettre la formation du caillot, puis mis au froid (4°C) pour rétraction complète du caillot. Suit une centrifugation de 30 minutes à 2500 x g. Le sérum surnageant est prélevé et congelé tel quel à - 20°C jusqu'à utilisation.

b) Test ELISA : (Engvall 1980; Starch *et al.* 1984; Claassen *et al.* 1987)

Les étapes :

❶ Fixation de l'antigène par adsorption : 200  $\mu$ L d'une solution de BSA à 5  $\mu$ g / mL dans du tampon sodium-carbonate pH 9,6 (ou 200  $\mu$ L de tampon seul pour les puits contrôles) sont déposés dans chacun des 96 puits d'une microplaque.

❷ Après une nuit à 4°C, l'antigène non adsorbé est éliminé par 3 lavages avec du tampon phosphate Na 0,1M-NaCl pH 7,4 (PBSN).

❸ Blocage des sites restés libres avec une solution de caséine 3% dans PBSN, 30 minutes à T ambiante, puis lavages (3).

❹ Ajout des échantillons de sérums des souris immunisées (10  $\mu$ L de 12 dilutions avec PBSN-Tween 20, 0,05% = PBSNT) et incubation 1h à 37°C pendant laquelle se forment les complexes antigène / anticorps; puis 5 lavages au PBSNT.

❺ Attachement du conjugué anti-Ig-peroxydase : 10  $\mu$ L d'une dilution dans PBSNT et incubation 1h à 37°C. La dilution varie entre 1:1000 et 1:3000 selon le conjugué : ce sont les sérums de chèvre anti-IgTotal,-IgM,-IgG,-IgG1,-IgG2a ou -IgG3, marqués à la peroxydase. Suivent 5 lavages au PBSNT.

❻ Addition du substrat : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,015% et du chromogène ABTS (2,2'-Azino-di-(éthylbenzthiazoline-6-sulfonate) 0,04% dans tampon phosphate-citrate 0,1M, pH 4. Incubation 30 minutes à T ambiante au noir.

➤ Il y a activation de l'enzyme et libération du chromogène. Le taux sérique d'anticorps spécifiques est proportionnel à l'intensité de coloration

(lue à 414 nm au spectrophotomètre ou, mieux, évaluée à l'oeil...exercé), et est exprimée en  $\log_2$  de l'inverse de la dilution du sérum.

### 2.3.3 Dosage de la prolifération lymphocytaire

#### a) Préparation des cellules spléniques pour les cultures *in vitro*

- Les cellules spléniques sont recueillies, lavées, débarrassées des hématies, puis comptées tel qu'expliqué au point 2.3.1.a., à la seule différence que toutes les opérations sont exécutées dans la plus stricte aseptic.

- Les cellules sont suspendues dans un volume de RPMI complet (milieu de culture de cellules *in vitro* contenant aussi des antibiotiques), avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 2-mercaptoéthanol  $5 \times 10^{-5}$  M(2-ME), de façon à avoir  $3 \times 10^6$  cellules par millilitre.

- Dans le cas où les cultures doivent être déprimées en macrophages, on met en incubation, pendant 3h à 37°C, un certain volume de suspension cellulaire à  $2,5 \times 10^6$  cellules par millilitre: 10 mL par boîte de Pétri en verre de 45 mm de diamètre ou 40 mL par boîte de Pétri de 85 mm. On recueille les surnageants qui contiennent les cellules T et B mais non les macrophages qui ont adhéré au verre. Les Pétri sont rincés 3 fois en gardant chaque fois les surnageants de rinçage, puis le tout est centrifugé pour concentrer les cellules à  $3 \times 10^6$  cellules par millilitre.

☞ Il faut bien veiller à ne pas inclure de 2-ME dans les milieux de culture appauvris en macrophages puisqu'il peut agir en stimulant les quelques cellules adhérentes restantes.

☞ Les macrophages adhèrent mieux sur les surfaces en verre que sur celles en plastique. Si l'on n'a pas besoin de récupérer les cellules par la suite, il vaut donc mieux utiliser les Pétri en verre.

☞ Après élimination des cellules adhérentes, on retrouve environ les deux tiers du nombre total de cellules du départ.

### b) Test de lymphoprolifération

Les cellules spléniques sont mises en culture dans des plaques à 96 puits. L'ordre de remplissage des puits est très important :

❶ les cellules :  $3 \times 10^5$  cellules par puits (= 100  $\mu\text{L}$  de la suspension ci-dessus)

❷ les anticorps, s'il y a lieu: anti-IL1 (dilution 1:1000), anti-IL4 (1  $\mu\text{g}$  / puits), anti-IFN $\gamma$  (0,4  $\mu\text{g}$  / puits) ou anti-TNF $\alpha$  (dilution 1:40 finale), dans un volume de 50  $\mu\text{L}$ ; ou encore l'interleukine1 (5 unités par puits).

➤ 1 heure d'incubation

❸ l'antigène : conalbumine libre, ancrée ou encapsulée, ou liposomes seuls, dans un volume de 50  $\mu\text{L}$ ; ou bien du RPMI complet dans les puits témoins, ou encore de la concanavaline A (Con A) 0,125  $\mu\text{g}$  /puits, pour le contrôle de prolifération. Le volume de tous les puits est amené à 200  $\mu\text{L}$ .

➤ 3 jours d'incubation à 37°C sous atmosphère saturée en H<sub>2</sub>O et 5% CO<sub>2</sub>.

➤ Le troisième jour, on rajoute 50  $\mu\text{L}$  (=0,5  $\mu\text{Ci}$ ) d'une solution de 10  $\mu\text{Ci/mL}$  de thymidine tritiée et on incube 4h exactement à 37°C. Le rinçage subséquent se fait sur papier filtre GF/A. On laisse sécher une nuit,

puis la radioactivité est comptée sur compteur  $\beta$  dans 2,5 mL d'une solution de toluène additionnée de 0,4% PPO (2,5-diphenyloxazole) et 0,005% POPOP (1,4,-[2-(5-phenyloxazolyl)]benzène).

## **2.4 Errements, tâtonnements et ... choix**

La façon très sereine dont j'ai présenté les divers protocoles d'expérimentation ne rend pas justice aux moult expériences recommencées, aux essais 100 fois répétés à un détail près, dans le cas où, peut-être ?.. En fait, si on veut être honnête, chacune des étapes a nécessité son lot de tâtonnements, de tourments, d'angoisse,.. et c'est normal ! C'est si normal que je n'en parlerais pas du tout ... si ce n'était de l'intérêt que certains d'entre eux peuvent présenter. Voici donc, cités dans l'ordre des points de ce chapitre, quelques-unes de mes plus intéressantes embûches.

### **□ Modification des liposomes et des protéines :**

Lee Leserman inclut 1% de DPPE-DTP dans sa formule liposomale et modifie ses protéines dans un rapport molaire SPDP:protéine égal à 5:1 ou 10:1 pour obtenir un ancrage valable. Il a fallu, quant à nous, monter à 6% et 20:1 respectivement pour avoir une efficacité optimale avec la BSA. En effet, au départ, nous voulions obtenir un taux d'ancrage assez fort pour injecter le moins de lipides possible aux souris avec le plus de protéine ancrée, parce que d'après la littérature sur le sujet à cette époque, forte réponse rimait avec fort rapport protéine / lipide. Le problème qui a surgi alors était que l'albumine est à la limite de la précipitation : d'abord il faut ajouter la solution de SPDP très lentement et ensuite, à l'étape du passage sur la première colonne, il arrive que la BSA précipite un peu au contact du tampon acétate. Mais, dans ces conditions, nous sommes arrivés à obtenir des



résultats d'ancrage satisfaisants lors des tests *in vivo* , avec en moyenne un rapport de 30  $\mu\text{g}$  de BSA par  $\mu\text{mole}$  de DMPC.

□ Le problème a évolué quand il a fallu changer de protéine pour les tests *in vitro* , puisque l'albumine sérique interfère avec le sérum employé dans tous les milieux de culture *in vitro* . En effet, j'avais d'abord choisi l'ovalbumine, pour sa taille, pour son prix, etc...Or, primo, elle commençait à précipiter au rapport 10:1, ce qui n'était pas si grave en soi, mais secundo, et là c'était plus grave parce que cela n'a pas été du tout évident de suite, l'ovalbumine n'était pas capable de retenir l'iode radioactif après iodation à la chloramine T ! Qu'à cela ne tienne, d'autres méthodes existaient, dont l'iodation à l'IODOGEN. Mais après quelques essais infructueux, il a fallu se rendre à l'évidence : ce n'était pas la protéine idéale : elle refusait de se laisser ioder, quelle que soit la méthode employée.

□ J'ai alors reporté tous mes espoirs sur la conalbumine, pour sa taille, pour son prix, etc...Or, primo, elle commençait à précipiter au rapport 5:1 cette fois, et secundo, et là c'était très grave parce que désespérément évident de suite, elle précipitait aussi au moment de la mise sur colonne équilibrée au tampon acétate! Flottement..., et puis une idée, celle d'acidifier la solution de protéine en y ajoutant directement du tampon acétate (20% du volume), après l'avoir débarrassée des groupements N-hydroxysuccinimide, juste avant l'étape de réduction avec le DTT. La première fois que j'ai utilisé la protéine modifiée de cette façon-là, j'ai obtenu un rapport d'ancrage égal à 450  $\mu\text{g}$  par  $\mu\text{mole}$  de DMPC !

Deux points positifs sont ressortis de cette expérience :

➤ L'iodation à l'ODOGEN est somme toute une méthode préférable parce que relativement plus simple et plus rapide.

➤ L'acidification après la colonne est une recette qui permet d'obtenir des taux d'ancrage inespérés. Je n'en ai pas profité tout de suite parce qu'il fallait que je garde des conditions similaires, mais c'est un détail de procédure non négligeable à garder en mémoire.

□ Autre différence entre les expérimentations concernant la BSA ou la conalbumine : le tampon de solution. Le PBS utilisé pour toute la première phase des tests avec la BSA a été changé pour du tampon HEPES pour la seconde avec la conalbumine. En effet, avant le dosage des phosphates, il fallait toujours mettre en dialyse un petit aliquot de chacune des préparations de BSA pour en ôter le tampon phosphate, avec les risques de perte de précision que cela entraîne inévitablement, surtout sur des microquantités.

□ Le dernier lot d'embûches est arrivé avec les méthodes d'évaluation de la réponse humorale *in vitro* (2.3.3). Dans mon plan de travail, je voulais, entre autres, doser les immunoglobulines sécrétées *in vitro* par les cellules en culture, ce qui aurait fait le pendant exact de l'expérimentation *in vivo*. Or, les résultats des ÉLISA *in vitro* se sont avérés vraiment trop aléatoires et trop approximatifs sans lecteur de plaques. Des essais d'une autre méthode, l'ELISPOT (Segwick *et al.* 1986; Zigterman *et al.* 1988), pour laquelle j'ai eu une tendresse particulière, se sont également soldés par un échec. Et puis un jour, au hasard des lectures, on a remarqué l'emploi grandissant des anti-cytokines de toutes sortes, anti-cytokines non encore commercialisées mais fabriquées en Californie (DNAX) où justement

travaille M. John Abrams, un compagnon d'études graduées d'H.-M. Thérien. Lettres, téléphones, cadeau gracieux, et ma recherche a pris un certain virage, qui n'est sûrement pas à regretter, même s'il sera très intéressant dans le futur de revenir à l'ELISA, avec un lecteur de plaques informatisé, cette fois.

□ En de multiples autres points, on aura pu noter des changements de techniques pour les diverses préparations. Elles résultent d'une progression dans la démarche expérimentale directement reliée à l'évolution des techniques d'une part, et d'autre part, à nos besoins spécifiques. Dans tous les cas, des tests parallèles ont été faits et la concordance dans les résultats finaux a été chaque fois vérifiée.

Par exemple:

#### La méthode de préparation des liposomes :

Lors de la première partie des tests, ceux *in vivo*, les liposomes ont été préparés par la méthode d'élimination de détergent par dialyse, alors que pour tous les tests *in vitro*, ils ont été fabriqués par ultrafiltration, avec un extruder nouvellement acquis au laboratoire, une technique récente très rapide ayant l'avantage de donner des populations de liposomes très homogènes et de diamètre facilement contrôlable. Les liposomes obtenus par ultrafiltration, avec un diamètre de 240 ou de 170 nm, soit 2 à 3 fois moins qu'avec la première méthode, ont donné néanmoins des résultats similaires en ELISA. Dans les cultures, j'ai utilisé des liposomes de 170 nm de diamètre pour pouvoir les filtrer aisément.

### Méthode des PFC vs ELISA :

Depuis les 5 dernières années, le marché des anticorps anti-immunoglobulines a pris un essor considérable, pour toutes les classes et sous-classes d'Ig. Nous avons donc remplacé la méthode des PFC que nous utilisions au début, technique assez laborieuse et délicate, par celle de l'ELISA, alliant sensibilité et spécificité à une extrême simplicité.

### Colonne vs ultracentrifugation :

Après ancrage ou encapsulation, quand il faut séparer la protéine non associée des complexes liposomes / protéines formés, nous avons troqué la technique de séparation par chromatographie pour celle par ultracentrifugation, et ce pour obtenir des préparations à la concentration exacte voulue par les tests, la chromatographie occasionnant inévitablement une dilution en même temps qu'une perte non négligeable de matériel.

## **2.5 Réactifs et solutions**

### Produits :

❖ De SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO) :

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonate)

Albumine bovine sérique (BSA)

Chloramine T

Cholestérol

Conalbumine (cAlb)

DMPC : Dimyristoylphosphatidylcholine

DPPE : Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine

DTT : Dithiothreitol

HEPES : (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])

ODOGEN : 1,3,4,6-tétrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphénylglycouril

OGP : N-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside

PPO : (2,5-diphényloxazole)

POPOP : (1,4,-[2-(5-phényloxazolyl)]benzène)

Réactif de Fiske et SubbaRow

SPDP : N-hydroxysuccinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate

- ❖ De Charles River Canada, Inc. (St-Constant, Québec) : les souris BALB/c
- ❖ De DNAX (Palo Alto, Californie) : anti-IFN $\gamma$ , anti-TNF $\alpha$ , anti-IL4
- ❖ De Mandel Scientific (Lachine) : feuilles de filtre en fibre de verre GF/A
- ❖ De Genzyme : Interleukine 1 (IL-1 $\alpha$ ) recombinante.  
Anti-IL1 $\alpha$
- ❖ De Gibco : Milieu de culture RPMI 1640  
Sérum de veau foetal (SVF)
- ❖ De l'Institut Armand-Frappier (Laval, Québec) : globules rouges de mouton dans une solution d'Alsever : GRM
- ❖ De Dupont Canada Inc. : Iode radioactif :  $^{125}\text{I}$   
Thymidine (methyl-3H)
- ❖ De Pharmacia : Colonnes de Sephadex G-25 pré-montées (PD-10)  
Sephadex G-25  
Sepharose Cl-4B
- ❖ Des Laboratoires Cedarlane (Hornby, ontario) :  
  
GAM IgM : Goat anti-mouse IgM, Fc spécifique,(sérum de chèvre anti-IgM de souris). Et sur le même modèle : GAM IgG, GAM IgG1, GAM IgG2a, GAM IgG3, et GAM Ig Totales (M+G).
- ❖ Des laboratoires Bio-Rad (Mississauga, Ontario) : Tween-20

#### Solutions :

- ❖ Réactif au molybdate :  $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  0,02M dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  13,6%
- ❖ Tampon PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline):

Pour 1 litre: 8gr NaCl + 0,2gr KCl + 2,17gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 0,2gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- ❖ Tampon HEPES 10mM, 0,9% NaCl, pH 7,4 ou 8 :

Pour 1 litre: 9gr NaCl + 100mL HEPES 0,1M (pH déjà ajusté à 7,4 ou à 8).

- ❖ Tampon acétate 0,1 M, 0,9% NaCl, pH 4,5 :

9gr NaCl

+3,6mL acide acétique conc. (=17,4M) ou 305mL d'une solution 0,2M

+3,2gr acétate de sodium  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$  ou 195mL d'une solution 0,2M.

➡ ajuster le volume à 1 litre.

- ❖ PBSN = Phosphate buffer saline Na 0,1 M, pH 7,4:

19 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( 0,2 M)

+ 81 mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( 0,2 M)

+ 1,8 gr NaCl

➡ ajuster le volume à 200 mL.

- ❖ PBSNT = PBSN + 0,05% Tween 20

- ❖ Tampon sodium carbonate 0,1 M pH 9,6 :

16 mL de carbonate de sodium 0,2 M

+ 34 mL de bicarbonate de sodium 0,2 M

➡ ajuster le volume à 100 mL.

- ❖ Tampon phosphate-citrate 0,1M pH 4 :

30,7 mL d'acide citrique 0,1M (4,02gr / 250mL )

+ 19,3 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 M

➡ ajuster le volume à 100 mL.

- ❖ Milieu de culture " RPMI complet" :

On prépare la solution 2x de RPMI comme indiqué sur l'enveloppe, on filtre stérilement, et à 100 mL de cette préparation, on ajoute :

- 2 mL Streptomycine-Pénicilline (250 mg Strepto. + 150 mg Pénicilline dans 50 mL PBS = solution stock 100 x)

- 2 mL HEPES 1M
- 10 ou 20 mL de sérum de veau foetal (pour 5% ou 10% final)
- ➔ on ajuste le volume à 200 mL avec de l'eau distillée stérile.

(Les dilutions d'antisérum et les suspensions finales de préparations antigéniques sont faites avec ce RPMI)

## CHAPITRE III

### LES RÉSULTATS

Les expériences menées tant au niveau de la réponse anticorps *in vivo* qu'au niveau de la réponse proliférative *in vitro* constituent deux blocs distincts, distincts par les méthodes utilisées et par le type de résultats obtenus. Elles forment néanmoins un ensemble homogène par le fait qu'elles jouent un rôle de complémentarité dans l'analyse et la compréhension de l'ensemble de ces résultats. Au début de l'étude de chacun de ces blocs, je préciserai certaines conditions spécifiques d'expérimentation concernant les modèles antigéniques utilisés, puis je donnerai les résultats bruts dans l'ordre chronologique de la démarche.

#### **3.1 La réponse anticorps in vivo**

##### **3.1.1 Les modèles antigéniques spécifiques aux tests in vivo**

Pour tous ces tests, l'antigène utilisé est l'albumine bovine sérique (BSA ou A sur les figures). La quantité injectée aux souris est de 25  $\mu\text{g}$  à chaque immunisation associée à 0,5 à 0,8  $\mu\text{mol}$  de DMPC selon la préparation. Dans les expériences contrôles, les souris ont reçu une même quantité de BSA soit seule ("libre") soit donnée avec une même quantité de lipides mais sans association. Lors des tests de cinétique seulement, la quantité injectée a été de 75  $\mu\text{g}$  de protéine.

Les liposomes obtenus par la technique de dialyse de détergent ont été utilisés pour les tests PFC exclusivement. Ce sont des vésicules unilamellaires de  $477 \pm 108\text{nm}$  de diamètre, les chiffres par microscopie électronique étant



environ de 25% inférieurs à ceux par autocorrélation. Pour les tests ELISA, les liposomes fabriqués avec la technique de filtration par l'extruder (filtres de 0,4  $\mu\text{m}$ ) forment une population très homogène de vésicules de 240 nm de diamètre en moyenne. Comme il l'a déjà été mentionné plus haut, les résultats en ÉLISA demeurent similaires quelle que soit la méthode de fabrication.

### **3.1.2 Numération des PFC totales, à IgM et à IgG**

Ce premier test visait à déterminer s'il existait une différence quantitative significative entre les stimulations engendrées par l'antigène ancré ou encapsulé dans des conditions précises, les résultats publiés jusqu'alors étant contradictoires. La figure 1 montre le nombre de cellules sécrétant les anticorps spécifiques anti-BSA suite à une double immunisation des souris avec 4 préparations antigéniques différentes, à 3 semaines d'intervalle; les tests sont faits à jour fixe, au 4<sup>ième</sup> jour après la 2<sup>ième</sup> immunisation. On constate que par rapport à l'antigène donné libre ou avec des liposomes non associés, les antigènes liposomaux, quel que soit le type de conjugaison, induisent une très forte augmentation du nombre total de cellules sécrétrices d'anticorps, entre 20 et 30 fois plus. On en conclut donc que les liposomes stimulent la réponse humorale si, et seulement si, ils sont associés à l'antigène.

De plus, on remarque que si le niveau de stimulation est identique pour les deux préparations d'antigènes liposomaux, cette augmentation est répartie très différemment selon le mode d'association de l'antigène avec les liposomes. La figure 2 nous précise que la BSA encapsulée stimule exclusivement la production des IgG, alors que la BSA ancrée en surface

stimule de façon égale les IgM et les IgG, le rapport des cellules productrices devenant égal à 1 dans ce cas. Résultat très net, reproductible, malgré l'écart enregistré d'une souris à l'autre. On en conclut que le mode d'association influence non pas tant l'intensité de la réponse humorale que la qualité de cette réponse. Ces résultats ont été confirmés par méthode ÉLISA.

### **3.1.3 Mesure de la production des IgM et IgG sériques**

Le dosage ELISA fournit le taux des immunoglobulines retrouvées dans le sérum des animaux immunisés. Ces titres, exprimés en  $\log_2$  de l'inverse de la dilution sérique, montrent le profil de la production des Ig totales, des IgM et des IgG, en réponse secondaire, par des souris immunisées avec l'albumine livrée sous 3 formes, libre, encapsulée ou ancrée (Fig.3). Ce profil est en tous points semblable à celui des PFC : les antigènes liposomaux induisent, en termes de dilution, une hausse d'un facteur de 23 des Ig totales par rapport à l'antigène libre; cependant, l'albumine encapsulée induit 16 fois plus d'IgG que d'IgM, avec un rapport IgG/IgM égal à environ 2; et l'ancrée entraîne une augmentation des IgM aux dépens des IgG avec la conséquence qu'on se retrouve avec un rapport IgG/IgM d'environ 1.

