



HAL
open science

Etude de la propriété adjuvante de la protéine Tat du VIH-1 et utilisation de sa capacité à lier les héparanes sulfates pour évaluer le rôle de cibles ubiquitaires dans les mécanismes de présentation antigénique : Implications dans l'immunogénicité de protéines et applications potentielles en vaccination

Adeline Gadzinski

► **To cite this version:**

Adeline Gadzinski. Etude de la propriété adjuvante de la protéine Tat du VIH-1 et utilisation de sa capacité à lier les héparanes sulfates pour évaluer le rôle de cibles ubiquitaires dans les mécanismes de présentation antigénique : Implications dans l'immunogénicité de protéines et applications potentielles en vaccination. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : . tel-00711758

HAL Id: tel-00711758

<https://theses.hal.science/tel-00711758>

Submitted on 25 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : Immunologie

ANNÉE 2010 - 2011

SÉRIE DOCTORAT N°

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 25/05/2011

par

Adeline GADZINSKI

**Étude de la propriété adjuvante de la protéine Tat du VIH-1 et utilisation de sa capacité à lier les héparanes sulfates pour évaluer le rôle de cibles ubiquitaires dans les mécanismes de présentation antigénique:
Implications dans l'immunogénicité de protéines et applications potentielles en vaccination**

Directeur de thèse : Dr Michel LEONETTI

Composition du jury :

Président du jury : Pr Pierre Galanaud

Rapporteurs : Dr Yves Delneste

Dr Jean-Luc Teillaud

Examineurs : Dr Sebastian Amigorena

Dr Christophe Guillon

« D'abord magique, puis empirique, finalement expérimentale et aujourd'hui moléculaire, la médecine est le fruit d'une très longue évolution, parallèle à celle de l'humanité. »

Claude Chastel

Une petite histoire de la médecine

Ellipses, Edition Marketing, 2004

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Michel Léonetti, mon directeur de thèse, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, de m'avoir fait confiance, de m'avoir encouragée et aiguillée tout au long de ma thèse. Michel, merci mille fois pour ta disponibilité. J'ai énormément appris grâce à ton expérience et ta grande rigueur. Merci d'avoir fait apparaître des petits produits bien utiles du fond de tes congélateurs pour me permettre de tester mes nombreuses hypothèses révolutionnaires, ou non.

Je tiens à remercier le Docteur Christophe Créminon, chef du Service de Pharmacologie et d'immunoanalyse, et le Docteur Frédéric Ducancel, chef du laboratoire d'ingénierie des anticorps pour la santé de m'avoir permis de terminer ma thèse dans de bonnes conditions grâce à l'obtention d'une prolongation de mon financement. Merci également à tous les deux pour votre grande gentillesse et votre disponibilité au cours de ma thèse.

Aux membres du jury

J'adresse mes remerciements au Docteur Yves Delneste et au Docteur Jean-Luc Teillaud pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier le Docteur Sebastian Amigorena, le Docteur Christophe Guillon ainsi que le Professeur Pierre Galanaud de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury

A mes collègues

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux aux membres du LIAS, grâce auxquels je me suis vraiment épanouie au cours de ces trois ans et demi de thèse, et qui me manqueront beaucoup. Un merci particulier à mon collègue Yves Terrat, qui est un saint homme, Alexandra Savatier, Guillaume L'Hostis, Bruno Muller, et Sabrina Turbant qui sont devenus de véritables amis. Merci à Jean-Claude Boulain, mémoire du laboratoire, et mémoire immunologique, qui m'a patiemment initié à l'art difficile de la biologie moléculaire.

Un très grand merci au Docteur Stéphanie Delluc pour la relecture minutieuse de ce manuscrit. Merci Steph pour ton soutien et ton optimisme sans faille.

Je remercie le Docteur Hervé Bernard, qui m'a enseigné la spectrométrie de masse, et pas moins d'une dizaine d'expressions oubliées de la langue française. Merci Hervé pour ton soutien technique, logistique et moral qui m'ont été très précieux à différents moments de ma thèse.