➡ Les premiers résultats obtenus avec la numération des cellules productrices d'anticorps et confirmés par la mesure des taux sériques d'anticorps, indiquent que ce n'est pas tant l'intensité de production de chaque cellule productrice qui est affectée par les liposomes que le nombre de cellules activées. Ils confirment la potentiation induite par les liposomes mais sans égard avec le mode de liaison de ceux-ci avec l'antigène, les deux types d'antigène liposomaux s'avérant dans nos conditions expérimentales aussi efficaces l'un que l'autre. Cependant, le mode d'association influence la qualité de la réponse: alors que l'encapsulation induit une réponse tout à fait

conforme à celle d'un antigène T-dépendant, la prédominance des IgM dans la réponse à l'ancrée nous incite à croire à une composante T-indépendante.

Mais tout ceci est observé très tôt après la seconde immunisation, au jour 4. Qu'en est-il plus loin dans le cours de la réponse? Ces différences résultent-elles d'une différence dans la cinétique de production des diverses classes d'immunoglobulines, ou sont-elles le reflet d'une différence plus fondamentale entre les deux types d'antigène liposomaux ? Et dans l'un ou l'autre cas, tenons-nous la clé de l'explication des écarts ou des divergences par rapport aux résultats publiés jusqu'alors ?

➡ De l'intérêt double du point suivant : confirmer nos résultats et les relier à ceux trouvés dans la littérature. Les cinétiques en réponse primaire et secondaire devaient nous renseigner d'une part sur la mémoire immunologique et d'autre part sur l'importance du temps précis de la mesure en ce qui concerne les résultats obtenus.

### **3.1.4 Cinétique de la sécrétion des Ig sériques**

#### **3.1.4.1 Cinétique des Ig totales**

Les figures 4a et b montrent, en parallèle pour les 3 préparations antigéniques, la cinétique générale de l'immunopotentialisation en réponse primaire et secondaire. Quand l'albumine est associée aux liposomes, que ce soit par encapsulation ou par liaison covalente, la réponse humorale est plus intense que celle induite par l'antigène libre, et nettement plus rapide: maximum d'intensité au jour 8 vs jour 15. Cependant, la protéine ancrée se distingue des 2 autres préparations par le fait que la décroissance est beaucoup plus lente. Ceci est surtout visible en réponse primaire où la décroissance est quasi nulle jusqu'au 60<sup>ième</sup> jour après l'immunisation.

### 3.1.4.2 Cinétique des IgM et IgG

Au niveau des IgM et des IgG en réponse secondaire (Fig.5), l'ancrage stimule préférentiellement la sécrétion des IgM, tout au long des 40 jours où la réponse a été testée, comme cela avait été souligné avec les tests PFC et ÉLISA faits au jour 4. Le rapport IgG/IgM reste plus faible pour l'antigène ancré pendant toute la durée de cette réponse. De plus, la cinétique montre que le maximum de la réponse est atteint dès le 6<sup>ième</sup> jour pour les deux classes d'immunoglobulines, et ce, pour les deux types d'association. Il y a ensuite un plateau, puis une baisse sensible pour les IgG seulement.

➡ Ces résultats montrent clairement qu'en réponse primaire l'ancrage et l'encapsulation stimulent une sécrétion plus rapide que l'antigène libre et que la réponse à l'antigène encapsulé diminue plus rapidement que celle à l'ancré qui se maintient très haute au moins jusqu'au jour 60. Tout au long de cette réponse, les différences en rapport IgG/IgM se maintiennent également. Les deux antigènes liposomaux induisent une réponse secondaire plus intense qui témoigne de la mise en place d'une mémoire immunologique, mais dans le cas de l'ancré, la présence d'une mémoire immunologique marquée s'oppose à une activation exclusivement T-indépendante. Afin de pondérer la participation relative des voies d'activation T-dépendante et T-indépendante dans la réponse à l'ancrée, nous avons un moyen, qui était de mesurer la production des sous-classes d'IgG, reflet direct de cette participation; les IgG3 étant associés, comme les IgM, à la T-indépendance.

### 3.1.5 Mesure de la production et cinétique des isotypes d'IgG

La mesure de la production relative des sous-classes d'IgG devait nous permettre de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse d'une activation

préférentielle des voies de stimulation selon le mode d'association de l'antigène avec les liposomes. La figure 6 donne les résultats de la détermination des isotypes IgG1, IgG2a et IgG3, le 4<sup>ème</sup> jour suivant la seconde injection, sur des souris immunisées avec les 3 préparations d'albumine. On voit que la protéine ancrée stimule non seulement la production des IgM mais aussi celle des IgG2a et des IgG3. La sécrétion des IgG2a et des IgG3 est augmentée par un facteur de 16 et de 4 respectivement, en termes de dilution, par rapport à celle de la protéine libre. Quant à la production d'IgG1, elle est diminuée par rapport à celle de l'encapsulée (3 unités de log); en conséquence, le rapport IgG1/IgG2a pour l'ancrée est d'environ 1 alors que pour la protéine encapsulée, ce rapport était de 2. L'antigène libre se comporte comme l'encapsulé avec une production d'IgG1 de 2 fois plus grande que d'IgG2a et une faible sécrétion d'IgG3.

Le profil de cinétique de ces trois sous-classes (Fig.7) reflète la même tendance générale que la cinétique des IgM et IgG, à savoir un maximum de réponse dès le 6<sup>ème</sup> jour, suivi d'un long plateau et d'une lente décroissance surtout accusée pour l'antigène encapsulé. Tout au long de la réponse, les trois sous-classes se maintiennent dans les mêmes proportions relatives que celles obtenues au jour 4 et détaillées dans la figure 6.

➡ Ces résultats de cinétique montrant le maintien des différences entre les antigènes liposomaux tout au long de la réponse appuient l'hypothèse émise initialement quant à l'utilisation de voies d'activation particulières par les antigènes liposomaux en fonction de leur mode d'association avec le liposome. Une fois admise cette idée, il fallait aller plus loin dans la caractérisation de ces voies d'activation: se pourrait-il qu'elles soient reliées à une prise en charge par des cellules de présentation

différentes, par exemple, les macrophages pour l'encapsulée et les lymphocytes B pour l'ancrée ?

Sur la base de l'efficacité supérieure des cellules B dans la présentation des antigènes à faible concentration, nous avons abordé cette question *in vivo* en mesurant la réponse envers différentes doses d'antigène présenté à différents rapports protéine/lipide. La variation de ce rapport nous permettait d'aborder la question de l'importance, au niveau de l'activation, du nombre de cellules présentatrices en jeu pour une même quantité d'antigène donnée.

### **3.1.6 Influence du rapport protéine/lipide sur la réponse humorale**

Cette étude est faite en réponse secondaire sur des animaux immunisés avec des préparations liposomales d'antigène dans un large éventail de rapports protéine/lipide, entre 1 et 50  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$  pour la BSA encapsulée (Fig.8) et entre 1 et 150  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$  pour la BSA ancrée (Fig.9). Les doses injectées varient de 0,15  $\mu\text{g}$  de BSA à 150  $\mu\text{g}$  de BSA. Les tests ÉLISA sont faits sur les sérums de sang prélevé par ponction cardiaque le 11<sup>ème</sup> jour après la seconde immunisation, jour où, on l'a vu, la réponse anticorps est maximale. Les résultats font ressortir encore une fois des différences importantes entre les préparations. Les Ig testées sont les totales.

- Résultats avec la BSA libre (Fig.8):

La réponse à l'antigène libre est fonction directe de la dose injectée. À des doses inférieures à 0,15  $\mu\text{g}$ , la réponse est nulle, le système étant trop faiblement activé.

- Résultats avec la BSA encapsulée (Fig.8):

L'intensité de la réponse est reliée logarithmiquement à la dose injectée aux rapports 1,2 et 8,8  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ; cependant, à 53  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ , c'est-à-dire au plus fort rapport protéine/lipide, la réponse chute brutalement quand les doses injectées sont faibles, en dessous de 1,5 $\mu\text{g}$ . Ce fait suggère qu'un certain nombre de cellules présentatrices doivent être activées, et que ce nombre ne peut être atteint que lorsqu'une certaine quantité de liposomes est fournie au système. La quantité d'antigène endocyté est moins capitale dans le processus d'activation. Et donc une cellule présentatrice ayant endocyté même une faible quantité d'antigène est efficace dans sa fonction de présentation. Cependant le système, pour s'activer, a besoin d'un minimum de signaux qui ne peuvent être donnés que lorsqu'un certain nombre de CPAg sont activées.

- Résultats avec la BSA ancrée (Fig.9):

À tous les rapports, on a une relation logarithmique entre intensité et dose injectée. Ces résultats nous portent à conclure à une meilleure efficacité des cellules de présentation impliquées dans la réponse à l'antigène ancré relativement à celles utilisées par l'encapsulé, puisque on note une capacité d'induire une réponse même à faible dose et fort rapport protéine/lipide.

Il faut ajouter aussi que la mesure de la production relative des sous-classes d'IgG, (faite au laboratoire mais résultats non reproduits ici), met en relief le fait que les différences entre les préparations sont gommées aux fortes doses d'injection et forts rapports. À faibles doses et faibles rapports, les différences observées, en production d'IgG2a notamment, semblent impliquer une activation différentielle des voies de stimulation.

Ces résultats viennent renforcer l'idée d'une prise en charge de l'antigène par de CPAg différentes, selon qu'il est introduit dans l'organisme ancré en surface ou encapsulé dans les vésicules lipidiques. L'efficacité supérieure de l'antigène ancré appuie, sans toutefois la prouver, l'hypothèse d'une implication des lymphocytes B dans la prise en charge; les macrophages étant par défaut associés à l'antigène encapsulé.

➡ Les résultats de cinétique et de rapports protéine/lipide ont été d'une importance capitale. Pour l'interprétation des résultats d'abord: ils m'ont permis de faire la part des choses au sujet des variations entre les diverses expériences, par exemple pour déterminer si les inévitables différences de rapport protéine/lipide entre les préparations pouvaient ou non avoir un impact significatif sur les résultats. Et surtout, ils m'ont servi à établir les conditions d'expérimentation ultérieures: les quantités d'antigène à injecter, le moment où le faire et la différence tolérable dans les rapports protéine/lipide pour limiter les écarts dans les réponses induites par les préparations liposomales, mais où par contre les différences entre les deux formulations antigéniques pourraient être maximisées.

➡ Avant d'aller plus loin, résumons-nous :

L'albumine associée aux liposomes provoque une très forte réponse humorale, en réponse secondaire, qu'elle soit encapsulée ou liée de façon covalente. Cette réponse implique tous les isotypes d'immunoglobulines. Mais:

- ⊗ l'encapsulée induit un profil semblable à celui de l'antigène libre
  - avec: plus d'IgG que d'IgM
  - beaucoup d'IgG1, moins d'IgG2a et peu d'IgG3



- ⊗ l'ancrée induit une hausse de la sécrétion des IgM  
IgG2a  
IgG3  
et une baisse de la sécrétion des IgG1
- ⊗ l'ancrée induit une réponse dans des conditions de dose et de rapport protéine/lipide où l'encapsulée est inefficace.

L'ensemble de ces résultats *in vivo* appuient la double hypothèse d'une prise en charge différenciée et d'une activation préférentielle de l'antigène selon qu'il est encapsulé ou ancré à la surface liposomale. Pour analyser le problème en profondeur, il fallait l'aborder d'une façon plus systématique et mieux contrôlée. Nous avons opté pour une étude par système *in vitro*, étude basée sur l'analyse des voies d'activation par le biais d'anti-cytokines. En effet, bien qu'un tel système simplifie les jeux d'interactions potentiels, il possède, par sa rigueur même, l'avantage d'un meilleur contrôle des divers paramètres en jeu.

### **3.2 La réponse proliférative in vitro**

#### **3.2.1 Les modèles antigéniques spécifiques aux tests in vitro**

Pour tous les tests, l'antigène utilisé est la conalbumine (cAlb). Les préparations de vésicules conjuguées sont les mêmes pour la première immunisation *in vivo* et pour la restimulation *in vitro*. Les rapports protéine/lipide pour la conalbumine encapsulée et ancrée sont en moyenne de 38 et 62  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$  respectivement. Le point important était surtout qu'il n'y ait pas plus que 50 nanomoles de lipide par puits lors de la restimulation *in vitro*. En effet, au-dessus de 70 nmol/puits, les liposomes se révèlent toxiques

pour les cellules. Les quantités *in vitro* varient entre 5 à 50 nanomoles de DMPC, associées ou non à 0,1 à 2,5  $\mu\text{g}$  de protéine.

Les liposomes fabriqués utilisés ont été obtenus par technique de filtration sous pression d'azote avec des filtres de 0,2  $\mu\text{m}$ , et ils forment une population très homogène de vésicules unilamellaires de 170 nm de diamètre en moyenne. Ils sont donc plus petits que ceux utilisés *in vivo*. Ces changements s'imposaient compte tenu de la nécessité de stériliser les préparations liposomales avant leur utilisation dans les cultures. Or les liposomes obtenus sur filtres de 0,4  $\mu\text{m}$  étaient majoritairement retenus sur les filtres de stérilisation de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Résultats des cinétiques

L'expérimentation *in vitro* s'est exclusivement déroulée en réponse secondaire puisque des essais en réponse primaire, c'est-à-dire sur des souris vierges de toute immunisation, n'ont donné que des résultats trop faibles. Une double immunisation s'imposait donc pour amplifier la réponse, mais elle ne pouvait en aucun cas se faire *in vitro* parce que le temps total d'incubation aurait été trop long et surtout la double quantité de lipide dans les puits de culture aurait été létale pour les cellules.

Je me suis donc placée en réponse secondaire "mixte", c'est-à-dire une première immunisation par injection intrapéritonéale et la seconde sur les splénocytes des souris préimmunisées. Une redéfinition des conditions optimales en matière de cinétique a été nécessaire: j'ai fait varier le temps entre les deux immunisations de 2 à 14 jours. Au jour 2, la réponse proliférative accusait encore un bien piètre niveau; aux jours 11 et 14, ses valeurs perdaient leur reproductibilité; les meilleures réponses ont été

trouvées aux jours 4 ou 5, et même 7. J'ai choisi de faire tous les tests de lymphoprolifération avec 4 jours d'intervalle entre les deux immunisations.

Une 2<sup>ème</sup> cinétique a été réalisée, cette fois pour vérifier les données de la littérature sur le temps optimal entre la mise en culture et le jour du test d'incorporation de la thymidine tritiée. Dans ce cas, le nombre de jours après la stimulation a été augmenté progressivement de 1 à 5. Le maximum de prolifération était aux jours 2 et 3; aux jours 4 et 5, les résultats plus disparates ont fait supposer que d'autres paramètres entrent probablement en jeu, tels que la viabilité, la suppression etc. La thymidine a donc été rajoutée dans les milieux de culture le 3<sup>ème</sup> jour après la mise en incubation, temps en accord avec les écrits antécédents.

### **3.2.3 Mesure de la lymphoprolifération en fonction de la nature et de la concentration de l'antigène**

En ce qui concerne ces mesures, il s'agit de stimulations que j'appelle "croisées": les souris sont préimmunisées *in vivo* avec de la conalbumine libre (Fig.10) ou des liposomes seuls (Fig.11). Quatre jours après, les souris sont tuées et leurs splénocytes restimulés avec des concentrations croissantes de 4 préparations antigéniques différentes: cAlb libre, encapsulée ou ancrée, ou encore liposomes seuls. Les résultats représentés sur les 2 figures permettent certaines conclusions:

- il y a une relation entre la dose d'antigène et la prolifération jusqu'à 1  $\mu$ g d'antigène, puis un plafond est atteint
- les 2 types d'antigènes liposomaux induisent une très forte potentiation, que la préimmunisation soit faite avec la cAlb libre ou les liposomes

- au contraire de ce qui est observé *in vivo*, les liposomes seuls exercent un effet adjuvant "per se" sur la prolifération, dans les deux cas de préimmunisation
- une préimmunisation avec des liposomes seuls potentialise l'effet prolifératif de l'antigène libre.

### 3.2.4 Mesure de l'inhibition par l'anti-interleukine 1

#### a) Dans le cas des immunisations croisées (Fig.12 et 13)

Quand la préimmunisation est faite avec la cAlb libre (Fig.12), on observe:

- une inhibition frôlant le 100% pour la cAlb libre
- une inhibition moins drastique pour l'ancrée, de 60% environ
- une inhibition intermédiaire (75%) pour l'encapsulée et les liposomes

Quand la préimmunisation est faite avec les liposomes seuls (Fig.13), le profil d'inhibition reste similaire bien que l'inhibition soit moins forte d'un facteur d'environ 20% dans tous les cas.

#### b) Dans le cas des immunisations directes (Fig.14):

L'expérimentation devient vraiment intéressante, parce que plus rigoureuse, quand la restimulation est faite avec la même préparation que celle *in vivo*. La tendance observée jusqu'ici est renforcée: l'inhibition est la plus importante avec l'antigène libre (100%) ou encapsulé (80%); elle est moins forte avec les liposomes (70%) et encore bien moins avec l'ancré (20%).

Pour pouvoir regrouper plusieurs expériences, il nous faut traduire les résultats en indices de stimulation. En effet, en valeurs absolues, il y a

énormément de variations d'un test à l'autre, même si le profil global des réponses reste similaire. Le tableau A exprime en indices les résultats de 3 à 6 expériences.

➡ Au moins quatre conclusions intéressantes s'en détachent:

1. les vésicules conjuguées induisent toujours une stimulation plus grande que l'antigène libre ou les liposomes seuls
2. la stimulation par l'ancrée est environ de 50% supérieure à celle de l'encapsulée, elle-même dépassant de peu celle induite par les liposomes.
3. c'est l'antigène sous forme libre qui a le moins d'effet prolifératif
4. avec la préimmunisation/antigène libre, le profil prolifératif des 4 préparations antigéniques *in vitro* est fidèlement reproduit, semblable à celui des immunisations directes, laissant présumer le rôle déterminant de la seconde immunisation.

Dans des conditions de stimulation directe, le tableau B montre les pourcentages d'inhibition par l'IL-1 obtenus pour 3 à 6 expériences. On retrouve les conclusions auxquelles on avait abouti plus haut, mais avec des chiffres plus fiables parce que résultant de la moyenne de 3 à 6 expériences: une inhibition de 95 et 84% respectivement dans le cas de la conalbumine libre et encapsulée; une inhibition très partielle de 25% pour l'ancrée, et enfin une inhibition intermédiaire de 60% pour les liposomes seuls.

Afin de vérifier si cette différence dans l'inhibition, (25% pour l'ancrée par rapport à plus de 60% pour les autres préparations), reflétait bien des différences reliées à la formulation antigénique et non des paramètres aléatoires d'expérimentation, j'ai comparé les réponses des cultures stimulées avec les liposomes seuls ou l'antigène ancré, seul système

comparatif qui me permettait de limiter au maximum les différences aléatoires puisque l'ancrage se fait sur des liposomes préformés. J'ai donc travaillé sur des splénocytes de souris préimmunisées avec l'antigène ancré, mais les ai restimulés *in vitro* avec soit des liposomes seuls (ceux-là même ayant servi pour l'ancrage) soit l'antigène ancré: 2 tests en triplicata, même pool de souris, mêmes solutions, même préparation lipidique, mêmes conditions de culture, mêmes conjonctions astrales, etc.(Tableau C).

Les résultats sont confirmatifs:

➔ *L'action inhibitrice de l'anti-IL1 s'exerce de façon très réduite (dans l'ordre de 25-30%) quand les splénocytes sont stimulés avec l'antigène présenté lié en surface des liposomes.*

### **3.2.5 Action de l'interleukine 1**

Les expériences décrites dans cette section ont été faites en stimulation directe, c'est-à-dire avec le même antigène *in vivo* et *in vitro*. Dans ces conditions, l'action de l'interleukine 1 sur l'incorporation de la thymidine tritiée a été étudiée sur les cellules spléniques totales et, en parallèle, sur les splénocytes déficitaires en macrophages (Tableau D).

On constate que l'ajout d'IL-1 aux cellules totales augmente les indices de stimulation d'environ 40% pour les 3 types de préparations antigéniques. On voit aussi que, par cet ajout, on gomme les différences entre les cultures cellulaires qui toutes subissent la même hausse de stimulation, quel que soit l'antigène.

Dans le cas des cultures sans macrophages, l'ajout d'IL-1 provoque une augmentation encore plus grande du pourcentage de stimulation, d'environ 3 à 4 fois, quelle que soit la formulation antigénique utilisée pour la stimulation. Mais bien que cette hausse soit plus forte pour l'encapsulé, les

valeurs d'incorporation de thymidine étant très basses, il semble peu raisonnable d'accorder à cette différence trop d'intérêt.

### **3.2.6 Action de 3 anti-cytokines sur les cellules spléniques totales et sans macrophages**

◆ Les anti-cytokines ont d'abord été testées à différentes concentrations dans les limites moyennes fournies par la littérature, pour déterminer la dose optimale à employer (Tableau E). Les résultats sont donnés en indices de stimulation calculés toujours par rapport au même milieu de cellules avec antigène mais sans anti-cytokine, pour mettre en relief uniquement l'action de celle-ci. Les rapports [milieu + antisérum] / [milieu - antisérum] sont des rapports de  $\Delta$ cpm, c'est-à-dire qu'à chaque valeur de l'échantillon a été déduite la valeur du milieu sans antigène, mais avec ou non l'anti-cytokine selon le cas.

Ces premiers résultats sont très partiels; ils nous donnent une tendance générale de l'effet des antisérums dans le cas d'une immunisation *in vitro* au jour 4. Nous remarquerons seulement que le profil de prolifération avec la cAlb libre est très différent de celui obtenu avec les antigènes liposomaux: il y a une forte inhibition avec l'anti-IFN et pas d'effet des 2 autres antisérums. Pour l'antigène ancré, il y a au contraire action stimulatrice de l'anti-IFN, et plutôt inhibitrice des anti-IL-4 et anti-TNF. Dans le cas de l'encapsulé, les indices de stimulation sont tous plus grands que 1 dans les 3 cas, notamment une prolifération très forte avec l'anti-IFN.

Cependant, ce test étant fait essentiellement pour connaître notre jeu d'action dans les doses d'antisérum, concluons dans ce sens: comme la concentration a peu d'effet sur les résultats obtenus, j'ai choisi les doses les

plus faibles pour les anti-IL4 et IFN $\gamma$  et une dilution intermédiaire de 40 pour l'anti-TNF $\alpha$ .

◆ Dans toutes les expérimentations suivantes, ont été comparées les valeurs d'incorporation de la thymidine tritiée par des cultures cellulaires stimulées en parallèle avec les deux types d'antigènes liposomaux. Il s'agit de cultures de cellules spléniques, totales ou déficitaires en macrophages, en présence ou non des trois anti-cytokines. À noter tout de suite les valeurs extrêmement basses des milieux sans macrophages de même que les chiffres toujours plus faibles en ce qui concerne l'antigène encapsulé par rapport à l'ancré. L'incorporation de thymidine est donnée en  $\Delta$ cpm, c'est-à-dire qu'à chaque valeur de l'échantillon a été déduite la valeur du milieu sans antigène, mais avec ou non l'anti-cytokine selon le cas. Le terme "antigène seul" sur les figures se réfère aux cultures où il n'y a pas eu d'anti-cytokine ajoutée, mais stimulées avec une préparation liposomale donnée. On voit les valeurs d'incorporation de thymidine comparées pour les milieux sans antisérum (=ag seul) et les milieux avec antisérum; on a ainsi une visualisation rapide de l'effet de l'antisérum.

a) Effet de l'anti-IL4 (Fig.15 a et b):

Pour les cellules totales ou sans macrophages, le profil reste semblable: inhibition d'abord puis légère remontée le 8ième jour. L'effet est plus prononcé pour l'ancré mais s'observe aussi de façon significative pour l'encapsulé en l'absence de macrophages.

➡ *une inhibition puis une stimulation tardive par l'anti-IL4 est visible surtout dans le cas de l'ancré.*



b) Effet de l'anti-IFN $\gamma$  (Fig.16 a et b):

L'anti-IFN $\gamma$  stimule la prolifération des cellules spléniques en présence de l'antigène ancré et de l'antigène encapsulé. La stimulation observée pour l'ancré est plus importante au jour 2 et diminue progressivement au jour 4 puis 8. La stimulation observée pour l'encapsulé est à peu près la même que la mesure soit faite au jour 4 ou au jour 8. Cependant en valeur relative, cette activation est plus conséquente pour l'encapsulé que pour l'ancré, par rapport aux milieux témoins sans antisérum. Par contre, l'anti-IFN n'a aucun effet significatif une fois les macrophages éliminés.

➤ *une stimulation rapide et forte par l'anti-IFN dans le cas de l'antigène ancré et de l'encapsulé (milieux cellulaires complets seulement).*

c) Effet de l'anti-TNF $\alpha$  (Fig.17 a et b):

Les résultats sont beaucoup moins nets ici. En milieux cellulaires complets, rien de significatif pour l'ancré et une augmentation très légère pour l'encapsulé. Dans les milieux sans macrophages, on observe une augmentation de la prolifération au jour 8, dans le cas des 2 préparations antigéniques, bien que plus évidente pour l'encapsulé.

➤ *aucun effet significatif dans le cas de l'ancré, et une stimulation tardive dans le cas de l'encapsulé.*

◆ Des tests plus systématiques ont été réalisés à 2 journées différentes d'immunisation *in vitro* (jours 4 et 8), soit sur les cellules spléniques totales, soit sur les cellules sans macrophages et les résultats sont donnés en indices de stimulation:

### Conclusions pour les cellules totales (Tableau F):

Les indices de stimulation sont, au jour 4, tous plus hauts pour l'encapsulé que pour l'ancré. Cette conclusion est surtout marquée pour l'anti-IFN qui donne pour l'encapsulé un indice supérieur à 3 par rapport à moins que 2 pour l'ancré. Cependant, au jour 8, la situation s'inverse totalement : les valeurs sont stationnaires ou à la baisse pour l'encapsulé, et plutôt à la hausse pour l'ancré, et ce, pour les 3 antisérums. Ce qui semble montrer que la stimulation au jour 4 avait atteint son maximum dans le cas de l'antigène encapsulé, alors qu'elle continue pour l'ancré jusqu'au jour 8.

➔ *l'activation engendrée par les antisérums et surtout par l'anti-IFN est plus rapide pour l'encapsulé, mais plus fugace : elle augmente plus tranquillement mais dure plus longtemps pour l'ancré.*

### Conclusions pour les cellules sans macrophages (Tableau G):

Une inhibition générale par les 3 antisérums le 4<sup>ième</sup> jour cède le pas à une stimulation généralisée le 8<sup>ième</sup> jour, dans le cas des 2 préparations antigéniques, avec des indices de 30% en moyenne plus hauts pour l'ancrée.

#### **3.2.7 Effet de l'anti-IL1 sur les splénocytes sans macrophages**

La figure 18 montre que, contre toute attente, l'anti-IL1 a provoqué une très forte augmentation de l'incorporation de la thymidine par les cellules spléniques dépourvues de macrophages. Cette hausse est cependant plus rapide dans le cas de l'antigène ancré; elle ne se manifeste qu'au jour 8 pour l'encapsulé.

### 3.3 Résumé des résultats

Avant de clore ce chapitre, un résumé s'impose, résumé brut et schématisé des résultats obtenus les plus reproductibles, les plus fiables, en un mot ceux qui méritent qu'on échafaude une thèse sur eux ! Les antisérums anti-IL4 et anti-TNF n'ont pas fourni les renseignements que l'on escomptait, et il y a à cela plusieurs raisons : tout d'abord, quand j'ai commencé ma recherche, il y avait beaucoup d'inconnues sur eux, et maintenant qu'on en connaît plus, je vois qu'ils ne constituaient pas les outils idéaux pour ce type de recherche : à cause de leurs effets pléiotropiques notamment. Mais pour l'étude de la sécrétion des IgE *in vitro* par exemple, l'anti-IL4 serait parfait. D'autres résultats ne sont pris en considération que d'une façon relative, pour montrer une tendance. Par exemple, toutes les cultures sans macrophages ne donnaient qu'un signal de prolifération assez bas : difficile de prendre les valeurs absolues dans ce cas. En réalité, et j'ai tenu à donner ces résultats à l'appui de mes dires, l'absence de macrophages s'est révélée catastrophique pour les cultures *in vitro*. Les macrophages sont essentiels dans tous les cas et l'ajout d'IL-1 ne remplace leur absence pour aucune des formulations antigéniques. Il semble que le macrophage lui-même ou un autre facteur encore indéterminé soit essentiel à l'activité proliférative induite par nos antigènes. Dans ces conditions, ces résultats ne seront pas pris en ligne de compte dans la discussion et l'élaboration de la thèse finale. Voyons tout de même ce qui nous reste, c'est loin d'être désespérant !

Résultats de l'expérimentation in vivo
--

▲ Les liposomes seuls n'ont aucun effet adjuvant sur la réponse anticorps

▲ L'antigène associé aux liposomes par encapsulation ou liaison covalente induit une hausse de la quantité d'Ig spécifiques, très rapide et très importante, par rapport à l'antigène libre; toutefois cet écart se réduit après le 10<sup>ième</sup> jour.

▲ L'encapsulé induit un profil semblable à celui de l'antigène libre  
avec: plus d'IgG que d'IgM  
beaucoup d'IgG1, moins d'IgG2a et peu d'IgG3

▲ L'ancré induit une hausse de la sécrétion des IgM  
IgG2a  
IgG3  
et une baisse de la sécrétion des IgG1

▲ L'ancrage est caractérisé par une réponse humorale plus rapide qui se maintient plus longtemps que dans le cas de l'encapsulation.

▲ L'ancrage est plus efficace dans l'induction d'une réponse humorale puisque celle-ci intervient dans des conditions de dose et de rapport protéine/lipide où l'encapsulation est inopérante.

Résultats de l'expérimentation in vitro
---

▲ Les liposomes seuls ont un effet adjuvant significatif sur la prolifération.

▲ Les 2 types d'antigènes liposomaux induisent une très forte potentiation de la prolifération des splénocytes *in vitro* par rapport à l'antigène libre.

▲ La nature de la première immunisation *in vivo* a une certaine importance sur la qualité de la réponse *in vitro*, mais c'est la restimulation *in vitro* qui est déterminante.

▲ La hausse de stimulation induite par l'ancrage est environ de 50% supérieure à celle induite par l'encapsulation.

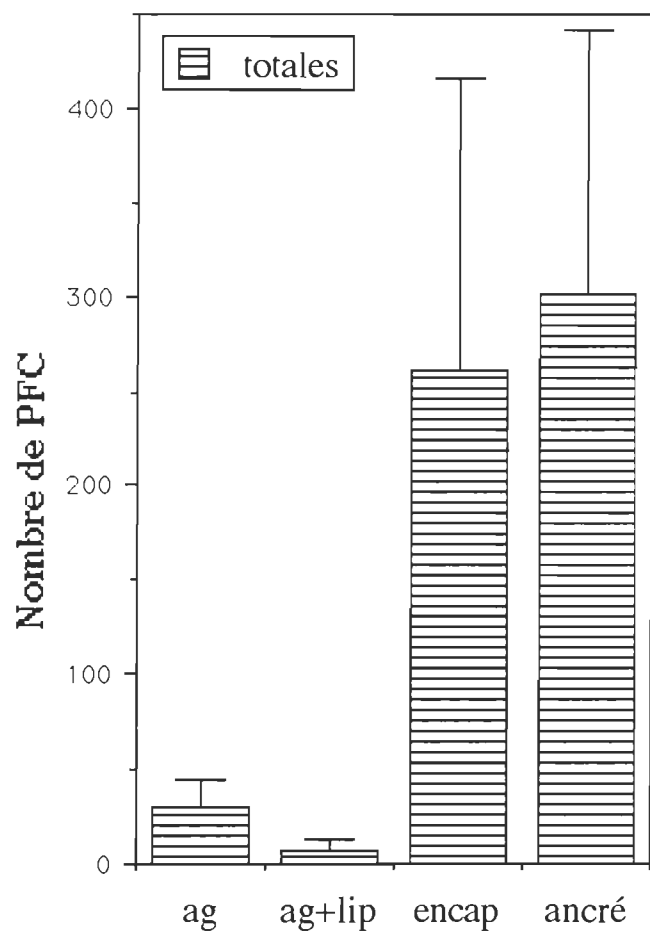
▲ L'action inhibitrice de l'anti-IL1 s'exerce de façon quasi maximale sur les cultures stimulées avec l'antigène libre ou encapsulé (~95%), est faible avec l'antigène ancré (~25%) et intermédiaire avec les liposomes seuls (~60%).

▲ De façon générale, l'action des 3 anti-cytokines est plus rapide dans le cas de l'encapsulation même si son intensité n'est pas toujours aussi prononcée que dans le cas de l'ancrage, dont l'effet s'amplifie avec le temps.

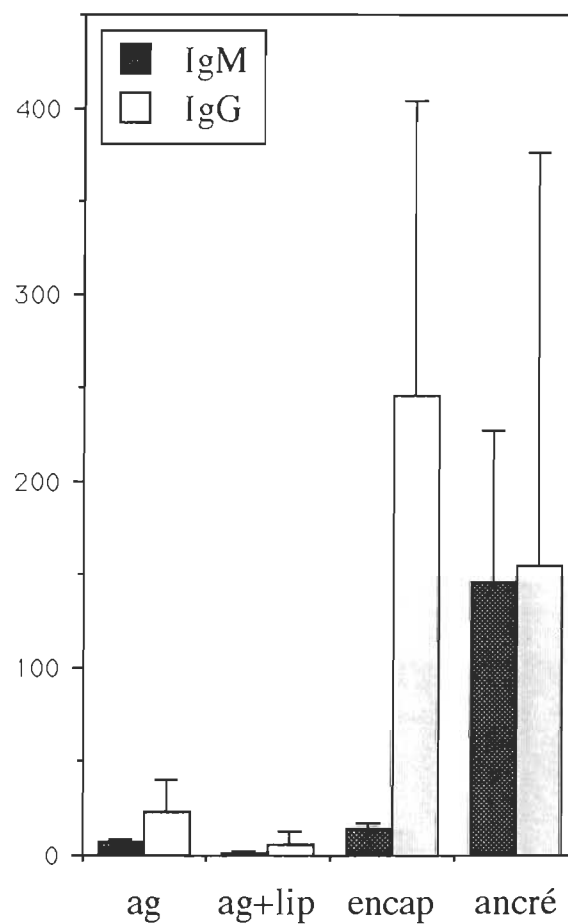
▲ La stimulation engendrée par l'anti-IFN $\gamma$  est relativement plus forte pour l'antigène encapsulé que pour l'ancré.

▲ Dans les cultures sans macrophages, l'ajout d'IL-1 provoque une très forte augmentation du pourcentage de stimulation, quel que soit le type d'antigène.

▲ L'anti-IL1 provoque une prolifération rapide et élevée chez les populations sans macrophages stimulées avec l'antigène ancré. Elle est plus lente dans le cas de l'encapsulé.



**Fig.1 : nombre de PFC totales**



**Fig.2 : PFC à IgM et IgG**

Le nombre de PFC spécifiques de l'albumine bovine sérique a été obtenu par la technique des plages d'hémolyse à partir des cellules spléniques de souris immunisées in vivo 2 fois, à 3 semaines d'intervalle, avec 4 préparations antigéniques différentes. Les souris ont été sacrifiées le 4<sup>ième</sup> jour après la seconde injection. Les résultats représentent la moyenne des réponses de 6 animaux  $\pm$  l'écart-type de la moyenne.

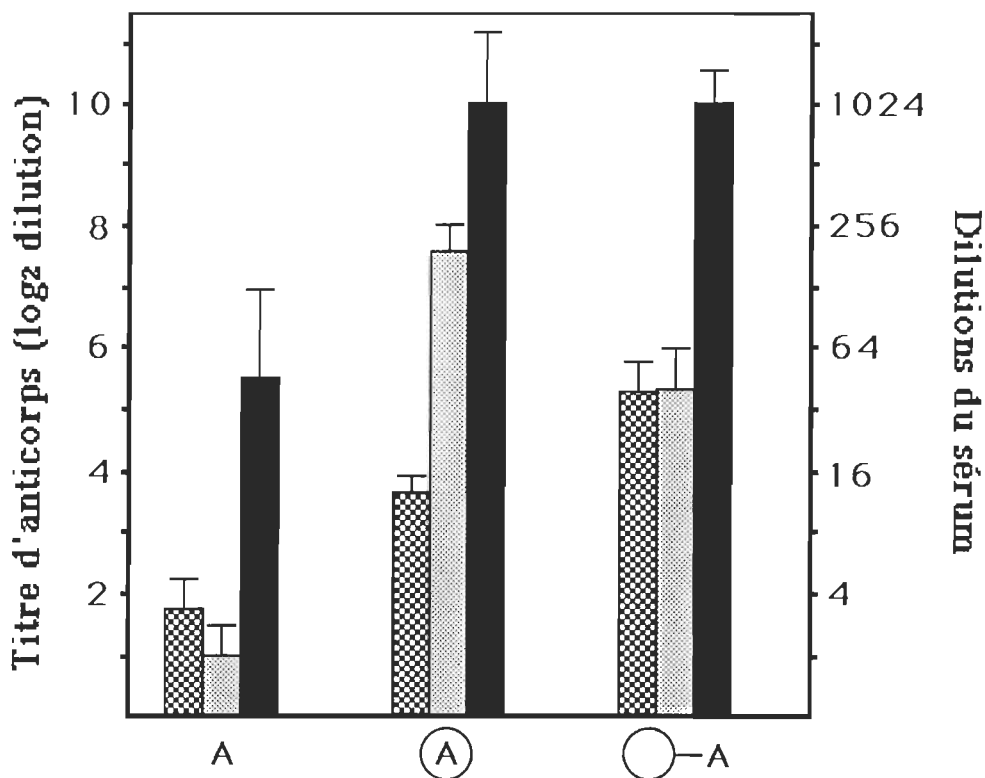
(ag) 25  $\mu$ g BSA libre

(ag+lip) 25  $\mu$ g BSA libre et 1  $\mu$ mol de lipide (DMPC)

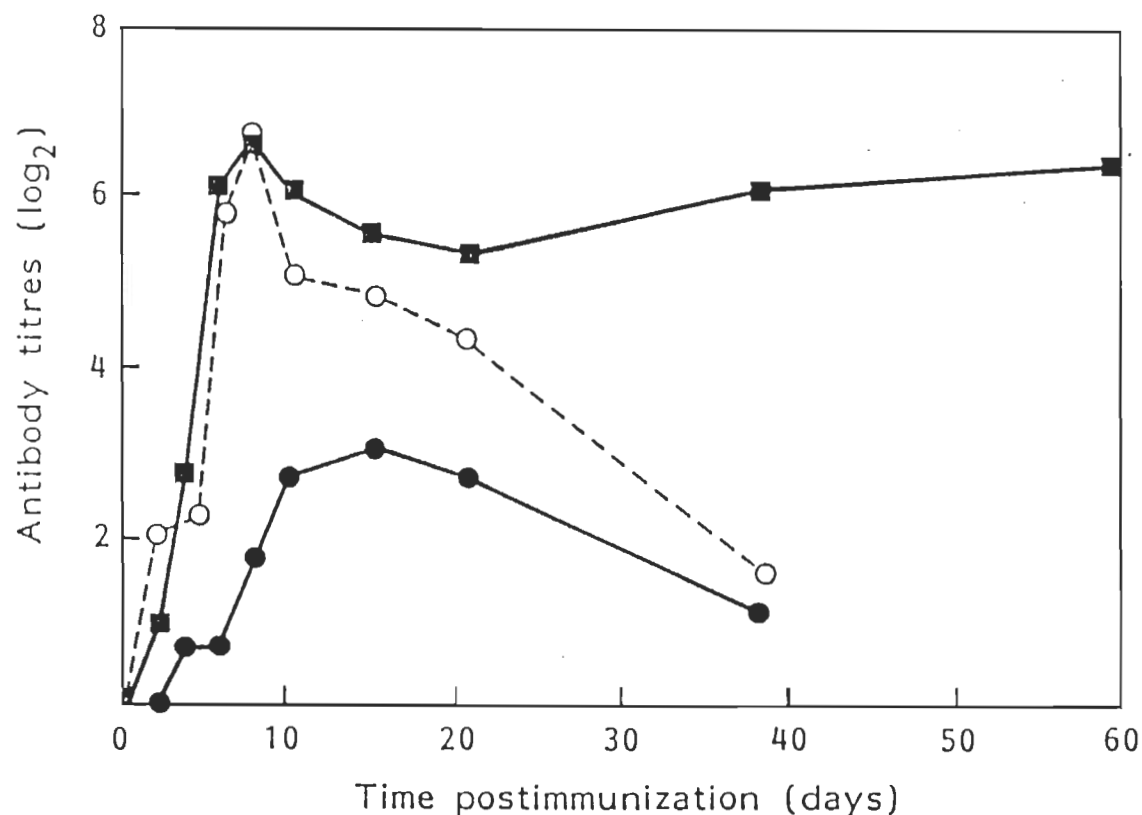
(encap) 25  $\mu$ g BSA encapsulée avec 0,5 à 0,8  $\mu$ mol de DMPC

(ancré) 25  $\mu$ g BSA ancrée avec 0,5 à 0,8  $\mu$ mol de DMPC

(Shahum & Thérien, 1988)