Merci également au Docteur Loïc Martin, mon chimiste de référence, pour sa grande gentillesse et sa disponibilité

Une pensée très particulière pour mon amie Aurore Besse. En mémoire de tout ce que nous avons partagé lorsque nous étions collègues de bâtiment...

Enfin, un merci collectif à tous mes collègues du SPI et du SIMOPRO, Julie, Bertrand, Fabienne, Anne, Céline, Florence, Greg, Toufik, Olivier, Gilles, ainsi qu'à mes amis de la promotion Irtelis 2007, Agnès, Julia, Arhamatoulaye, Arezki, Arounie, qui ont tous contribué à jalonner cette thèse de moments sympathiques.

A ma famille et à mes amis

Je les remercie de tout mon cœur pour leur soutien indéfectible dans cette longue aventure. Je remercie également mon compagnon, ma folle moitié, mon catalyseur. Merci d'être tout cela, et bien plus encore.

Pardon de vous avoir souvent fait « perdre la boule » avec mes doutes existentiels et ma gestion du temps très... optimisée...

Enfin, j'ai une pensée pour toutes les petites souris qui ont participé bien malgré elles à ces travaux de thèse. Sans elles, rien de tout ceci n'aurait été possible.

Table des matières

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 LA VACCINATION D’HIER A AUJOURD’HUI	5
1. La variolisation : première mesure d’immunoprophylaxie de l’histoire.....	5
2. Edward Jenner et l’introduction du vaccin antivariolique.....	7
3. Louis Pasteur et le principe de l’atténuation de la virulence.....	10
4. Les vaccins inactivés.....	11
5. La culture cellulaire ouvre le champ de la vaccinologie aux virus.....	11
6. Les vaccins sous-unitaires.....	12
7. Le panel de vaccins disponibles.....	12
CHAPITRE 2 LES MECANISMES DE LA PROTECTION VACCINALE	14
1. Les effecteurs de la réponse vaccinale.....	14
1.1. Les lymphocytes T CD4 ⁺	14
1.2. Les anticorps.....	15
1.3. Les lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques (CTL).....	17
2. Les vaccins et leurs effecteurs.....	18
3. Les cellules mémoire.....	20
3.1. Caractéristiques des cellules mémoire.....	20
3.2. Mémoire B et protection vaccinale.....	21
CHAPITRE 3 SUCCES, LIMITES ET PERSPECTIVES DES VACCINS	22
1. Les vaccins ont contribué de façon remarquable à l’amélioration de la qualité de vie.....	22
2. ...mais ils présentent des limites.....	24
3. ...et de nouvelles approches sont nécessaires pour étendre leur champ d’action et améliorer leurs performances.....	26

CHAPITRE 4 SECURITE VERSUS IMMUNOGENICITE : LE « DILEMME VACCINAL » 29

CHAPITRE 5 L'INDUCTION DES REPONSES VACCINALES 33

1. Les réponses cellulaires T	33
1.1. Les voies de présentation de l'Ag	33
1.1.1. La présentation de l'Ag par les molécules CMH II	33
a) <i>Capture des Ag</i>	33
b) <i>Génération des peptides antigéniques</i>	34
c) <i>Assemblage des complexes CMH II-peptide</i>	34
d) <i>Régulation de la capture, de l'apprêtement et de la présentation de l'Ag dans les DC</i>	37
1.1.2. La présentation de l'Ag par les molécules CMH I.....	37
a) <i>La présentation CMH I classique</i>	37
(1) <i>Génération des peptides antigéniques</i>	37
(2) <i>Transport des peptides et assemblage des complexes CMH I/ peptide dans le réticulum endoplasmique</i>	38
b) <i>La présentation croisée</i>	40
1.2. Les mécanismes d'activation des cellules T.....	43
1.2.1. Le dialogue T-DC.....	43
1.2.2. Les étapes moléculaires de l'activation des cellules T.....	44
1.2.3. Après activation des cellules T : instruction et orientation	46
a) <i>L'acquisition des marqueurs d'adressage vers les tissus cible</i>	46
b) <i>Les mécanismes de polarisation des cellules T</i>	46
1.2.4. Les cellules mémoire.....	48
2. Les réponses anticorps	49
2.1. Cinétique de la réponse anticorps vaccinale	49
2.1.1. La réponse anticorps primaire	50
a) <i>Les réponses T dépendantes contre les Ag protéiques</i>	50