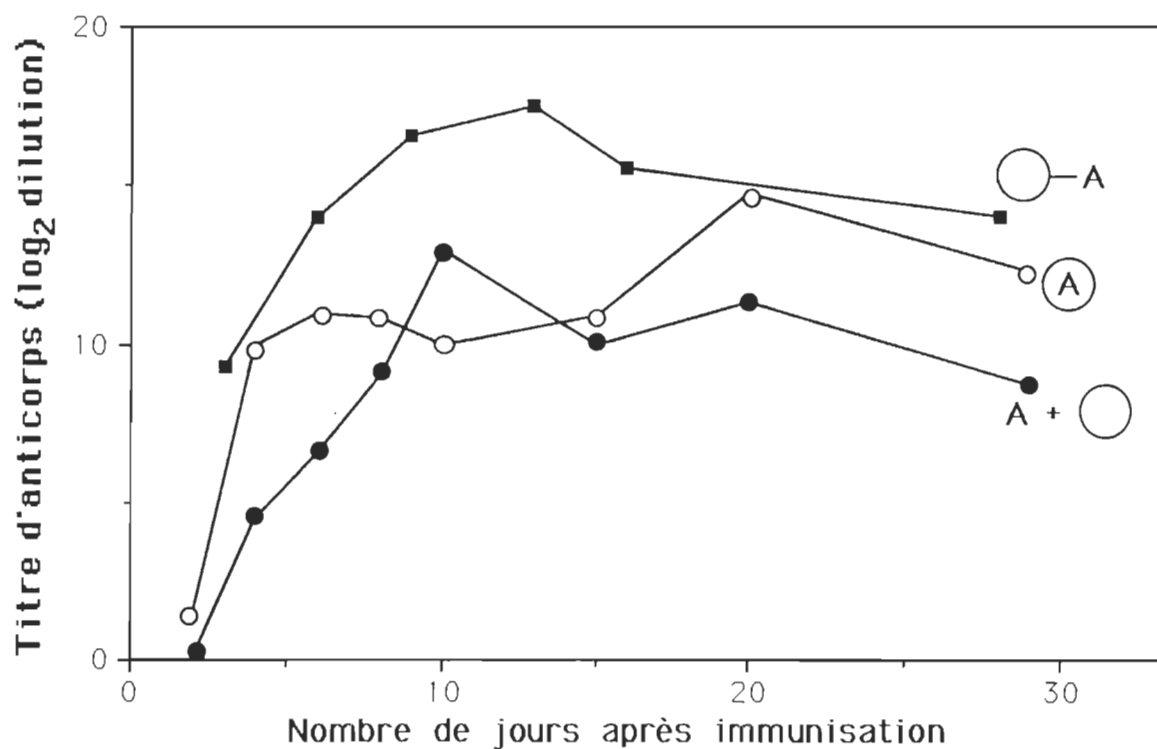
**Fig.3 : Production des Igs totales, IgM et IgG.** Le test ELISA est réalisé sur le sérum du sang de souris immunisées 2 fois, à 28 jours d'intervalle (réponse secondaire), avec trois préparations antigéniques : **A**=antigène sous forme libre; **Ⓐ**= antigène encapsulé; **○-A** = antigène ancré en surface. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque le 4<sup>ième</sup> jour après la seconde immunisation. Chaque préparation d'antigène contenait 25 µg de BSA et selon le cas 0,5 à 0,8 µmol de DMPC. Le titre en anticorps est exprimé en log2 de l'inverse de la dilution la plus grande du sérum donnant une réponse positive par rapport à un puits témoin n'ayant pas été adsorbé avec l'antigène. ■ Ig totales; ▨ IgG; ▩ IgM. (Shahum & Thérien, 1989)



**Fig.4a : Cinétique de l'immunopotential en réponse primaire.**

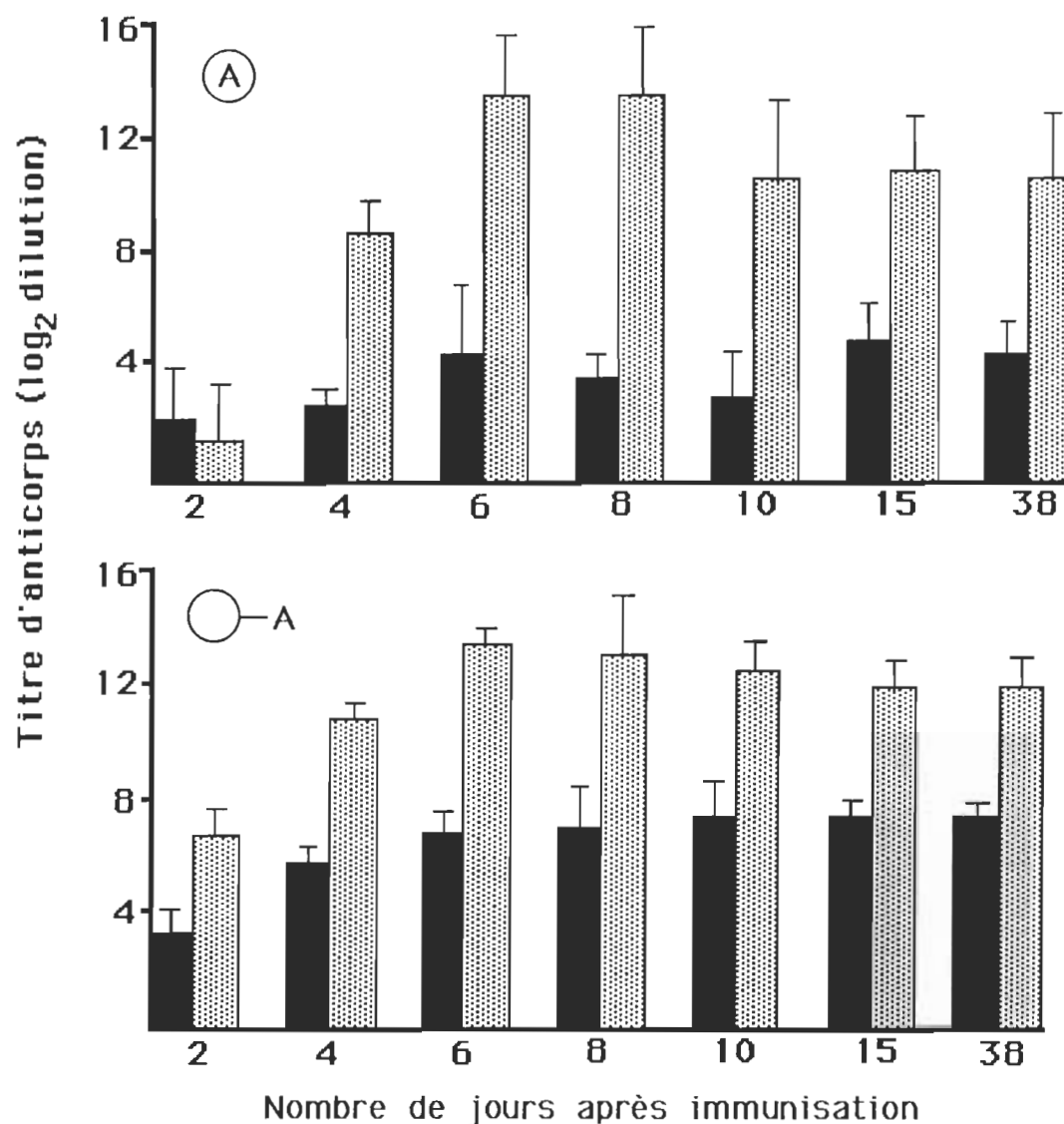
Les souris sont immunisées avec la BSA libre + liposomes (●), la BSA encapsulée (○), ou la BSA ancrée(■), puis la production totale d'immunoglobulines est dosée dans le sérum du sang prélevé par ponction cardiaque entre le 2<sup>ième</sup> et le 38<sup>ième</sup> jour après l'immunisation, et jusqu'au 60<sup>ième</sup> jour, dans le cas de l'antigène ancré (moyenne de 3 à 6 animaux). (Thérien, Lair & Shahum, 1990)





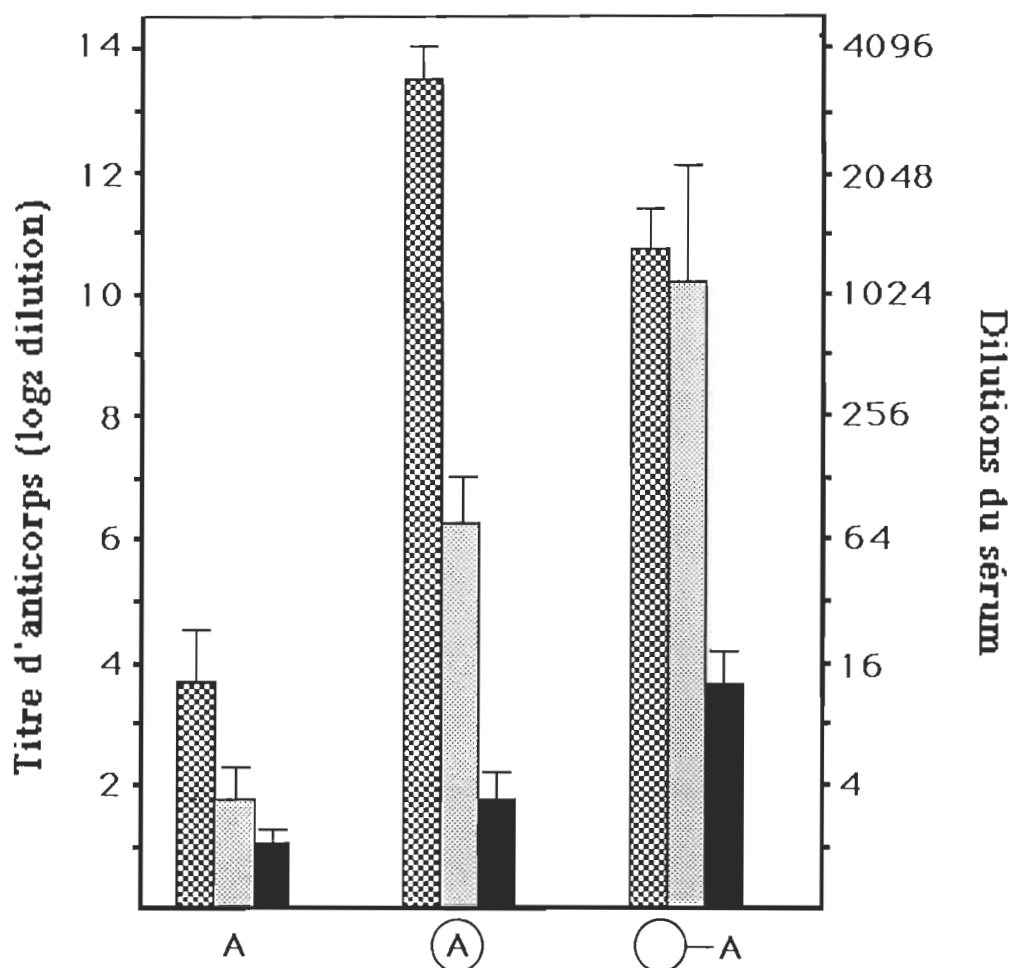
**Fig.4b: Cinétique de l'immunopotentiation en réponse secondaire.**

Les souris ont été immunisées 2 fois, à 28 jours d'intervalle, avec 75  $\mu$ g d'albumine, libre, encapsulée ou ancrée; puis le sang a été prélevé entre le 2ième et le 30ième jour après la seconde injection.



**Fig. 5 : Cinétique de la production des IgM et IgG en réponse secondaire.**

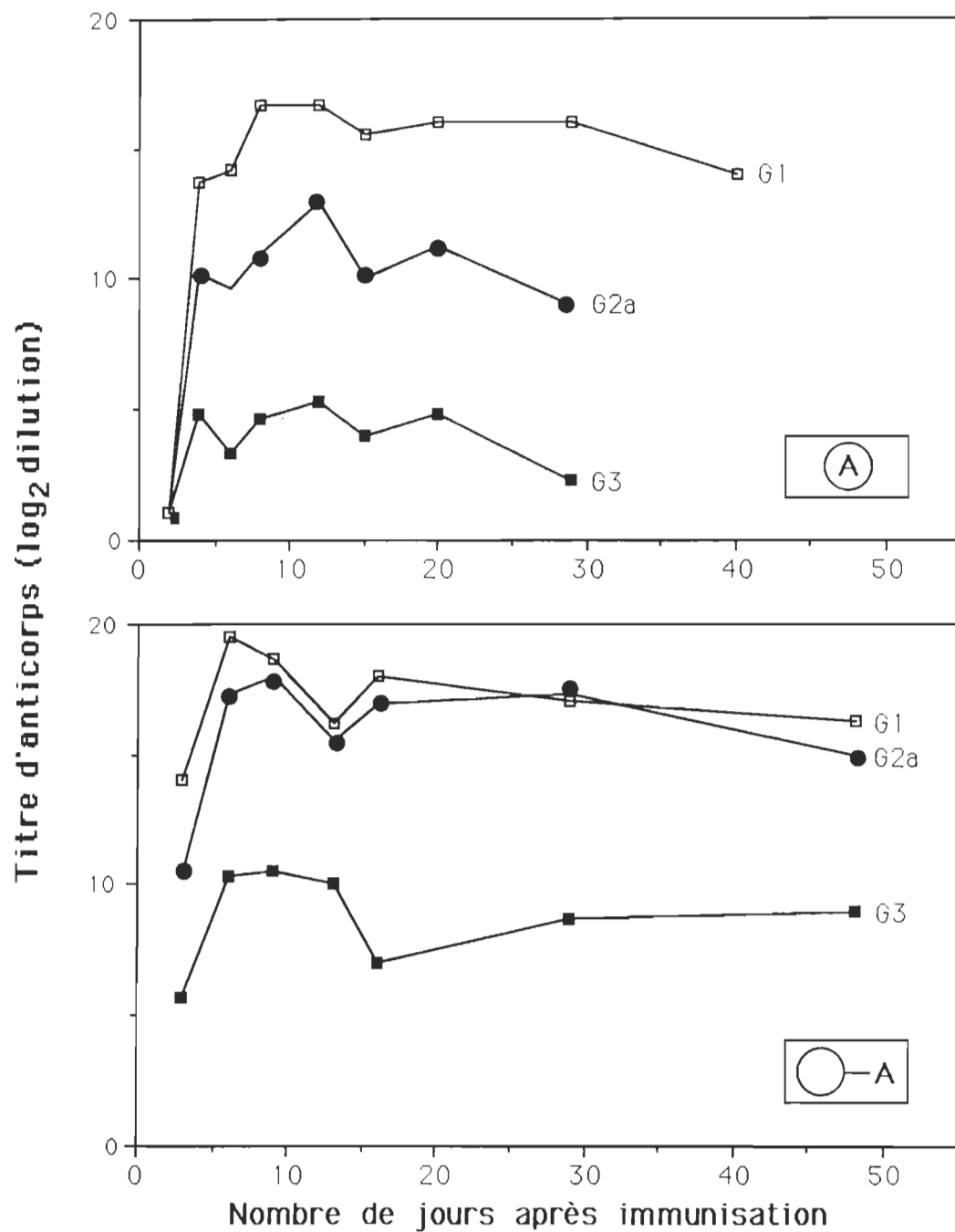
Les souris ont été immunisées 2 fois, à 28 jours d'intervalle, avec 75  $\mu$ g d'albumine encapsulée ou ancrée; puis le sang a été prélevé par ponction cardiaque entre le 2<sup>ième</sup> et le 38<sup>ième</sup> jour après la seconde injection (moyenne de 6 souris). ■ IgM ■ IgG



**Fig.6 : Production des isotypes IgG1, IgG2a et IgG3.**

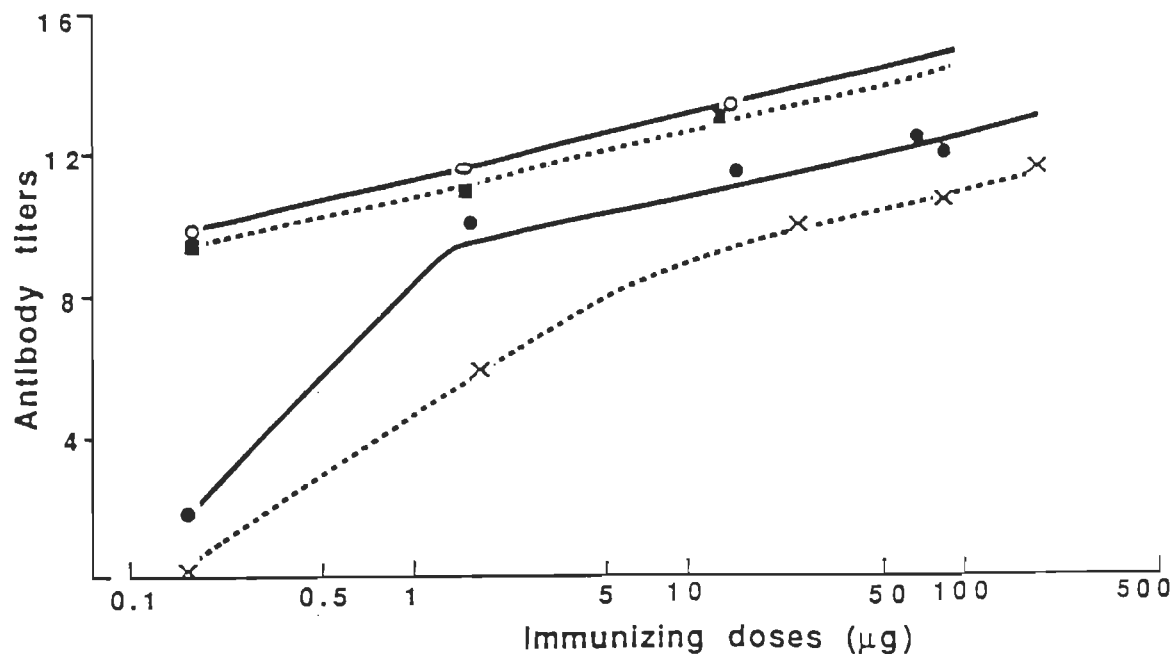
Le test ÉLISA est réalisé sur le sérum du sang de souris immunisées 2 fois, à 28 jours d'intervalle avec les 3 préparations antigéniques. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque le 4ième jour après la seconde injection, et la production des isotypes d'IgG dosée et exprimée en log2 de l'inverse de la dilution du sérum.

■ G1; ■ G2a; ■ G3.

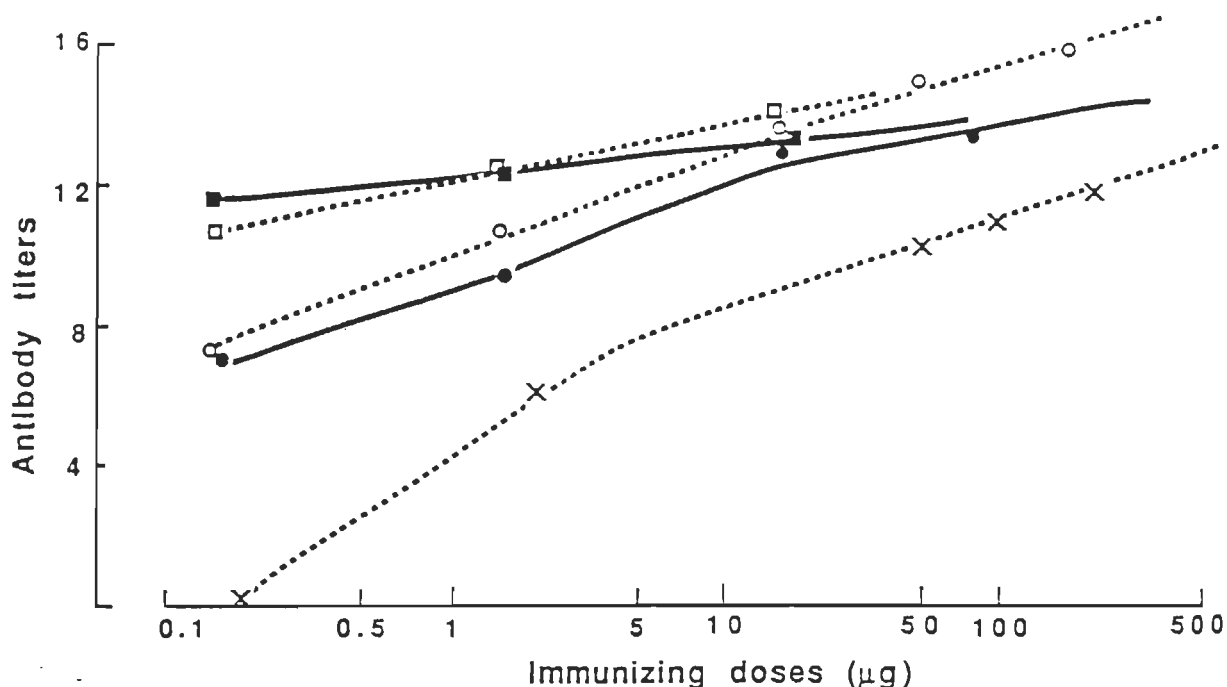


**Fig.7 : Cinétique de la production des IgG1, IgG2a et IgG3.**

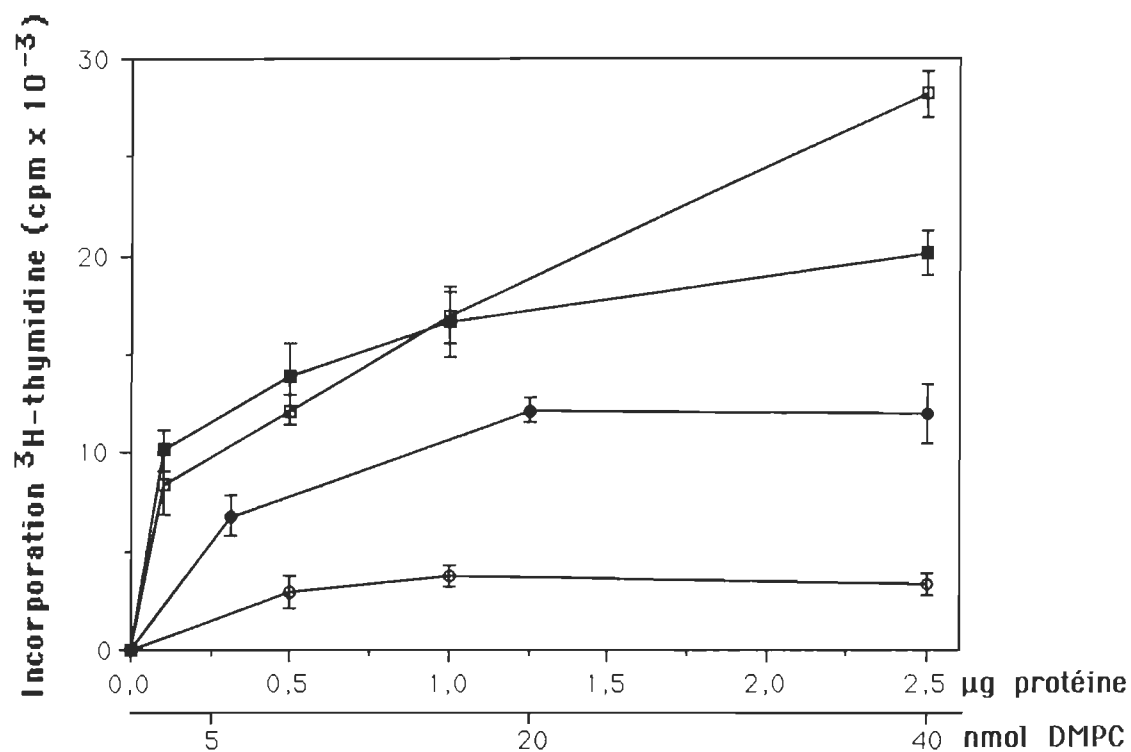
Les souris ont été immunisées 2 fois, à 28 jours d'intervalle, avec 75 µg d'albumine encapsulée ou ancrée; puis le sang a été prélevé par ponction cardiaque entre le 2<sup>ième</sup> et le 50<sup>ième</sup> jour après la seconde injection (moyenne de 6 souris).



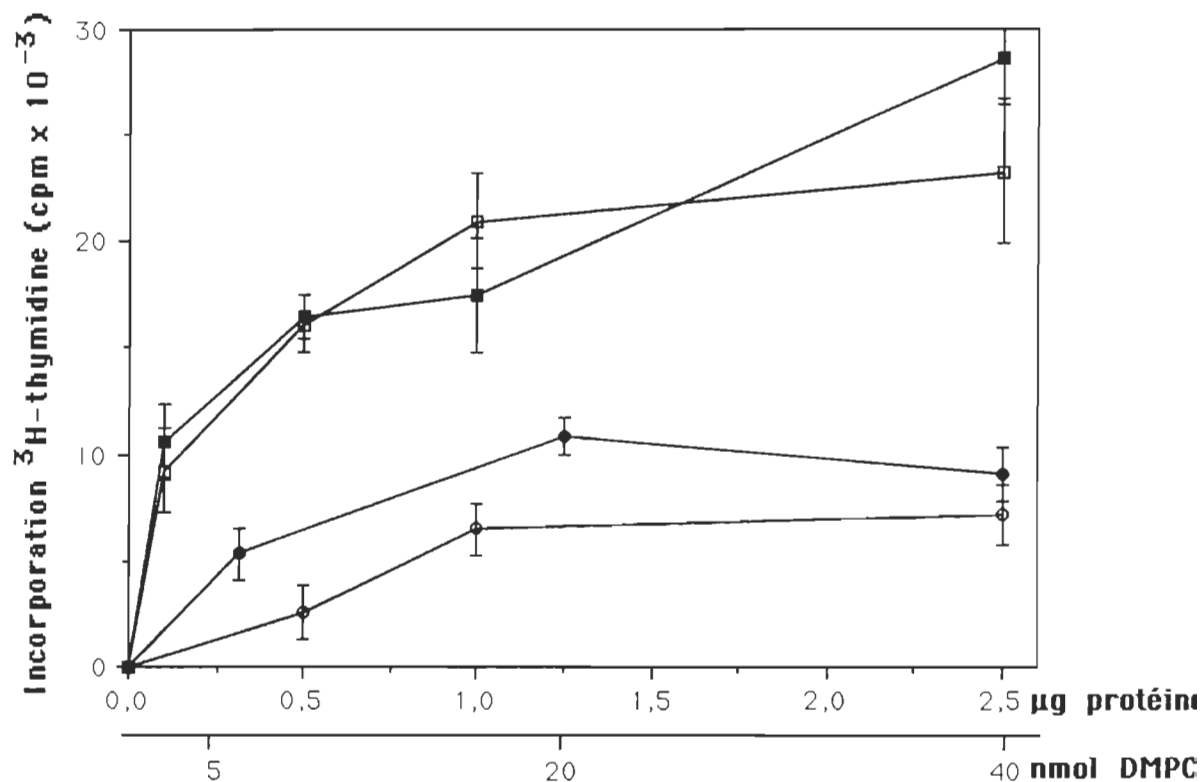
**Fig.8 : Influence du rapport protéine / lipide lors de la réponse anticorps à l'antigène encapsulé.** Différentes doses de BSA encapsulée à divers rapports protéine / lipide ont été injectées à des souris: ● = 53  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ; ■ = 8,8  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ; ○ = 1,2  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ . Le test ELISA a été réalisé sur le sérum du sang des souris immunisées 2 fois à 4 semaines d'intervalle, recueilli 11 jours après la seconde injection. La courbe témoin est représentée par les réponses de souris immunisées avec les mêmes quantités de BSA libre ( x ). Les résultats exprimés en  $\log_2$  de la dilution du sérum sont les moyennes des réponses de 5 souris. (Thérien, Shahum & Fortin, 1991)



**Fig.9 : Influence du rapport protéine / lipide lors de la réponse anticorps à l'antigène ancré.** Différentes doses de BSA ancrée à divers rapports protéine / lipide ont été injectées à des souris: ○ = 150 μg/μmol; ● = 50 μg/μmol; ◇ = 10 μg/μmol; ■ = 1 μg/μmol. Le test ELISA a été réalisé sur le sérum du sang des souris immunisées 2 fois à 4 semaines d'intervalle, recueilli 11 jours après la seconde injection. La courbe témoin est représentée par les réponses de souris immunisées avec les mêmes quantités de BSA libre ( x ). Les résultats exprimés en log<sub>2</sub> de la dilution du sérum sont les moyennes des réponses de 5 souris. (Thérien, Shahum & Fortin, 1991)



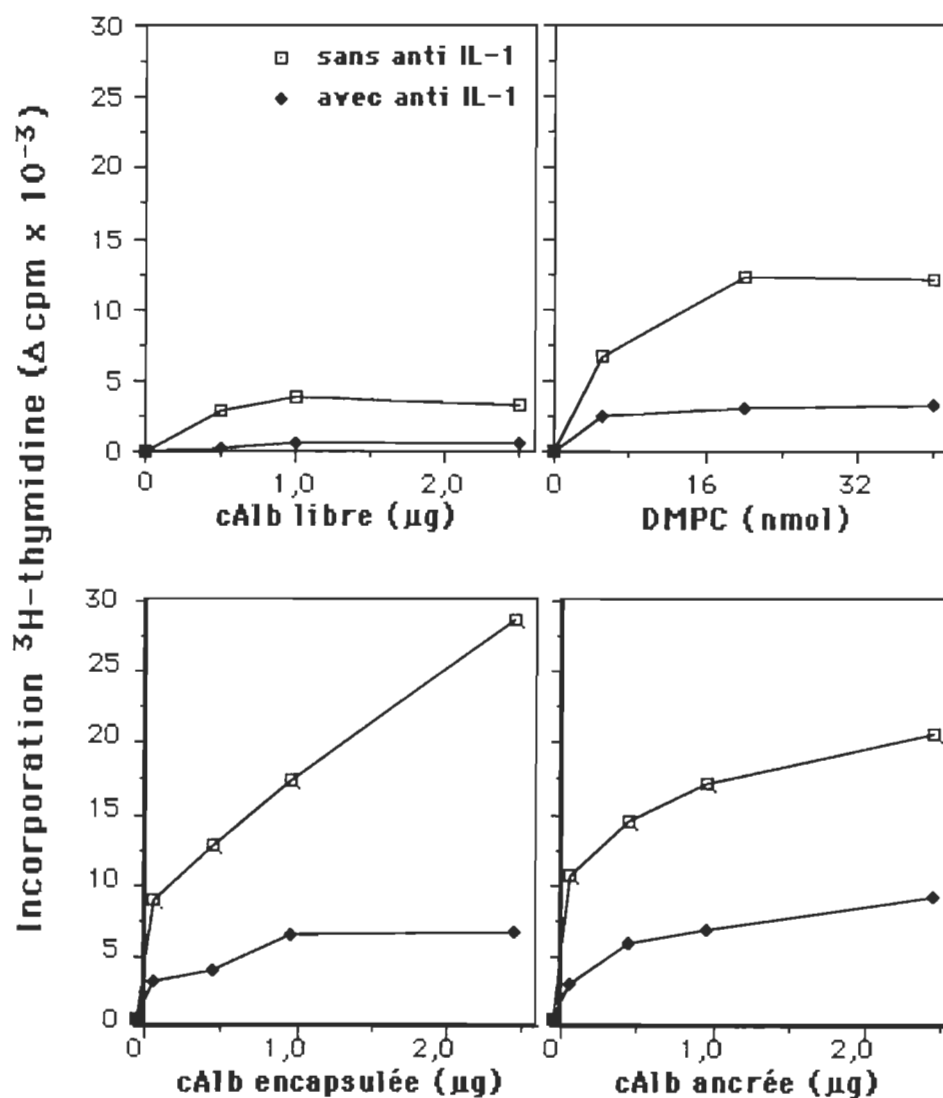
**Fig.10 :** Test de prolifération sur splénocytes de souris préimmunisées in vivo avec cAlb libre (50  $\mu$ g); restimulation in vitro avec 4 préparations antigéniques différentes: ●: liposomes seuls; ○ : cAlb libre; ■: cAlb ancrée; □: cAlb encapsulée.



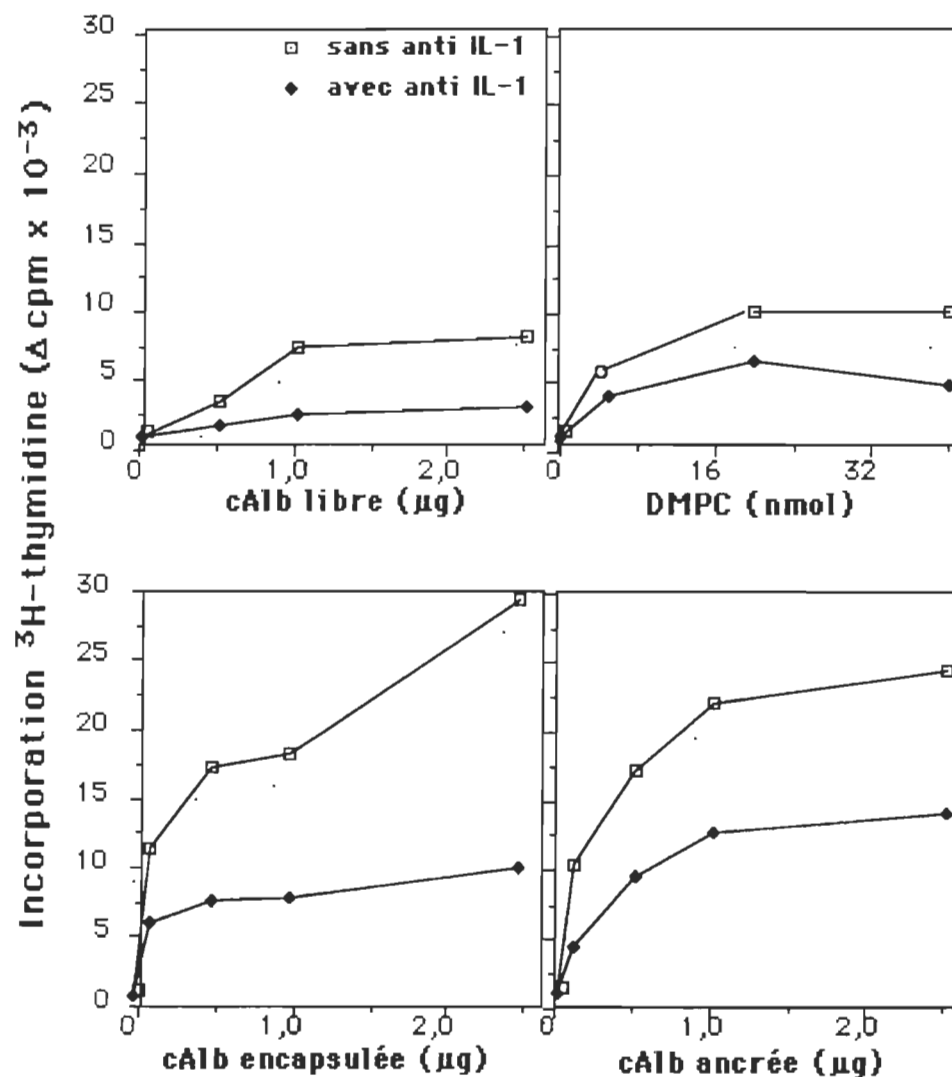
**Fig.11** : Test de prolifération sur splénocytes de souris préimmunisées in vivo avec liposomes seuls (1  $\mu\text{mol}$ ); restimulation in vitro avec 4 préparations antigéniques différentes: ● : liposomes seuls; ○ : cAlb libre; □ : cAlb ancrée; ■: cAlb encapsulée.



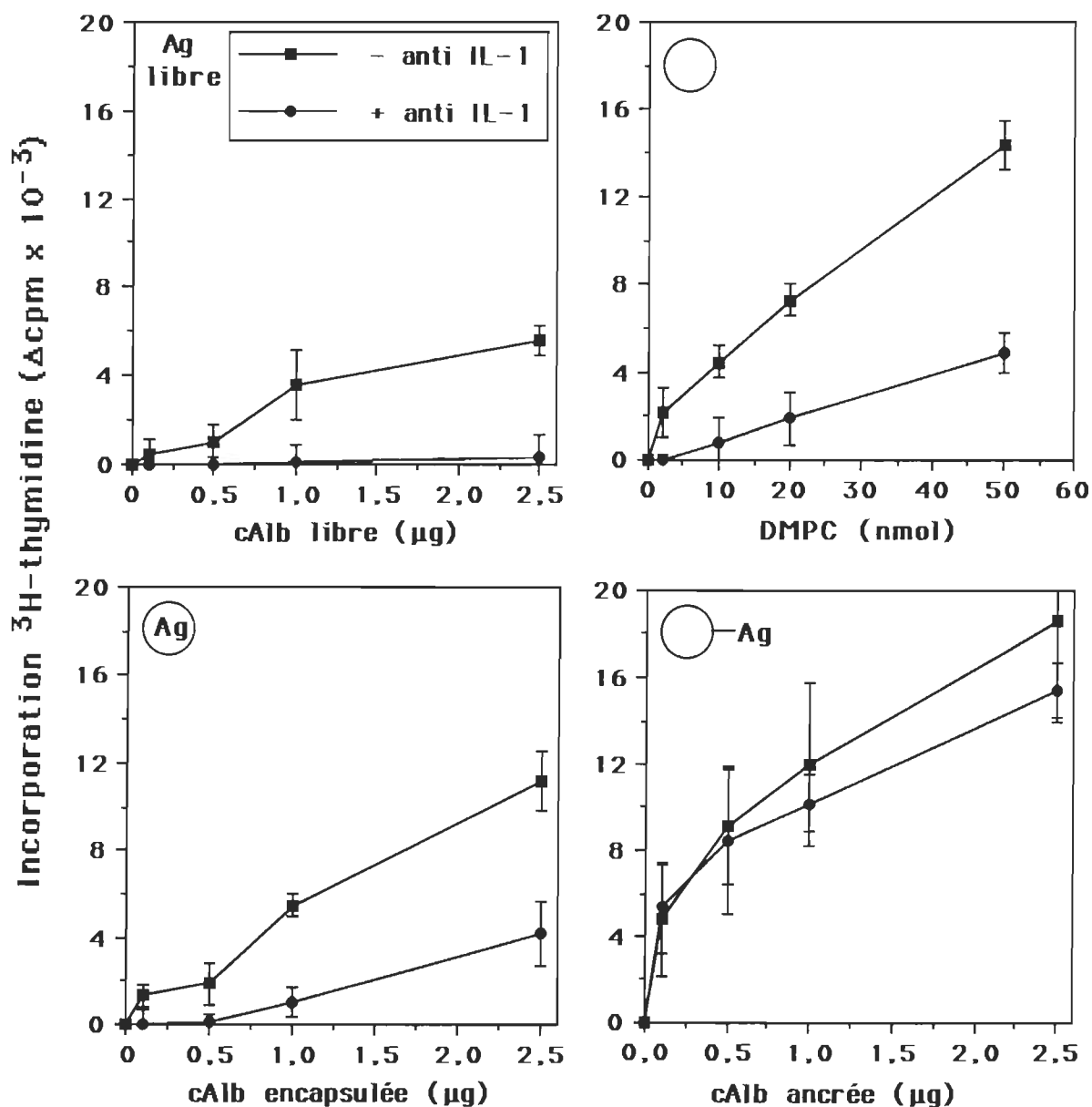
**Fig. 12 : Influence de l'anti IL-1 sur la prolifération lymphocytaire.** Les souris sont immunisées in vivo avec cAlb libre; puis les splénocytes sont restimulés in vitro avec liposomes seuls, cAlb libre, ancrée ou encapsulée, en présence ou non d'anti IL-1.



**Fig. 13 : Influence de l'anti IL-1 sur la prolifération lymphocytaire.** Les souris sont immunisées in vivo avec des liposomes seuls; puis les splénocytes sont restimulés in vitro avec liposomes seuls, cAlb libre, ancrée ou encapsulée, en présence ou non d'anti IL-1.



**Fig.14 : Mesure de la prolifération en présence et en absence d'anti IL-1.** Les souris sont immunisées *in vivo* avec liposomes seuls, cAlb libre, ancrée ou encapsulée; restimulation *in vitro* avec respectivement le même antigène, en présence ou non d'anti IL-1.



**Tableau A : Réponse proliférative en fonction de la nature et de la concentration en antigène.**

Les résultats sont exprimés en indices de stimulation (la valeur cpm/radioactivité de l'échantillon avec antigène divisée par la valeur du milieu sans antigène). Chaque donnée est la moyenne de 3 à 6 expériences. Les échantillons sont en triplicata.

**Indices de stimulation**

<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	0.1 $\mu$ g ou 2 nmol	0.5 $\mu$ g ou 5 nmol	1 $\mu$ g ou 20 nmol	2.5 $\mu$ g ou 40nmol
liposomes	liposomes	1.25	1.58	1.96	2.48
ag libre	ag libre	1,19	1,4	1,52	1,88
	lipos	nd	2,16	3,07	3,04
	ag encap	1,89	2,25	2,36	2,64
	ag ancré	2,7	3,37	3,84	4,44
ag encap	ag encap	1,33	1,6	1,97	2,61
ag ancré	ag ancré	1,46	2,92	3,32	4,06

**Tableau B : Pourcentage d'inhibition de la prolifération par l'anti IL-1 sur les splénocytes de souris immunisées in vivo et in vitro avec la même préparation antigénique (moyenne de 3 à 6 expériences).**

protéine ou DMPC	0,1mg	0,5mg 5 nmol	1mg 20 nmol	2,5mg 40 nmol	moyenne %
libre	100	94	94	93	95
encaps.	100	98	78	61	84
ancrée	23	32	25	20	25
lipos.	-	43	74	67	61

**Tableau C : Pourcentage d'inhibition de la prolifération par l'anti IL-1 sur des souris préimmunisées avec cAlb ancrée et immunisées *in vitro* avec liposomes seuls ou cAlb ancrée (2 expériences: mêmes souris, mêmes conditions).**

antigène ou DMPC	0,5 µg 5 nmol	1,0 µg 20 nmol	2,5µg 40 nmol	moyennes %
Ag ancré	24	40	16	27
Liposomes	75	80	80	78

**Tableau D : Action de l'interleukine 1 sur la prolifération.**

Les souris sont immunisées in vivo avec cAlb libre, ancrée ou encapsulée; puis les splénocytes sont restimulés in vitro respectivement avec le même antigène. (Moyennes de 2 à 4 expériences). L'indice de stimulation est calculé en divisant la valeur en cpm de l'échantillon avec antigène  $\pm$  IL1 par la valeur en cpm du milieu seul sans antigène  $\pm$  IL1.