(1) <i>La réaction extra-folliculaire</i>	50
(2) <i>La réaction du centre germinatif (CG)</i>	51
(3) <i>Devenir des plasmocytes et des lymphocytes B mémoire</i>	52
b) <i>Les réponses T indépendantes contre les polysaccharides</i>	53
2.1.2. La réponse anticorps secondaire	54

CHAPITRE 6 LES STRATEGIES POUR AMELIORER L'IMMUNOGENICITE DES VACCINS SOUS-UNITAIRES **56**

1. L'administration des Ag grâce à des micro-organismes vivants hétérologues : la vectorisation des Ag	56
2. La production de protéines recombinantes aussi immunogènes que des agents pathogènes vivants	58
2.1. Prolonger la persistance de l'Ag	61
2.2. Conférer à l'Ag une nature particulière, et/ou des structures répétitives	62
2.3. Délivrer l'Ag dans un contexte inflammatoire	63
2.4. Cibler l'Ag à la surface des CPA	64

CHAPITRE 7 LA PROTEINE TAT DU VIH-1 : UN OUTIL POTENTIEL EN VACCINATION..... **68**

1. Tat : transactivateur transcriptionnel du virus de l'immunodéficience humaine . . .	68
2. . . . et tellement plus encore	69
3. Structure et Organisation de la protéine Tat	73
4. Tat : outil potentiel pour la vaccination	74
4.1. Nouvel adjuvant ?	74
4.2. Outil de ciblage cellulaire	76

RESULTATS **79**

CHAPITRE 1 CARACTERISATION ET TRANSFERT DE LA PROPRIETE AUTOADJUVANTE DE LA PROTEINE TAT A DES ANTIGENES HETEROLOGUES **81**

1. Introduction	81
--------------------------	----

2. Objectifs de l'étude	81
3. Résultats	82
4. Discussion et perspectives.....	110

CHAPITRE 2 UTILISATION DE LA PROTEINE TAT COMME OUTIL POUR ETUDIER L'INFLUENCE DES HEPARANES SULFATE SUR LA PRESENTATION ANTIGENIQUE 118

1. Objectifs de l'étude et rappels sur les héparanes sulfates (HS).....	118
2. Résultats	121
2.1. Modulation de la présentation de l'Ag restreinte au CMH II grâce au ciblage des HS	121
2.2. Modulation de la présentation de l'Ag restreinte au CMH I grâce au ciblage des HS	135
2.3. Applications vaccinales du ciblage simultané des HS et des récepteurs spécifiques de CPA par les Ag	141
3. Discussion et perspectives.....	142

PROCEDURES EXPERIMENTALES..... 148

1. Synthèse et purification des protéines et des peptides.	150
2. Immunisation des souris.....	150
3. Mesure des réponses immunitaires chez les animaux immunisés.....	151
3.1. Mesure des réponses anticorps par ELISA	151
3.2. Analyse des réponses T par ELISPOT	151
4. Tests de liaison de Tat et de ses dérivés aux cellules.....	152
5. Tests de présentation antigénique	153
5.1. Présentation restreinte au CMH II.....	153
5.1. Présentation croisée.....	154
6. Test de maturation des DC	154