<i>Cellules totales</i>	Indices de stimulation		
	+ antigène	+ ag + IL-1	% $\uparrow$
cAlb libre	1,16 $\pm$ 0,02	1,67 $\pm$ 0,04	44
cAlb ancrée	2,15 $\pm$ 0,43	2,92 $\pm$ 0,68	36
cAlb encapsulée	1,79 $\pm$ 0,36	2,31 $\pm$ 0,52	32

<i>Cell. sans <math>m\phi</math></i>	+ antigène	+ ag + IL-1	% $\uparrow$
cAlb libre	0,85 $\pm$ 0,28	1,93 $\pm$ 0,59	127
cAlb ancrée	1,98 $\pm$ 0,31	4,72 $\pm$ 1,63	137
cAlb encapsulée	1,97 $\pm$ 0,73	5,50 $\pm$ 0,41	178

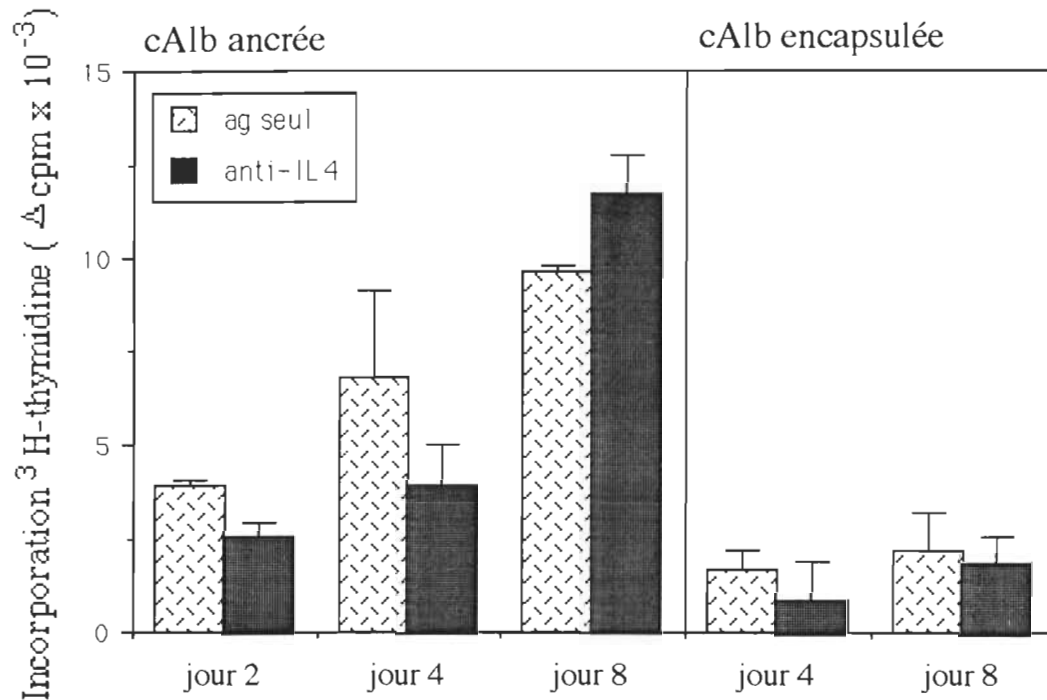
**Tableau E : Mesure de l'effet de 2 concentrations d'anti-cytokines (anti-IL4, anti-IFN $\gamma$ , anti-TNF $\alpha$ ) sur la réponse proliférative in vitro.**

Les souris sont immunisées in vivo avec cAlb libre, ancrée ou encapsulée selon le cas; puis les splénocytes sont restimulés in vitro 4 jours après avec respectivement le même antigène. La thymidine tritiée est ajoutée le 3ième jour après la mise en culture. L'indice de stimulation est calculé en divisant la valeur/ $\Delta$ cpm de l'échantillon avec antigène et l'anti-cytokine par la valeur/ $\Delta$ cpm du milieu avec antigène sans l'anti-cytokine. ( $\Delta$ cpm = cpm échantillon moins cpm milieu).

**Indices de stimulation**

Antigène → Antisérum ↓	Libre	ancré	encapsulé
anti-IL4 1 $\mu$ g	0,68	0,77	1,74
5 $\mu$ g	1,04	0,76	1,48
anti-IFN $\gamma$ 0,4 $\mu$ g	0,11	1,27	4,17
2 $\mu$ g	0,27	1,44	3,83
anti-TNF $\alpha$ dil 80	0,64	0,86	1,56
dil 4	1,11	0,64	1,31

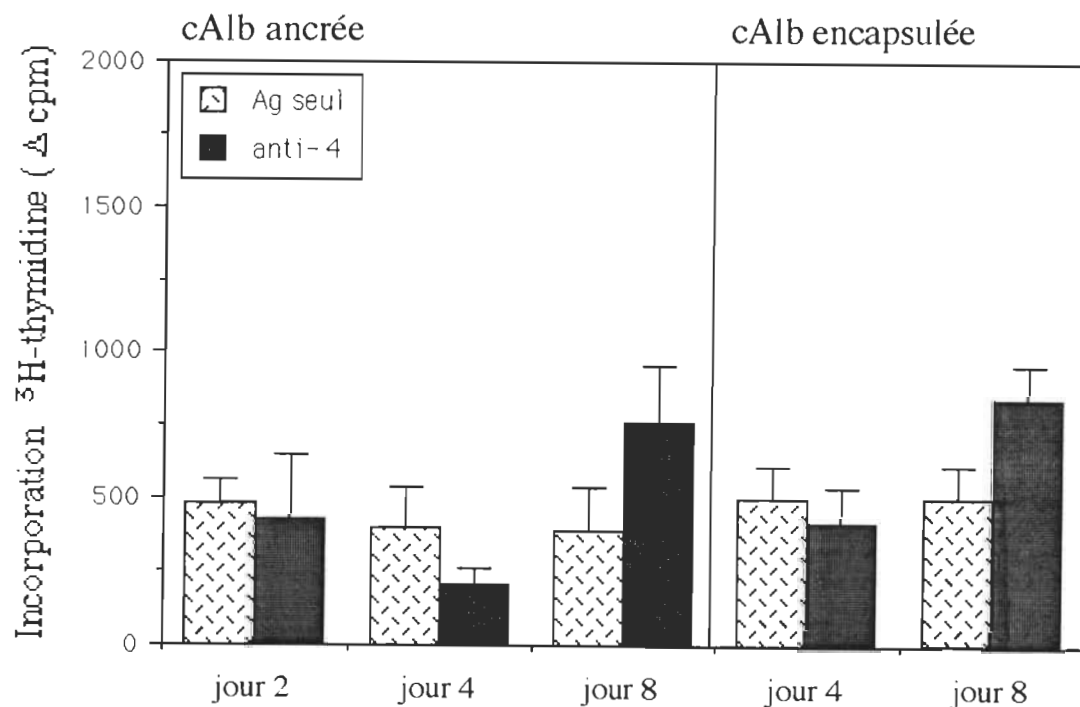




**Fig.15a : Action de l'anti-IL-4 sur la prolifération des cellules spléniques.**

Les souris sont immunisées in vivo avec l'antigène ancré (4  $\mu\text{g}$ ) ou encapsulé (20  $\mu\text{g}$ ); puis les splénocytes, recueillis 4 jours après, sont restimulés in vitro avec la même préparation antigénique, en présence ou non de l'anticytokine. Les cellules sont mises en culture en triplicata pendant 3 jours avant l'ajout de la thymidine tritiée.

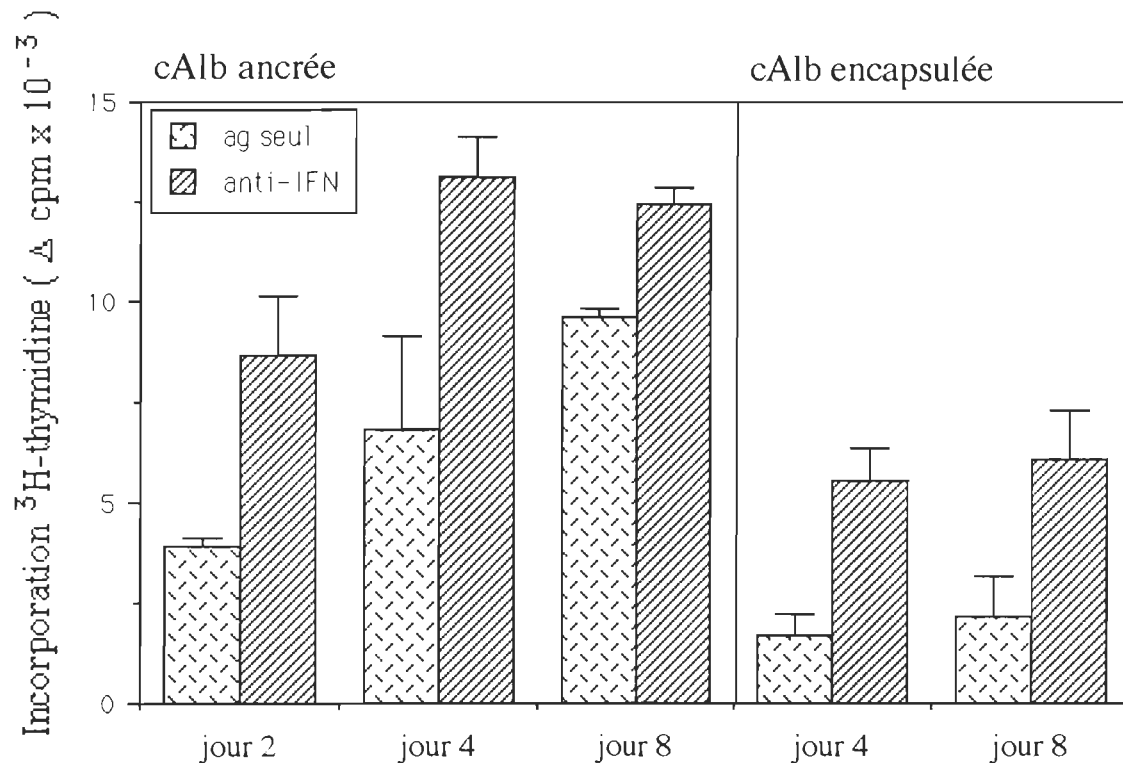
Anti-IL4 : 1  $\mu\text{g}$  / puits.



**Fig.15b : Action de l'anti-IL4 sur la prolifération des splénocytes sans macrophages.**

Les souris sont immunisées in vivo avec l'antigène ancré (4  $\mu$ g) ou encapsulé (20  $\mu$ g); puis les splénocytes, recueillis 4 jours après et déprimés en macrophages, sont restimulés in vitro avec la même préparation antigénique, en présence ou non de l'anticytokine. Les cellules sont mises en culture en triplicata pendant 3 jours avant l'ajout de la thymidine tritiée.

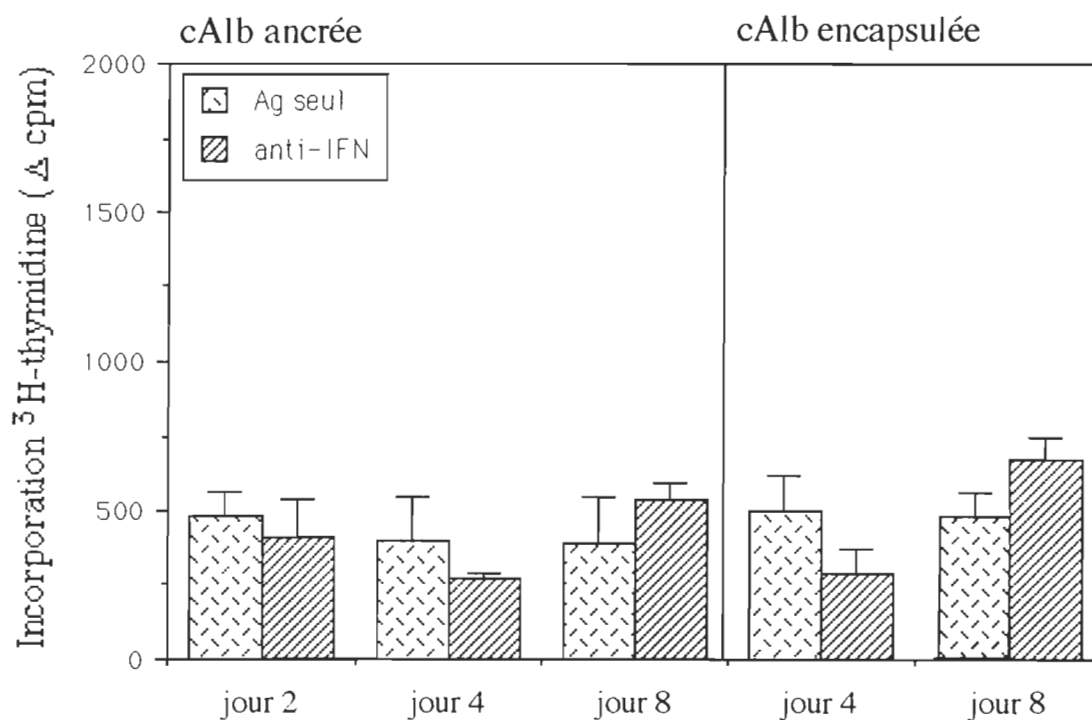
Anti-IL4 : 1  $\mu$ g / puits.



**Fig.16a : Action de l'anti-IFN $\gamma$  sur la prolifération des cellules spléniques.**

Les souris sont immunisées in vivo avec l'antigène ancré (4  $\mu\text{g}$ ) ou encapsulé (20  $\mu\text{g}$ ); puis les splénocytes, recueillis 4 jours après, sont restimulés in vitro avec la même préparation antigénique, en présence ou non de l'anticytokine. Les cellules sont mises en culture en triplicata pendant 3 jours avant l'ajout de la thymidine tritiée.

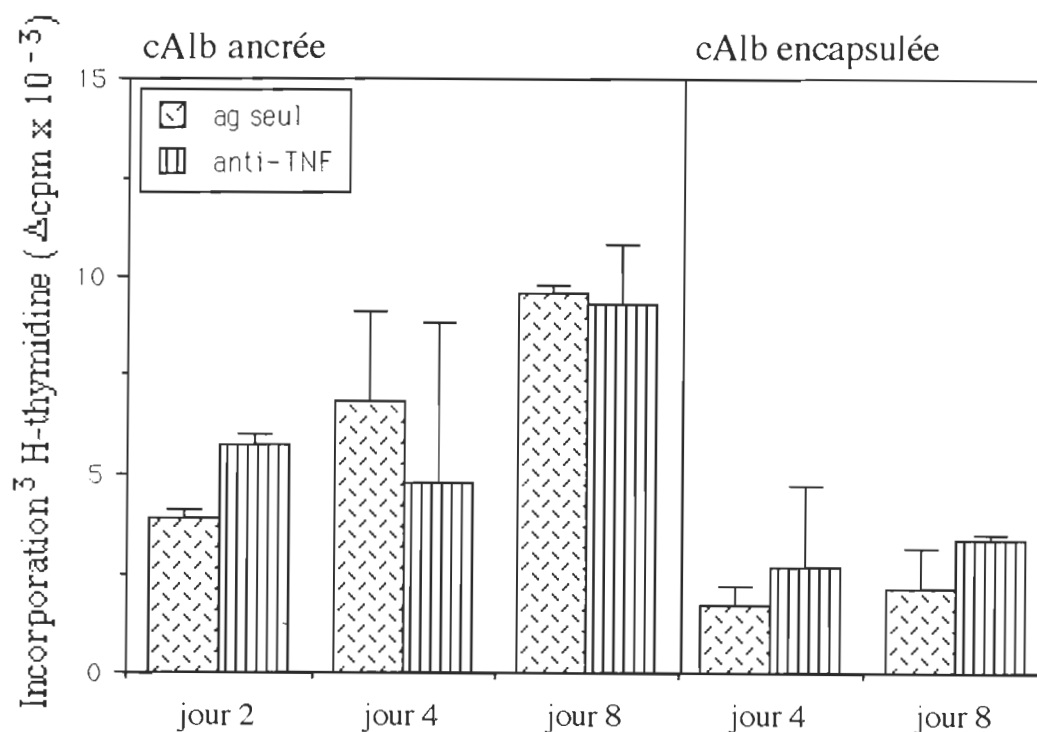
Anti-IFN $\gamma$  : 0,4  $\mu\text{g}$  / puits.



**Fig.16b : Action de l'anti-IFN $\gamma$  sur la prolifération des splénocytes sans macrophages.**

Les souris sont immunisées in vivo avec l'antigène ancré (4  $\mu\text{g}$ ) ou encapsulé (20  $\mu\text{g}$ ); puis les splénocytes, recueillis 4 jours après et déprimés en macrophages, sont restimulés in vitro avec la même préparation antigénique, en présence ou non de l'anticytokine. Les cellules sont mises en culture en triplicata pendant 3 jours avant l'ajout de la thymidine tritiée.

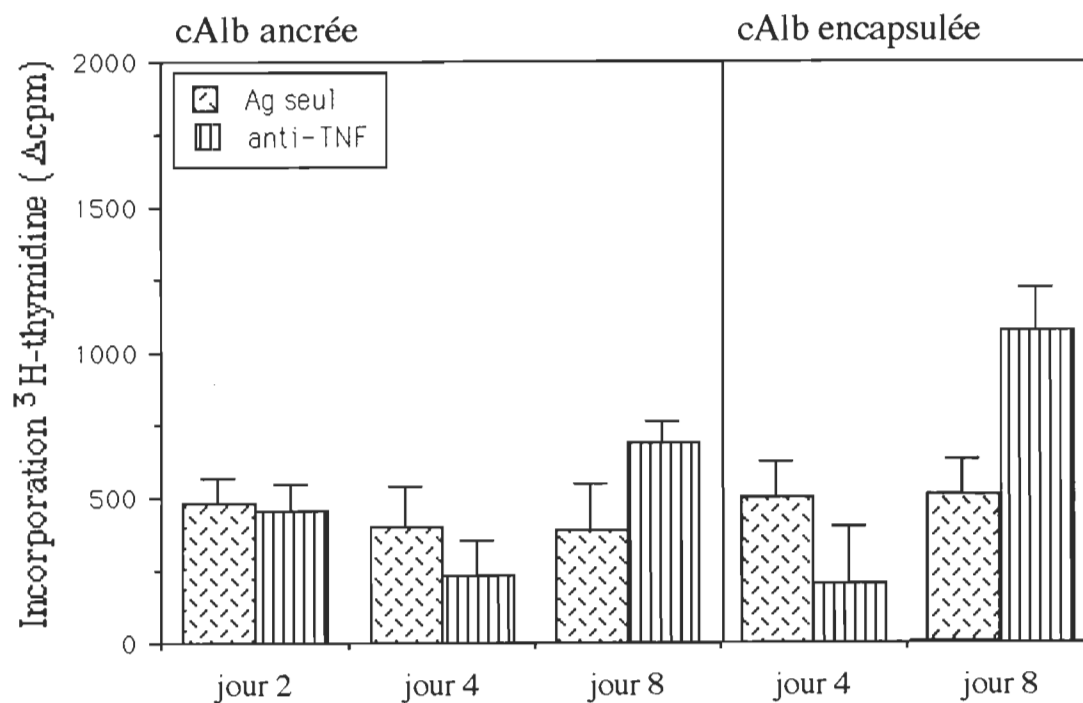
Anti-IFN $\gamma$  : 0,4  $\mu\text{g}$  / puits.



**Fig.17a : Action de l'anti-TNF $\alpha$  sur la prolifération des cellules spléniques.**

Les souris sont immunisées in vivo avec l'antigène ancré (4  $\mu$ g) ou encapsulé (20  $\mu$ g); puis les splénocytes, recueillis 4 jours après, sont restimulés in vitro avec la même préparation antigénique, en présence ou non de l'anticytokine. Les cellules sont mises en culture en triplicata pendant 3 jours avant l'ajout de la thymidine tritiée.

Anti-TNF $\alpha$  : dilution 40 finale / puits.



**Fig.17b : Action de l'anti-TNF $\alpha$  sur la prolifération des splénocytes sans macrophages.**

Les souris sont immunisées in vivo avec l'antigène ancré (4  $\mu$ g) ou encapsulé (20  $\mu$ g); puis les splénocytes, recueillis 4 jours après et déprimés en macrophages, sont restimulés in vitro avec la même préparation antigénique, en présence ou non de l'anticytokine. Les cellules sont mises en culture en triplicata pendant 3 jours avant l'ajout de la thymidine tritiée.

Anti-TNF $\alpha$  : dilution 40 finale / puits.

**Tableau F : Action des anti-cytokines (anti-IL4, anti-IFN $\gamma$ , anti-TNF $\alpha$ ) sur la réponse proliférative in vitro.**

Même légende que tableau E, mais la restimulation in vitro est faite le 4<sup>ième</sup> ou le 8<sup>ième</sup> jour après la première immunisation in vivo, sur les cellules spléniques totales. Anti-IL4: 1  $\mu$ g/puits; anti-IFN $\gamma$ : 0,4  $\mu$ g/puits; anti-TNF $\alpha$ : dilution 40 finale /puits.

**Indices de stimulation**

**Cellules totales**

Antigène	ancré		encapsulé	
	Stimulation in vitro	jour 4      jour 8	jour 4      jour 8	
+ anti-IL4		0,83 $\pm$ 0,14      1,23 $\pm$ 0,36	1,01 $\pm$ 0,35      0,79 $\pm$ 0,07	
+ anti-IFN $\gamma$		1,76 $\pm$ 0,26      2,16 $\pm$ 0,49	3,3 $\pm$ 0,49      2,31 $\pm$ 0,53	
+ anti-TNF $\alpha$		0,88 $\pm$ 0,16      1,61 $\pm$ 0,35	1,34 $\pm$ 0,15      1,19 $\pm$ 0,39	

**Tableau G : Action des anti-cytokines (anti-IL4, anti-IFN $\gamma$ , anti-TNF $\alpha$ ) sur la réponse proliférative in vitro.**

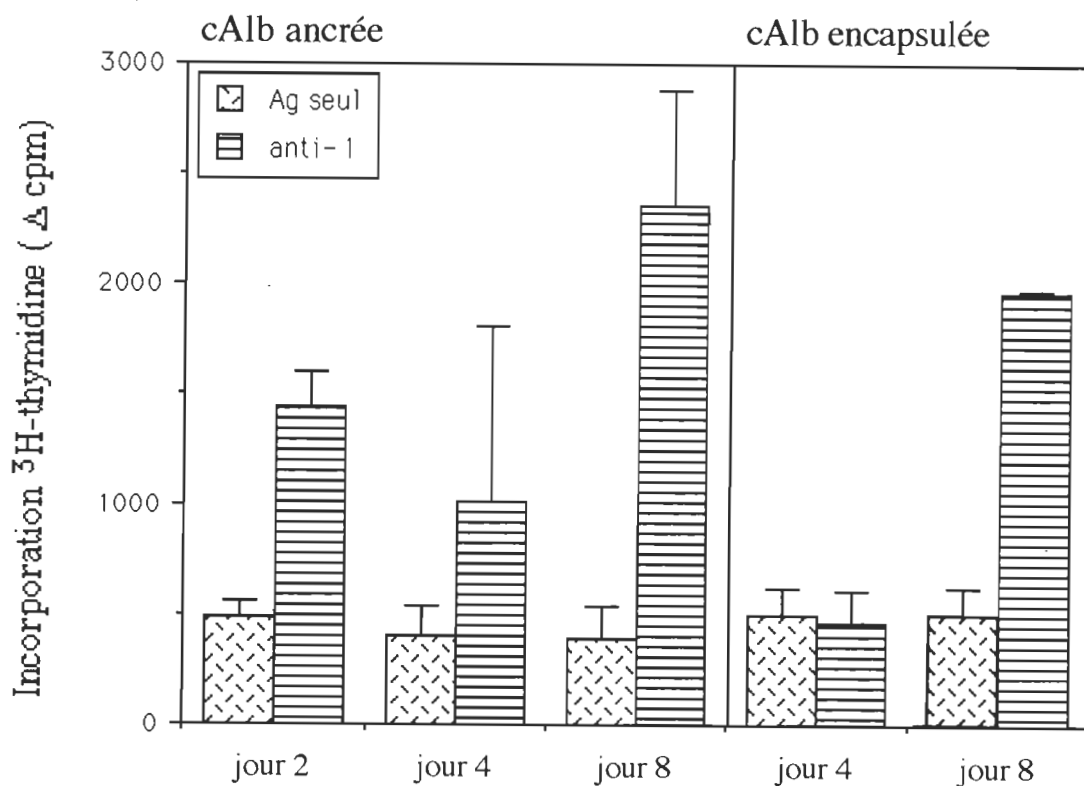
Même légende que tableau E, mais la restimulation in vitro est faite le 4<sup>ième</sup> ou le 8<sup>ième</sup> jour après la première immunisation in vivo, sur les cellules spléniques dépourvues de macrophages. Anti-IL4: 1  $\mu$ g/puits; anti-IFN $\gamma$ : 0,4  $\mu$ g/puits; anti-TNF $\alpha$ : dilution 40 finale / puits.

**Indices de stimulation**

**Cellules sans macrophages**

Antigène	ancré		encapsulé	
Stimulation in vitro	jour 4	jour 8	jour 4	jour 8
+ anti-IL4	0,54 $\pm$ 0,04	2,26 $\pm$ 0,29	0,72 $\pm$ 0,12	1,63 $\pm$ 0,07
+ anti-IFN $\gamma$	0,98 $\pm$ 0,29	1,92 $\pm$ 0,56	0,51 $\pm$ 0,06	1,43 $\pm$ 0,08
+ anti-TNF $\alpha$	0,45 $\pm$ 0,13	1,84 $\pm$ 0,09	0,27 $\pm$ 0,13	1,54 $\pm$ 0,62





**Fig.18 : Action de l'anti-IL1 sur la prolifération des splénocytes sans macrophages.**

Les souris sont immunisées in vivo avec l'antigène ancré (4  $\mu\text{g}$ ) ou encapsulé (20  $\mu\text{g}$ ); puis les splénocytes, recueillis 4 jours après et déprimés en macrophages, sont restimulés in vitro avec la même préparation antigénique, en présence ou non de l'anticytokine. Les cellules sont mises en culture en triplicata pendant 3 jours avant l'ajout de la thymidine tritiée.

Anti-IL1 : dilution 1000 finale / puits.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous avons étudié l'influence de deux modes d'association de l'antigène avec le liposome pour comprendre par analyse comparative les mécanismes de l'effet adjuvant observé, et ce faisant nous voulions d'une part cerner les mécanismes cellulaires qui sous-tendent ce phénomène, c'est-à-dire insertion dans le cycle immunitaire et voies d'activation, et d'autre part caractériser de façon plus générale les circuits immunitaires. Nos points de discussion se répartiront donc en autant de volets que je vais essayer de définir comme distincts par souci de clarté, mais qui en fait s'imbriquent intimement.

#### *Le caractère adjuvant des liposomes*

L'association est une condition nécessaire à l'immunopotentialisation, que l'antigène soit encapsulé dans les vésicules ou lié en surface par liaison covalente. Les préparations antigéniques contenant l'antigène et les liposomes sous forme non associée n'induisent *in vivo* aucun effet adjuvant sur la réponse humorale spécifique. Pourtant, nous avons mis en évidence un effet de potentialisation induit par ces liposomes sur l'intensité de la prolifération *in vitro*. Il pourrait donc s'agir de la prolifération de cellules suppressives ou autres, non impliquées dans la production d'anticorps, ou de l'activation de la voie Th1 caractérisée par une faible sécrétion d'immunoglobulines; ou encore d'un effet non spécifique des liposomes dans le contexte non physiologique *in vitro*, conséquence d'un échange de lipides membranaires entre liposomes et cellules immunes (Thérien *et al.* 1990).

La hausse de production d'anticorps est sensiblement la même pour les deux types d'association mais la différence se situe au niveau de la qualité des immunoglobulines produites. Cette sécrétion préférentielle d'isotypes différents constatée lors de l'expérimentation *in vivo* est d'une importance capitale quand on connaît le rôle distinct de chacune des classes d'immunoglobulines dans la défense immune. Quant à nous, elle nous permet déjà nos premières conclusions:

☞ L'antigène encapsulé se conduit comme un antigène thymo-dépendant typique puisqu'il induit une réponse secondaire très forte et un haut rapport IgG/IgM. L'antigène ancré a une démarche plus ambivalente puisqu'il induit également une forte mémoire immunologique, mais son rapport IgG/IgM très bas évoque plutôt une thymo-indépendance.

☞ Par ailleurs, l'encapsulation qui se caractérise par la production accrue des IgG1, moins d'IgG2a et peu d'IgG3 laisse présager l'activation de la voie Th2; alors que la hausse de sécrétion d'IgG2a, d'IgG3 et d'IgM dans le cas de l'ancrage serait l'indice de l'activation de la voie Th1.

Est-ce-à dire que chaque type d'antigène liposomal emprunte son circuit ? Jusqu'à quel point avons-nous le droit de faire une telle dichotomie? C'est là que les résultats de l'expérimentation *in vitro* viennent peaufiner ces premières conclusions :

*À propos des voies d'activation préférentielles :*

☞ Les résultats des tests avec l'anti-IL1 nous permettent de conclure dans le sens de la dernière conclusion ci-dessus. En effet, le fait que l'anti-IL1 ait un effet inhibiteur beaucoup moindre sur les cellules stimulées par l'antigène ancré implique que celui-ci passe par une voie de stimulation non

exclusivement régie par l'IL-1, ou plutôt qu'il emprunte aussi une autre voie, indépendante de la quantité d'IL-1 sécrétée dans le milieu, donc la voie Th1 a priori. Dans les cas de l'antigène encapsulé ou sous forme libre, la voie régie par l'IL-1, la voie Th2, serait de loin la voie dominante, puisque l'antisérum bloque presque totalement la réponse.

*À propos des phénomènes de prise en charge et de présentation :*

☞ Si l'encapsulation favorise le circuit Th2, dépendant de l'IL-1 et donc des macrophages qui la sécrètent, alors notre conclusion est en accord avec notre hypothèse de départ selon laquelle la prise en charge de l'antigène encapsulé se fait essentiellement par les macrophages. Dans le cas de l'antigène exposé en surface, on avait supposé une interaction possible avec les récepteurs membranaires spécifiques de l'antigène, et donc une activation selon une voie B-dépendante prédominante. On sait que la voie Th1, indépendante de la sécrétion d'IL-1, peut être activée adéquatement par une présentation aussi bien par les cellules B que par les macrophages: là aussi notre conclusion est conforme.

☞ Ce schéma d'activation explique même une certaine distorsion entre les résultats *in vivo* et *in vitro*. En effet, nous avons noté une augmentation semblable de la réponse humorale pour les deux modes d'association; or, *in vitro*, la hausse de prolifération est nettement plus forte pour l'ancrée. Ce détail vient renforcer l'idée que l'ancrage stimule préférentiellement la voie Th1, qui est, rappelons-le, une voie sécrétrice de peu d'anticorps, par opposition à la Th2 qui est caractérisée par une production accrue des Igs et surtout des IgE, induite par l'IL-4. La stimulation enregistrée *in vitro* ne peut donc pas se traduire au niveau de la quantité des anticorps produits *in vivo*. Ce qui revient à dire que l'analyse

seule de la réponse humorale ne rend pas justice, si l'on peut dire, à la capacité immunopotentielle de la liaison en surface de l'antigène.

☞ Tout de suite une autre conséquence de ce schéma d'activation: l'IFN $\gamma$  produit par les Th1 activés a une puissante action inhibitrice, selon Mosmann *et al*(89), Vitetta *et al*(87) ou Street *et al*(91), sur les Th2 et les effets de l'IL-4 (commutation de classe, expression des protéines du CMH, croissance des B). L'anti-IFN $\gamma$  dans le milieu va donc lever cette inhibition, ce qui se traduira par une augmentation de la prolifération d'autant plus forte et plus rapide que cette voie Th2 était majoritairement empruntée. Et c'est le cas des cultures où l'antigène était encapsulé. On remarque un effet semblable pour l'ancré aussi, quoique un peu plus lent; normal, si comme on le suppose, l'ancré emprunte aussi la voie Th1 dès le début de la réponse.

☞ Quelle serait l'explication que l'on pourrait donner à l'effet de l'anti-IL1 sur les cellules sans macrophages ? Rappelons-nous qu'une forte prolifération est induite, plus rapide et plus intense dans le cas des cultures stimulées avec l'antigène ancré. Selon une recherche assez récente de Eugui (90), il existe une IL-1 $\alpha$  membranaire exprimée sur les lymphocytes B et les monocytes; l'interaction de cette monokine de surface sur les CPAg avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-1 $\alpha$  peut activer des mécanismes dans ces cellules de sorte que celles-ci stimulent la prolifération des cellules T par contact et la production d'IL-2. De plus, Eugui note que la hausse d'incorporation de thymidine tritiée par les cellules T est au moins 4 fois plus grande avec les B qu'avec les macrophages péritonéaux dans les puits de culture. Si cela est vrai, nos données expérimentales pourraient être expliquées ainsi, avec la conclusion plus ponctuelle que l'antigène ancré est pris en charge préférentiellement par les B dès la première immunisation *in*

*in vivo* puisque plus de lymphocytes B activés ont exprimé de l'IL-1 membranaire lors de la restimulation *in vitro*.

*À propos des fonctions de présentation et de sécrétion du macrophage :*

☞ Les 2 fonctions du macrophage, présentation de l'antigène et sécrétion d'IL-1, sont d'une certaine façon dissociables puisqu'il y a compensation du manque de macrophage par l'ajout d'IL-1. Les valeurs de prolifération restant cependant très faibles, on doit supposer que la présence physique des cellules est primordiale soit en elle-même soit par l'intermédiaire d'un autre facteur essentiel mais encore indéterminé.

*En résumé :*

Pour l'ancré: voies Th1 et Th2 avec prise en charge par les cellules B et les macrophages; pour l'encapsulé: voie Th2 essentiellement, avec prise en charge par les macrophages seulement. Qu'implique cette différence de présentation et de voie d'activation ? Tout en gardant en tête nos postulats de base énoncés au premier chapitre (section 1.4.5, page 39: les diverses thèses en présence), il est temps maintenant de nous remettre en mémoire la problématique de notre recherche et de tenter de placer nos résultats dans les "vides" que constituaient nos interrogations de départ. Ces interrogations sont multiples et elles se placent à plusieurs niveaux. En effet, si un nombre incalculable de chercheurs ont multiplié les études sur les utilisations des liposomes en pharmacologie, en thérapeutique, ou en recherche fondamentale en biologie cellulaire, peu d'entre eux se sont véritablement arrêtés au "pourquoi" du phénomène liposome en soi.

1) Pourquoi y a-t-il immunopotentialisation ?

2) Pourquoi l'effet adjuvant *in vivo* dure si longtemps et surtout dans le cas de l'ancrage ?

3) Pourquoi l'encapsulation induit une réponse plus rapide que l'ancrage *in vitro* et y a-t-il des conséquences factuelles à cela ?

4) Et tout ceci étant dit, quand on parle du pouvoir adjuvant des liposomes, s'agit-il d'un même pouvoir adjuvant dans le cas de l'encapsulation et de l'ancrage ?

*Thèse sur l'effet du mode d'association de l'antigène avec le liposome sur l'ensemble des mécanismes cellulaires sous-tendant le pouvoir adjuvant des liposomes*

Notre expérimentation nous a fait lentement revenir en arrière, à partir de la production finale d'anticorps jusqu'à la prise en charge de l'antigène, étape première de la phase d'enclenchement de la réponse immunitaire. D'après nos résultats recueillis *in vivo* et *in vitro*, nous sommes arrivés à certaines conclusions sur la présentation et les voies d'activation de nos antigènes liposomaux. Or il faut également que ces conclusions cadrent avec ce qu'il se dit sur ces circuits, sur le plan général; et ce qui se dit est souvent matière à discussion si ce n'est à controverse.

En principe, macrophages et cellules B fonctionnent comme CPAg pour les clones de Th1 et Th2, mais selon Abbas *et al* (91), différents antigènes ou différentes conditions d'immunisation induisent l'expansion préférentielle de différentes sous-populations de T helpers. Il y a une activation sélective parce que différentes populations de cellules

présentatrices sont douées de la capacité d'activer préférentiellement une sous-population de T helpers donnée (Street *et al*, 91). Pour Gajewski *et al* (91), les B stimulent de façon optimale les Th2, et les macrophages, les Th1; et ce parce que les Th2 fournissent les facteurs solubles nécessaires à la prolifération et la différenciation des B en plasmocytes, et par l'IL-4, favorisent l'expression des molécules du CMH sur les B, ce que fait parallèlement l'IFN produit par les Th1 sur les macrophages. Ce n'est pas l'avis de Abbas *et al* (91) pour lesquels même si les B servent à la fois d'inducteurs et de cibles pour les fonctions effectrices des Th2, l'expansion clonale des Th2 reste fortement dépendante de la production d'IL-1 et donc des macrophages.

Pour Rothermel *et al* (91), Th1 et Th2 requièrent tous deux l'interaction Th/B pour induire une prolifération optimale des B. Une précision intéressante est que les grands lymphocytes B sont plus facilement activés par les 2 sous-populations de T helpers et leurs lymphokines, alors que les petits B, c'est-à-dire ceux n'ayant pas été exposés à la stimulation antigénique, nécessitent le contact cellule à cellule en plus des lymphokines sécrétées par Th2. Toutefois, l'aide accordée par les Th1 reste toujours inférieure à celle des Th2; tous les auteurs s'entendent au moins sur ce point. Les populations sécrétant IL-4 et IL-5 sont des auxiliaires extraordinaires pour les B et les stimulent à produire de très hautes quantités d'immunoglobulines de tous isotypes, l'activité "helper" des deux sous-populations de Th n'étant fonction que des cytokines sécrétées et non des cellules elles-mêmes qui sont capables d'interagir de façon égale avec les cellules B (Croft *et al*. 91).



Dans le même ordre d'idées, Abbas *et al* (90) précisent que la croissance et la différenciation des B en réponse à un antigène dépend non seulement des cytokines produites par les T helpers mais du stade d'activation des B eux-mêmes. C'est ainsi que les petits B répondent à l'antigène et aux Th2, mais non aux Th1, parce qu'ils ont besoin des lymphokines produites par les Th2 pour leur croissance et leur différenciation. Les grands lymphocytes B, quant à eux, peuvent répondre aussi bien aux Th1 qu'aux Th2, les Th1 ayant cependant une efficacité moindre. Les Th1 ont des interactions cellule à cellule avec les B au repos, et par la suite, ces cellules deviennent aptes à proliférer et à se différencier en réponse aux cytokines sécrétées par les Th2. De plus, ces cytokines haussent le niveau de prolifération des B "bystanders" qui sont recrutés sur les lieux de la stimulation antigénique. Donc, l'interaction initiale entre un petit nombre de B présentateurs d'antigène et de T helpers provoque l'amplification de la réponse humorale spécifique; bien que la réponse "bystander" ne soit pas spécifique pour l'antigène au départ, elle suit par la suite la réponse dont l'induction est spécifique et dépendante de l'antigène.

*Et que font nos antigènes liposomaux dans ce contexte ?*

#### ✿ L'antigène encapsulé dans les liposomes

L'encapsulation d'un antigène induit une forte réponse humorale qui persiste longtemps. Dal Monte et Szoka (89) attribuent un rôle central au macrophage en tant que cellule présentatrice à cause de sa capacité de phagocytose, ce que Alving (89) appelle un "prodigieux appétit" pour les liposomes. Les antigènes encapsulés ne peuvent être internalisés et dégradés que par les macrophages et non par les B à la surface desquels les liposomes adhèrent seulement puis perdent lentement leur contenu (Dal Monte *et al*,

89). Le caractère adjuvant est dû à ce que beaucoup d'antigène est délivré d'un même coup et dans un petit volume de distribution aux macrophages qui internalisent les vésicules avidement puis relâchent lentement l'antigène encapsulé. Verma *et al* (91) soulignent que les épitopes antigéniques provenant de molécules encapsulées apparaissent très tôt, 15 minutes après la phagocytose, mais sont exprimés longtemps, au moins 24 heures, sur la surface cellulaire. Notre antigène encapsulé est pris en charge par les macrophages seulement, puis est présenté aux T helpers et principalement aux Th2 puisque la lente dégradation des liposomes dans les macrophages simule des stimulations successives, caractère qui favorise la voie Th2 comme on l'a vu dans le premier chapitre.

#### ✿ L'antigène ancré en surface

À l'encontre de l'antigène encapsulé, peu de choses ont été écrites sur le pourquoi du caractère adjuvant du liposome lié de façon covalente à un antigène et en quoi il différerait de celui de l'encapsulation, si ce n'est quelques études de Van Rooijen (Van Rooijen *et al*, 89; Van Rooijen, 90; Su *et al*, 89) qui concluent, sans toutefois pouvoir l'expliquer, que, contre toute attente, la suppression des macrophages *in vivo* diminue la réponse humorale de l'antigène ancré plus que celle de l'encapsulé.

Les antigènes ancrés peuvent être pris en charge aussi bien par les macrophages que par les cellules B qui reconnaissent les déterminants antigéniques par leurs récepteurs de surface. Et dans ce dernier cas, la présentation par les B va être de beaucoup plus efficace à cause de la très forte affinité créée par les récepteurs spécifiques, et elle ne nécessitera que des concentrations faibles d'antigène.

Notre antigène ancré va suivre un schéma d'activation plus complexe ou plus diversifié que celui de l'antigène encapsulé : macrophages et cellules B vont agir en tant que CPAg pour les Th1 et les Th2. Cependant, la voie Th2 sera moins intense parce que il y a moins d'antigène ancré disponible pour les macrophages, les cellules B faisant compétition. Et cette compétition est "inégal" dans le sens où les B captent l'antigène avec des récepteurs de membrane spécifiques, d'où une affinité considérablement augmentée. Mais si cette prise en charge est rapide, la dégradation de l'antigène et sa présentation sont néanmoins nettement plus lentes que dans le cas du macrophage, 6 à 8 heures versus 1 heure pour le macrophage (Singer *et al*, 90).

Rothermel (91) parle de signaux intracellulaires plus faibles pour les Th1, avec pour conséquence une interaction faible avec les cellules B. Et si les signaux manquants pouvaient être compensés par les liposomes ? L'association lipide/antigène ancré en surface pourrait prolonger le contact des petits B avec les Th1 et les induire en prolifération et en activation, si néanmoins Th2 fournit son aide par l'intermédiaire des IL-4, 5 et 6.

Dans ce cas, les lymphocytes B, grands et petits, peuvent avoir des interactions cellule à cellule avec les T, Th1 et Th2. Les grands B peuvent être activés rapidement mais les petits B attendront l'apport des cytokines des Th2 pour proliférer. Mais l'aide des Th2 ne peut survenir en fait que s'il y a eu présentation de l'antigène par les macrophages à ces mêmes Th2, macrophages qui sécrètent l'indispensable IL-1. Théoriquement les grands B peuvent interagir avec les Th1 puisque ceux-ci n'ont pas besoin d'IL-1 pour être activés. Mais pour les Th2, ils restent tributaires de cette première relation macrophage/Th2, à partir de laquelle toute l'amplification va s'enclencher, entraînant avec elle l'activation des B "bystanders" présents sur

le site de stimulation. Il va sans dire que quand les cellules B sont impliquées, l'activation sera plus complexe parce que plus de populations cellulaires seront impliquées avec un jeu subtil d'interactions dues à des facteurs de médiation de provenances diverses.

## CONCLUSIONS

1° Les antigènes liposomaux induisent une réponse immune très forte qui dure longtemps, quel que soit le mode d'association de l'antigène avec les liposomes, mais pour des raisons différentes : à cause de la présentation par les macrophages pour l'encapsulé, et à cause de la présentation par un grand nombre de populations de cellules pour l'ancré, grands et petits B, macrophages.

2° La prolifération induite par l'antigène ancré est plus forte que celle de l'encapsulé bien que la sécrétion d'anticorps soit de même intensité parce que la voie Th1 empruntée aussi par l'ancré est une voie sécrétrice de peu d'anticorps.

3° La réponse immune dure plus longtemps pour l'ancré parce que plus de populations cellulaires sont impliquées : les macrophages, les petits et les grands lymphocytes B, les Th1 et Th2; les réactions se font à des vitesses différentes et s'amplifient à mesure que plus de cellules entrent dans la chaîne d'activation immune.