BIBLIOGRAPHIE 156

Table des illustrations

Figure 1 Chronologie des vaccins	6
Figure 2 Aspect des lésions locales 14 jours après variolisation ou vaccination.	8
Figure 3 La vaccination de bras à bras	9
Figure 4 Nombre de morts par variole par million d'habitants entre 1722 et 1843 et nombre de nouveau-nés vaccinés entre 1820 et 1843 en Suède	9
Figure 5 Les fonctions effectrices des anticorps	16
Figure 6 Incidence des maladies et couverture vaccinale mondiale	23
Figure 7 Espérance de vie féminine nationale la plus élevée observée à un moment donné dans le monde (1750-2005).....	23
Figure 8 Probabilité de succès des vaccins en fonction du type de réponses nécessaires à la protection et de la variabilité antigénique des pathogènes ciblés.....	25
Figure 9 Nouvelles approches pour le développement des vaccins	27
Figure 10 Profil de sécurité et d'immunogénicité des différents types de vaccins.....	30
Figure 11 Apprêtement et présentation des Ag sur les molécules CMH-II	36
Figure 12 Apprêtement et présentation des Ag endogènes sur les molécules CMH-I.....	39
Figure 13 Apprêtement et présentation des Ag exogènes sur les molécules CMH-I : la « présentation croisée »	42
Figure 14 Vue générale de la synapse immunologique mature.....	45
Figure 15 Les sous types de cellules T auxiliaires effectrices et régulatrices	47
Figure 16 Les phases de la réponse anticorps vaccinale	49
Figure 17 Réponses extra folliculaire et de centre germinatif aux Ag protéiques	52
Figure 18 Les étapes clés de l'induction des réponses vaccinales et leur modulation par les propriétés des Ag et de leur environnement	59
Figure 19 Les populations de DC humaines et leurs marqueurs de surface.....	65
Figure 20 Principe de la modulation de l'induction des réponses vaccinales grâce au ciblage spécifique des DC.....	66
Figure 21 Mécanisme de la transactivation transcriptionnelle médiée par Tat.....	69
Figure 22 Organisation de la protéine Tat.....	73
Figure 23 Mécanisme hypothétique de l'effet autoadjuvant de Tat	114
Figure 24 Structure des héparanes sulfates	120
Figure 25 Les HSPG membranaires	120
Figure 26 Fonctions des HSPG cellulaires.....	120

Figure 27 Capacité de liaison de l'héparine et des HS de ZZDTR-BD	132
Figure 28 Capacité T-stimulante de ZZDTR-BD	133
Figure 29 Capacité T-stimulante de ZZDTR-BD préalablement complexé à des anticorps spécifiques de marqueurs exprimés à la surface de CPA.....	134
Figure 30 Présentation croisée d'Ag couplés ou non à un fragment capable de lier les HS sous forme libre ou sous forme de complexes immuns.....	136
Figure 31 Liaison de complexes immuns contenant ou non un fragment capable de lier les HS sur différents types cellulaires.....	138
Figure 32 Maturation des cellules JawsII en réponse à l'exposition à des Ag couplés ou non à un fragment capable de lier les HS.....	140
Figure 33 Distribution du complexe anti-CMH II/ZZDTR-BD au sein des splénocytes de souris	141

Liste des tableaux

Tableau 1 Les maladies évitables par la vaccination	13
Tableau 2 Corrélat de protection des vaccins homologués.....	19
Tableau 3 Systèmes de stimulation des TLR actuellement en développement.....	64
Tableau 4 Nombre d'interférences décrites dans la littérature pour les protéines du VIH-1 ...	71

Abréviations

Ac	Anticorps
ADCC	Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ag	Antigène
β2m	Beta 2 microglobuline
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CD	Clusters of Differentiation
CDC	Cytotoxicité dépendante du complément
CG	Centre germinatif
CLIP	Class II associated invariant chain peptides
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CPP	Cell penetrating peptide
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DC	Dendritic cells
FasL	Fas ligand
Fc	Fragment constant des immunoglobulines
FDC	Follicular dendritic cells
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA	Human leukocyte antigens
Hib	Haemophilus influenza type b
HPLC	High performance liquid Chromatography
HS	Héparanes sulfate
Hsp	Heat shock protein
HSPG	Héparanes sulfate protéoglycanes
IFA	Adjuvant incomplet de Freund
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
intDC	DC interstitielles

kDa	KiloDalton
LT	Lymphocytes T
LB	Lymphocytes B
LPS	Lipopolysaccharide
mDC	DC myeloïdes
Mφ	Macrophages
MPL	Monophosphoryl lipide A
NK	Natural Killer
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
pDC	DC plasmacytoïde
PG	Protéoglycanes
PRR	Pattern-recognition receptor
PS	Polysaccharide
PTD	Protein transduction domain
RE	Reticulum Endoplasmique
TAP	Transporter associated protein
TAR	Trans-activation responsive region
Tat	Transactivator of transcription
TCR	Récepteur des cellules T
TFA	Acide trifluoroacétique
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
Th	T helper
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Lymphocyte T régulateur