4° L'effet adjuvant des liposomes associés de façon covalente à l'antigène est en fait plus grand que dans le cas de l'encapsulation puisque de plus faibles quantités d'antigène liposomal sont suffisantes pour une même stimulation (cf: 4  $\mu$ g in vivo, au lieu de 20 pour l'antigène encapsulé). On

peut même dire que de très faibles quantités d'antigène ancré vont avoir tendance à favoriser le détournement de cet antigène vers les B plutôt que vers les macrophages, et par là-même accentuer l'écart comportemental entre encapsulation et ancrage.

4° La présentation par les macrophages est plus rapide que celle par les B (Singer *et al.*, 90, et nos tests *in vitro*). C'est ce qui pourrait expliquer que l'absence de macrophages nuise plus au cheminement de l'antigène ancré qu'à celui de l'encapsulé ( Su *et al.* 89; Van Rooijen, 90). En effet, Su et Van Rooijen font leurs tests comparatifs 5 ou 7 jours après avoir supprimé les macrophages du foie et de la rate avec du dichlorométhylène diphosphonate encapsulé dans des liposomes. Cette suppression est effective dès le 2<sup>ème</sup> jour après l'injection intraveineuse. Or, les macrophages peuvent venir d'ailleurs sur le lieu d'immunisation et donc, le temps que le test soit réalisé, la récupération des macrophages péritonéaux manquants est faite : l'antigène encapsulé n'étant internalisé que par les macrophages, il peut attendre son heure dans le milieu.

Il en va autrement pour l'antigène ancré pour qui des macrophages, même en petite quantité, sont utiles pour activer les Th2 qui vont fournir les cytokines nécessaires à la prolifération des petits B et leur interaction avec les Th1, faute de quoi toute cette population n'aura pas les signaux nécessaires à sa stimulation. Les macrophages sont utiles de bonne heure aussi pour fournir l'IL-1 nécessaire pour que l'activation des Th2 par la présentation de l'antigène ancré par les B puisse se réaliser. Il y aura adhésion des antigènes liposomaux sur les B, puis interaction B/Th1 ou Th2, mais pas d'activation subséquente s'il y a eu élimination des macrophages péritonéaux. Et de plus, il n'y aura plus d'antigène disponible pour les

macrophages venus d'ailleurs plus tard, l'antigène ayant été détourné vers les cellules B.

5° Il est intéressant de constater que l'ancrage favorise la voie Th1 qui pourrait jouer un rôle d'après Hodgkin *et al* (91) dans la génération ou l'expansion des B mémoire ne sécrétant pas d'anticorps mais pouvant réagir avec l'antigène.

En conclusion finale, il est évident que l'on ne peut parler, au sujet de nos deux préparations antigéniques liposomales, d'un même effet adjuvant. Trop de choses diffèrent : de la présentation de l'antigène à la production des anticorps, en passant par les circuits d'activation. Outre le parti que l'on peut tirer sur le plan strictement fondamental de cette possibilité de sélection positive ou négative de populations cellulaires, il est intéressant d'approfondir les conséquences de l'utilisation d'un tel système sur le plan physiologique. Et pour cela au moins deux types de recherches peuvent être faites maintenant grâce aux toutes nouvelles approches: d'une part, l'étude microscopique des phénomènes d'endocytose et de présentation par les macrophages ou les cellules B; et d'autre part, le dosage direct des cytokines produites dans les surnageants de culture en même temps que le dosage des immunoglobulines sécrétées *in vitro*. Une façon de corroborer nos résultats *in vivo* et de vérifier l'exactitude de la thèse proposée... ou plutôt de la calibrer avec plus de minutie.

## BIBLIOGRAPHIE

Abbas A.K. (1987) Cellular interactions in the immune response. The roles of B lymphocytes and Interleukin-4. *American J. of Pathol.* **129**: 26-33.

Abbas A.K. (1988) A reassessment of the mechanisms of antigen-specific T-cell-dependent B-cell activation. *Immunol. Today* **9**: 89-94.

Abbas A.K., Urioste S., Collins T.L. & Boom W.H. (1990) Heterogeneity of helper / inducer T lymphocytes. IV. Stimulation of resting and activated B cells by Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.* **144**: 2031-2037.

Abbas A.K., Williams M.E., Burnstein H.J., Chang T.L., Bossu P. & Lichtman A.H. (1991) Activation and functions of CD4+ T-cell subsets. *Immunol. Rev.* **123**: 5-22.

Alving C.R. (1986) Liposomes as drug carriers for treatment of leishmaniasis. Dans: *Medical application of liposomes* (K.Yagi, Ed.). Pub.: S.Karger A.G. Pages 105-112.

Alving C.R., Richards R.L., Moss J, Alving L.I., Clements J.D., Shiba T., Kotani S., Wirtz R.A. & Hockmeyer W.T. (1986) Effectiveness of liposomes as potential carriers of vaccines: applications to cholera toxin and human malaria sporozoite antigen. *Vaccine.* **4**: 166-172.

Alving C.R. (1989) Liposomes as carriers of vaccines. Dans: *Progress in vaccinology* (G.P.Talwar, Ed.). Springer-Verlag New-York, Inc. Pages 429-437.

Ashwell J.D. (1988) Are B lymphocytes the principal antigen-presenting cells in vivo? *J. of Immunol.* **140**: 3697-3700.

Bakouche O., Brown D.C. & Lachman L.B. (1987) Liposomes expressing IL-1 biological activity. *J. Immunol.* **138**: 4256-4262.

Bakouche O. & Lachman L.B. (1990) Antigen presentation by liposome bearing class II MHC and membrane IL-1. *Yale J. Biol. and Med.* **63**: 95-107.

Barbet J., Machy P. & Leserman L.D. (1982) Synthèse de dipalmitoyl phosphatidyl éthanolamine 3-(2-pyridyldithio)propionate et couplage covalent des protéines aux liposomes. Dans: *Méthodologie des liposomes* (L.D.Leserman et J.Barbet, Eds.) INSERM, Paris. Pages 141-146.

Bartlett G.R. Phosphorus assay in column chromatography. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**: 466-468.

Bastide J.M. *Immunologie générale*. Medsi / Mc Graw-Hill, Healthcare group. Paris, 1989.

Boom W.H., Liano D. & Abbas A.K. (1988) Heterogeneity of helper / inducer T lymphocytes. II. Effects of IL4- and IL2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **167**: 1350-1363.

Bossie A. & Vitetta E.S. (1991) IFN $\gamma$  enhances secretion of IgG2a from IgG2a- committed LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN $\gamma$  in class switching. *Cell. Immunol.* **135**: 95-104.

Brodsky F.M. & Guagliardi L.E. (1991) The cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol.* **9**: 707-744.



Brown J.H., Jardetsky T., Saper M.A., Samraoui B., Bjorkman P.J. & Wiley D.C. (1988) A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* **332**: 845.

Carlsson J., Drevin H. & Axén R. (1978) Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation: N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.* **173**: 723-737.

Casten L.A. & Pierce S.K. (1988) Receptor-mediated B cell antigen processing. Increased antigenicity of a globular protein covalently coupled to antibodies specific for B cell surface structures. *J. Immunol.* **140**: 404-410.

Chang T-L., Shea C.M., Urioste S., Thompson R.C., Boom W.H. & Abbas A.K. (1990) Heterogeneity of helper / inducer T lymphocytes. III. Responses of IL4- and IL2-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells. *J. Immunol.* **145**: 2803-2808.

Chesnut R.W., Colon S.M. & Grey H.M. (1982) Antigen presentation by normal B cell tumors and macrophages: functional and biochemical comparison. *J. Immunol.* **128**: 1764-1768.

Chesnut R.W. & Grey H.M. (1985) Antigen-presenting cells and mechanisms of antigen presentation. *CRC Crit. Rev. Immunol.* **5**: 263-316.

Claassen E., Kors N. & Van Rooijen N. (1987) Immunomodulation with liposomes: the immune response elicited by liposomes with entrapped dichloro-methylene-diphosphate and surface associated antigen or hapten. *Immunol.* **60**: 509-515.

Croft M. & Swain S.L. (1991) B cell response to T helper cell subsets. II. Both the stage of T cell differentiation and the cytokines secreted determine the extend and nature of helper activity. *J. Immunol.* **147**: 3679-3689.

Cunningham A.J. (1973) Antibody formation studied at the single cell level. *Program in allergy.* **17**: 5-50.

Cunningham A.J. & Szenberg A. (1968) Further improvments in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunol.* **14**: 599-601.

Dal Monte P. & Szoka F.Jr. (1989) Effect of liposome encapsulation on antigen presentation in vitro. Comparison of presentation by peritoneal macrophages and B cell tumors. *J. Immunol.* **142**: 1437-1443.

Davis D., Davies A. & Gregoriadis G. (1986/87) Liposomes as adjuvants with immunopurified tetanus toxoid: the immune response. *Immunol. Letters* **14**: 341-348.

Davis D. & Gregoriadis G. (1987) Liposomes as adjuvants with immunopurified tetanus toxoid: influence of liposomal characteristics. *Immunol.* **61**: 229-234.

Donermeyer D.L. & Allen P.M. (1989) Binding to Ia protects an immunogenic peptide from proteolytic degradation. *J. Immunol.* **140**: 1063-1068.

Engvall E. (1980) Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Methods in Enzymol.* **70**: 419-439.

Eugui E.M. & Almquist S.J. (1990) Antibodies against membrane interleukin 1 $\alpha$  activate accessory cells to stimulate proliferation of T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 1305-1309.

Finkelman F.D., Holmes J., Katona I.M., Urban J.F., Beckmann M.P., Park L.S., Schooley K.A., Coffman R.L., Mosmann T.R. & Paul W.E. (1990) Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.* **8**: 303-333.

Fiske C.H. & SubbaRow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 375.

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

Gajewski T.F., Pinnas M., Wong T. & Fitch F.W. (1991) Murine Th1 and Th2 clones proliferate in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J. Immunol.* **146**: 1750-1758.

Garvey J.S., Cremer N.E. & Sussdorf D.H. (1977) <sup>125</sup>I or <sup>131</sup>I-labeled proteins. Dans: *Methods in Immunol.* p.171-182. The Benjamin /Cummings Publishing Comp., Mass.

Gosselin E.J., Tony H.P. & Parker D.C. (1988) Characterization of antigen processing and presentation by resting B lymphocytes. *J. Immunol.* **140**: 1408-1413.

Gregoriadis G. (1978) Liposomes in therapeutic and preventive medicine: the development of the drug-carrier concept. *Annals New-York Acad. Sci.* 343-362.

Gregoriadis G., Davis D. & Davies A. (1987) Liposomes as immunological adjuvants: antigen incorporation studies. *Vaccine* **5**:145-151.

Grun J.L. & Maurer P.H. (1989) Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous IL-1 in proliferative responses. *Cell. Immunol.* **121**: 134-145.

Harding C.V., Collins D.S., Slot J.W., Geuze H.J. & Unanue E.R. (1991) Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented to T cells. *Cell* **64**: 393-401.

Hodgkin P.D., Yamashita L.C., Seymour B., Coffman R.L. & Kehry M.R. (1991) Membranes from both Th1 and Th2 T cell clones stimulate B cell proliferation and prepare B cells for lymphokine-induced differentiation to secrete Ig. *J. Immunol.* **147**: 3696-3702.

Jerne N.K., Henry C., Nordin A.A., Fuji H., Koros A. & Lefkovits I. (1974) Plaque forming cell : methodology and theory. *Transplant. Rev.* **18**: 130-191.

Lanzavecchia A. (1990) Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* **8**: 773-793.

Lefkovits I. & Cosenza H. (1979) Assay for plaque-forming cells. Dans: *Immunological Methods* (Eds. Lefkovits & Pernis), Academic Press, New-York. p.277-285.

Leserman L.D., Barbet J., Kourilsky F. & Weinstein J.N. (1980) Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature (London)* **288**: 602-604.

Leserman L.D., Machy P. & Barbet J. (1984) Covalent coupling of monoclonal antibodies and protein A to liposomes: specific interaction with cells in vitro and in vivo. Dans: *Liposome Technology :Targeted drug delivery and biological interaction* (G. Gregoriadis), CRC Press, Inc., Vol.III: 29-40.

Leserman L.D. (1987) All in the superfamily: presentation of antigen receptors in the context of the MHC. *Annal. Inst. Pasteur / Immunol.* **138**: 53-63.

Machy P. & Leserman L. (1987) Composition, propriétés et préparation des liposomes. Dans: *Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie* (Machy & Leserman, Eds), INSERM / John Libbey Eurotext Ltd. p: 4.

Markwell M.A. & Fox F. (1978) Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenyl glycoluril. *Biochem.* **17**: 4807-4817.

McKearn J.P., Paslay J.W., Slack J., Baum C. & Davie J.M. (1982) B cell subsets and differential responses to mitogens. *Immunol. Reviews* **64**: 5-23.

Milsman M.H.W., Schwendener R.A., & Weder H.-G (1978) The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis. *Biochim. Biophys. Acta* **512**: 147-155.

Mimms L.T., Zampighi G., Nozaki Y., Tanford C. & Reynolds J.A. (1981) Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochem.* **20**: 833-840.

Mosmann T.R. & Coffman R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* **7**: 145-173.

Mosmann T.R., Schumacher J.H., Fiorentino D.F., Leverah J.A., Moore K.W. & Bond M.W. (1990) Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitor factor, by using a solid radioimmunoassay. *J. Immunol.* **145**: 2938-2945.

Oth D., Mercier G., Perrin P., Foffret M.L., Sureau P. & Thibodeau L. (1987) The association of the rabies glycoprotein with liposome (immunosome) induces an in vitro specific release of IL-2. *Cell. Immunol.* **108**: 220-226.

Powers G.D., Abbas A.K. & Miller R.A. (1988) Frequencies of IL-2 and IL-4 secreting T cells in naive and antigen-stimulated lymphocyte populations. *J. Immunol.* **140**: 3352-3357.

Roof R.W., Luescher I. & Unanue E.R. (1990) Phospholipids enhance the binding of peptides to class II CMH molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1735-1739.

Roosnek E., Demotz S., Corradin G. & Lanzavecchia A. (1988) Kinetics of MHC-antigen complex formation on antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **140**: 4079-4082.

Rothermel A.L., Gilbert K.M. & Weigle W.O. (1991) Differential abilities of Th1 and Th2 to induce polyclonal B cell proliferation. *Cell. Immunol.* **135**: 1-15.

Salacinsky P.R.P., McLean C., Sykes J.E.C., Clement-Jones V.V. & Lowry P.J. (1981) . *Anal. Biochem.* **117**: 136-146.

Sanders V.M., Fernandez-Botran R., Uhr J.W. & Vitetta E.S. (1987) IL-4 enhances the ability of antigen-specific B cells to form conjugates with T cells. *J. Immunol.* **139**: 2349-2354.

Schwendener R.A., Asanger M. & Weder H.G. (1981) *n*-Alkyl-glucosides as detergents for the preparation of highly homogeneous bilayer liposomes of variable sizes (60 - 240 nm diameter) applying defined rates of detergent removal by dialysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **100**: 1055-1062.

Sedgwick J.D. & Holt P.G. (1986) The ELISA-plaque assay for the detection and numeration of antibody secretion cells. *J. Immunol. Meth.* **87**:37-44.

Sette A., Adorini L., Colon S.M., Buus S. & Grey H.M. (1989) Capacity of intact proteins to bind to CMH class II proteins. *J. Immunol.* **143**: 1265-1267.

Shahum É & Thérien H.-M (1988) Immunopotential of the humoral response by liposomes : encapsulation versus covalent linkage. *Immunol.* **65**: 315-317.

Shahum É & Thérien H.-M (1989) Comparative effect on humoral response of four different proteins covalently linked on BSA-containing liposomes. *Cell. Immunol.* **123** : 36-43.

Shek P.N. & Sabiston B.H. (1981) Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. I. Potentiation of the plaque-forming cell response. *Immunol.* **45**: 349-355.

Shek P.N. & Sabiston B.H. (1982) Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. II. Comparison of the effectiveness of vesicle-entrapped and surface-associated antigen in immunopotential. *Immunol.* **47**: 627-632.

Shek P.N. & Heath T.D. (1983) Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. III. Immunogenicity of bovine serum albumin covalently coupled to vesicle surface. *Immunol.* **50**: 101-106.

Singer D.F. & Linderman J.J. (1990) The relationship between antigen concentration, antigen internalization, and antigenic complexes: modeling insights into antigen processing and presentation. *J. Cell Biol.* **111**: 55-68.

Snapper C.M. & William P.E. (1987) IFN $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**: 944-947.

Snow E.C. & Noelle R.J. (1987) Thymus-dependent antigenic stimulation of hapten-specific B lymphocytes. *Immunol. Reviews* **99**: 173-192.

Snyder S.L. & Vannier W.E. (1984) Immunologic response to protein immobilized on the surface of liposomes via covalent azo-bonding. *Biochim. Biophys. Acta* **772**: 288-294.



Snyder S.L. & Vannier W.E. (1988) Antibody responses to liposomes-associated antigen. *Immunol. Letters*, **19**, 59-64.

Starch M.J. & Lohmann-Matthes M.L. (1984) A new and rapid method for immunoglobulin class and subclass determination of mouse monoclonal antibodies using a solid-phase immunoradiometric assay. *J. Immunol. Meth.* **68**: 305-309.

Stockinger B., Pessara U., Lin R.H., Habicht J., Grez M. & Koch N. (1989) A role of Ia-associated invariant chains in antigen processing and presentation. *Cell* **56**: 683-689.

Street N.E., Schumacher J.H., Fong T.A.T., Bass H., Fiorentino D.F., Leverah J.A. & Mosmann T.R. (1990) Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* **144**: 1629-1639.

Street N.E. & Mosmann T.R. (1991) Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *The FASEB Journal* **5**: 171-177.

Su D. & Van Rooijen N. (1989) The role of macrophages in the immunoadjuvant action of liposomes: effects of elimination of splenic macrophages on the immune response against intravenously injected liposome-associated albumin antigen. *Immunol.* **66**: 466-470.

Swain S.L., McKenzie D.T., Weinberg A.D. & Hancock W. (1988) Characterization of T helper 1 and 2 cell subsets in normal mice. Helper T cells responsible for IL-4 and IL-5 production are present as precursors that

require priming before they develop into lymphokine-secreting cells. *J. Immunol.* **141**: 3445-3455.

Thérien H.-M., Lair D. & Shahum E. (1990) Liposomal vaccine: influence of antigen association on the kinetics of the humoral response. *Vaccine* **8**: 558-562, 1990.

Thérien H.-M. & Gruda J. (1990) Pleiotropic effects of positively charged liposomes on immune functions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **26** : 511-514.

Thérien H.-M., Shahum E. & Fortin A. (1991) Liposome adjuvanticity: Influence of dose and protein:lipid ratio on the humoral response to encapsulated and surface-linked antigen. *Cell. Immunol.* **136**: 402-413.

Vannier W.E. & Snyder S.L. (1988) Antibody responses to liposome-associated antigen. *Immunol. Letters* **19**: 59-63.

Van Rooijen N. & Van Nieuwmegen R. (1980) Liposomes in immunology: evidence that their adjuvant effect results from surface exposition of the antigens. *Cell. Immunol.* **49**: 402-407.

Van Rooijen N., Van Nieuwmegen R. & Kors N. (1981) The secondary immune response against liposome associated antigens. *Immunol. Communications* **10**: 59-70.

Van Rooijen N. & Van Nieuwmegen R. (1983) Association of an albumin antigen with phosphatidylcholine liposomes alters the nature of immunoglobulins produced during the immune response against the antigen. *Biochim. Biophys. Acta* **755**: 434-438.

Van Rooijen N. & Donghui Su (1989) Immunoadjuvant action of liposomes: mechanisms. Dans: *Immunol. adjuvants and vaccines* (G. Gregoriadis, Ed.), Plenum Publ. Comp. N.-Y. Pages:159-170.

Van Rooijen N. (1990) Liposomes as carrier and immunoadjuvant of vaccine antigens. Dans: *Advances in Biotechnol. Processes* (A.Mizrahi, Ed.), Alan R.Liss, Inc. Vol.13: "Bacterial vaccines": 255-279.

Verma J.N., Wassef N.M., Wirtz R.A., Atkinson C.T., Aikawa M., Loomis L.D. & Alving C.R. (1991) Phagocytosis of liposomes by macrophages: intracellular fate of liposomal malaria antigen. *Biochim. Biophys. Acta.* **1066**: 229-238.

Vitetta E.S., Bossie A., Fernandez-Botran R., Myers C.D., Oliver K.G., Sanders V.M. & Stevens T.L. (1987) Interaction and activation of antigen-specific T and B cells. *Immunol. Reviews* **99**: 193-239.

Walden P., Nagy Z.A. & Klein J. (1986) Antigen presentation by liposomes: inhibition with antibodies. *Eur. J. Immunol.* **16**: 717-720.

Watson J., Aarden L.A. & Lefkovits I. (1979) The purification and quantitation of helper T cell-replacing factors secreted by murine spleen cells activated by Concanavalin A. *J. Immunol.* **122**: 209-215.

Zigterman G.J.W.J., Verheul A.F.M., Ernste E.B.H.W., Rombouts R.F.M., De Reuver, Jansze M., Snippe H. & Willers J.M.N. (1988) Measurement of the humoral immune response against *Streptococcus Pneumoniae* type 3 capsular polysaccharide and oligosaccharide containing antigens by ELISA and ELISPOT techniques. *J. Immunol. Meth.* **106**: 101-107.

Zumbuehl O. & Weder H.G. (1981) Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid / detergent mixed micelles. *Biochim. Biophys. Acta.* **640**: 252-262.