Introduction

Les principes qui régissent la conception des vaccins ont été établis par Louis Pasteur. Ils consistent à identifier, isoler, puis atténuer ou inactiver les agents causals des maladies infectieuses. Ces règles ont été suivies pendant un siècle et ont permis l'émergence de nombreux vaccins qui sont devenus des outils puissants pour lutter contre les maladies infectieuses. Selon certains auteurs, les vaccins auraient eu, avec le développement de l'accès à l'eau potable, l'impact positif sur la santé publique le plus important de l'histoire (Rappuoli, 2007).

Les vaccins dont nous disposons actuellement permettent de protéger l'organisme contre des pathogènes non persistants, grâce à l'induction de réponses humorales. Malheureusement, cette approche présente des limites et s'avère insuffisante pour se prémunir des pathogènes persistants, qui semblent moins sensibles à l'action des anticorps et dont l'élimination nécessite en outre l'action d'autres effecteurs du système immunitaire, comme les cellules T cytotoxiques (CTL). Afin de lever cet obstacle, la vaccinologie tend à se rationaliser davantage, s'appuyant sur l'étude de plus en plus fine des relations hôte-pathogène et des mécanismes d'induction des réponses immunitaires pour faire émerger de nouvelles approches (Germain, 2010).

Une autre limite des vaccins traditionnels constitués de pathogènes vivants ou inactivés est liée à leur sécurité. Les substances d'origine microbienne qu'ils renferment peuvent en effet être la cause d'effets secondaires, et les bactéries ou virus atténués peuvent présenter un certain degré de virulence et donner lieu à des infections disséminées, en particulier chez les personnes immunodéprimées. Devant la demande sociétale de plus en plus pressante de produits plus sûrs, de nouveaux vaccins de ce type seront difficilement acceptés par les autorités de santé pour un usage chez l'humain. De plus, certains vaccins actuels devront être remplacés par de nouveaux vaccins plus sûrs (Davey, 2009).

Afin de répondre à cette problématique, et grâce aux progrès technologiques réalisés en matière d'identification et de production des cibles vaccinales, la recherche se tourne de plus en plus vers les vaccins dits « sous-unitaires ». La composition de ces vaccins est bien définie, et comprend uniquement des fractions antigéniques (protéines, et/ou polysaccharides bactériens) purifiées à partir de pathogènes ou produites par génie génétique. Ces vaccins doivent être associés à des adjuvants car l'immunogénicité des protéines et polysaccharides est généralement intrinsèquement faible. Malheureusement, peu d'adjuvants sont actuellement disponibles en vaccination humaine, et leur efficacité peut être limitée, comme en témoigne la

nécessité de recourir à plusieurs injections couplées ou non à des rappels pour garantir l'efficacité des vaccins sous unitaires. De plus, ces vaccins de nouvelle génération, comme leurs homologues traditionnels, induisent des réponses anticorps, mais restent encore peu efficaces pour induire des réponses immunitaires cytotoxiques. Ces lacunes sont des freins majeurs au développement de nouveaux vaccins. Un des grands enjeux de la recherche vaccinale est donc de maximiser l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires. Beaucoup de voies de recherche sont explorées pour y parvenir. L'un des axes majeur vise à moduler à la fois l'intensité et la polarisation des réponses vaccinales en manipulant les antigènes (Ag) eux-mêmes ou en modifiant leur formulation. De nouveaux adjuvants et des approches d'ingénierie permettent par exemple d'associer aux Ag toutes sortes de ligands qui permettent d'activer des signaux inflammatoires, de cibler spécifiquement les Ag vers les cellules présentatrices de l'Ag (CPA) ou encore qui favorisent la présentation croisée (Brooks et al., 2010).

Au laboratoire, une protéine d'origine virale présentant des caractéristiques immunologiques particulières a été étudiée : le transactivateur transcriptionnel (Tat) du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-). Il a été découvert que Tat est capable de déclencher des réponses anticorps en absence d'adjuvant chez la souris (Kittiworakarn et al., 2006). Cette protéine est également capable de lier les héparanes sulfate (HS) exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules, ce qui lui permet de se lier à un grand nombre de types cellulaires (Rusnati et al., 1997b ; Rusnati et al., 1998). Ces deux propriétés pourraient faire de Tat un outil d'étude pour améliorer l'immunogénicité des vaccins, en particulier si ces activités peuvent être transférées à des Ag d'intérêt. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été de caractériser de manière approfondie la propriété adjuvante de Tat, ainsi que ses propriétés de liaison aux cellules, et d'évaluer dans un second temps la possibilité de transférer ces propriétés à d'autres Ag.

Au cours de la première partie de ma thèse, j'ai approfondi l'étude de la propriété autoadjuvante de Tat. J'ai notamment montré que celle-ci dépend d'une réponse T présentant un profil Th2 et j'ai identifié le déterminant minimal responsable de l'effet. J'ai ensuite montré qu'il est possible de conférer à des Ag hétérologues la capacité de déclencher des réponses humorales en absence d'adjuvant en les couplant de manière covalente à ce déterminant. Ces travaux ont permis d'améliorer la connaissance du mode d'action d'une protéine autoadjuvante, et ont également permis de définir une approche innovante qui pourrait se substituer aux adjuvants conventionnels ou en potentialiser les effets.

Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai utilisé la région de Tat capable de lier les HS pour évaluer si un antigène (Ag) capable de lier les HS peut être plus ou moins efficacement pris en charge par les mécanismes de présentation aux cellules T. Pour cela, un Ag modèle a été couplé au domaine de liaison des HS de Tat. Ce couplage augmente la liaison à la surface des cellules de l'Ag libre ou sous forme de complexe immun. Malgré l'expression ubiquitaire des HS, le couplage de Tat perturbe peu le ciblage préférentiel des complexes immuns vers les cellules portant des récepteurs Fc *in vitro*. De plus, l'Ag, associé ou non à un anticorps spécifique, est mieux présenté à des cellules T auxiliaires par la voie restreinte aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) lorsqu'il est préalablement couplé au fragment de Tat capable de lier les HS. Enfin, un accroissement de la stimulation des cellules T cytotoxiques par la voie de présentation croisée restreinte aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) est aussi observé avec un complexe immun contenant un Ag couplé au même fragment de Tat. Ces travaux, qui démontrent l'intérêt de régions capables de lier les HS dans la présentation de l'Ag, ont permis de définir une approche originale permettant d'augmenter les caractéristiques T stimulantes qui pourrait s'avérer intéressante pour la conception de vaccins à base de protéines fortement immunogènes.

L'ensemble de mon travail a donné lieu aux brevets, publications et communications suivants :

Brevet

« Complexe moléculaire de ciblage des antigènes vers les cellules présentatrices d'antigène et ses applications pour la vaccination ».

Jean-Claude Boulain, **Adeline Gadzinski**, Michel Léonetti, Alexandra Savatier.

1^{er} Février 2010, Demande N° 10 00392

Publications

- “Cell surface heparan sulfate proteoglycans influence MHC class II restricted Ag presentation”
Michel Léonetti, **Adeline Gadzinski**, Gervaise Moine.
The Journal of Immunology, 2010, Oct 1; 185(7):3847-56
- “Oligomerization of HIV-1 Tat allows a mechanism of Th2-B collaboration to raise a humoral immune response in the absence of adjuvant”

Adeline Gadzinski, Delphine Matz, Michel Léonetti
soumis pour publication à The Journal of Immunology

Communications scientifiques

- “Elicitation of a humoral immune response towards non-immunogenic peptides using the HIV-1 transcriptional transactivator autoadjuvanticity determinant”.

Adeline Gadzinski, Emilie Favre, Sabrina Turbant, Michel Léonetti

Poster au 2nd congrès Européen d’immunologie 2009 à Berlin et au congrès AIDS vaccine 2009 à Paris

- “Cell surface heparan sulfate proteoglycans influence MHC class II restricted Ag presentation”

Michel Léonetti, Gervaise Moine, **Adeline Gadzinski**

Poster au congrès de la SFI, novembre 2010

Dans la première partie de ce manuscrit, consacrée à la description du contexte scientifique de cette étude, je retracerai tout d’abord l’histoire des vaccins, et nous verrons comment leur développement empirique original, qui a permis de remporter de grands succès, tend aujourd’hui vers une rationalisation et un lien de plus en plus fort avec l’immunologie fondamentale. Je décrirai les grands principes de la protection vaccinale et les mécanismes qui sous tendent son induction. J’évoquerai ensuite certaines des approches envisagées pour améliorer les vaccins. Enfin, nous verrons comment un outil d’origine microbienne, la protéine Tat du VIH-1, peut contribuer à l’étude de l’induction des réponses immunitaires, et pourrait également constituer un outil attractif pour améliorer l’immunogénicité des vaccins.

Chapitre 1 La vaccination d'hier à aujourd'hui

1. La variolisation : première mesure d'immunoprophylaxie de l'histoire

Certaines maladies graves ne se contractent pas à deux reprises. Ce précepte est connu depuis l'Antiquité, comme en attestent de nombreux témoignages. Thucydide, un historien athénien, écrit par exemple à propos de l'épidémie de peste qui a ravagé Athènes en 430 avant Jésus Christ: «Ceux qui en avaient réchappé n'avaient plus de craintes personnelles, car on n'était pas atteint une seconde fois de façon qui fut mortelle. Ils s'attachaient même plus ou moins à l'espoir frivole qu'à l'avenir non plus, une autre maladie ne pourrait davantage arriver à les terrasser». Devant la terreur qu'inspiraient les épidémies, des hommes ont tenté d'imiter la nature en provoquant de façon artificielle des formes atténuées de certaines maladies pour se protéger de leur forme mortelle. La première maladie importante traitée selon ce mode de prévention est la variole (Moulin, 1996). Également appelée petite vérole, la variole est une maladie infectieuse très contagieuse et épidémique, due à un poxvirus. Son taux de létalité variait de 20% à 60%, et elle touchait particulièrement les enfants, chez lesquels ce taux pouvait dépasser 80% (Riedel, 2005). Elle laissait les survivants grêlés de cicatrices défigurantes, mais protégés lors des épidémies ultérieures. La variole se contractait majoritairement par voie aérienne, mais également après exposition sur une lésion cutanée, un mode de contamination qui donnait lieu à une forme d'infection beaucoup moins sévère (Fenner, 1988). La connaissance de ces propriétés a dû amener les médecins à tenter d'administrer de manière préventive des préparations à base de pustules varioliques pour provoquer une forme atténuée de la maladie, et bénéficier de ses propriétés protectrices vis-à-vis de la forme sévère. Ce procédé, appelé variolisation, ou inoculation, constitue la première tentative de prévention des maladies infectieuses grâce à l'immunoprophylaxie (Paul, 2008).

L'origine de cette pratique est incertaine. On trouve les plus anciennes mentions concernant la variolisation dans des documents chinois datant du 17^e siècle, mais certains témoignages la font remonter au VI^e siècle de notre ère, en Chine, alors que d'autres avancent qu'elle était pratiquée depuis bien plus longtemps en Inde ou dans certaines tribus africaines. Cependant, la variolisation ne s'est diffusée massivement qu'à partir du 17^e siècle, au moment où la variole a connu une exacerbation de sa virulence (Moulin, 1996). La pratique s'est répandue progressivement le long de la route de la soie. Au début du 18^e siècle, elle était utilisée dans l'Empire Ottoman, puis elle a gagné l'Europe et le nouveau monde. Il semble

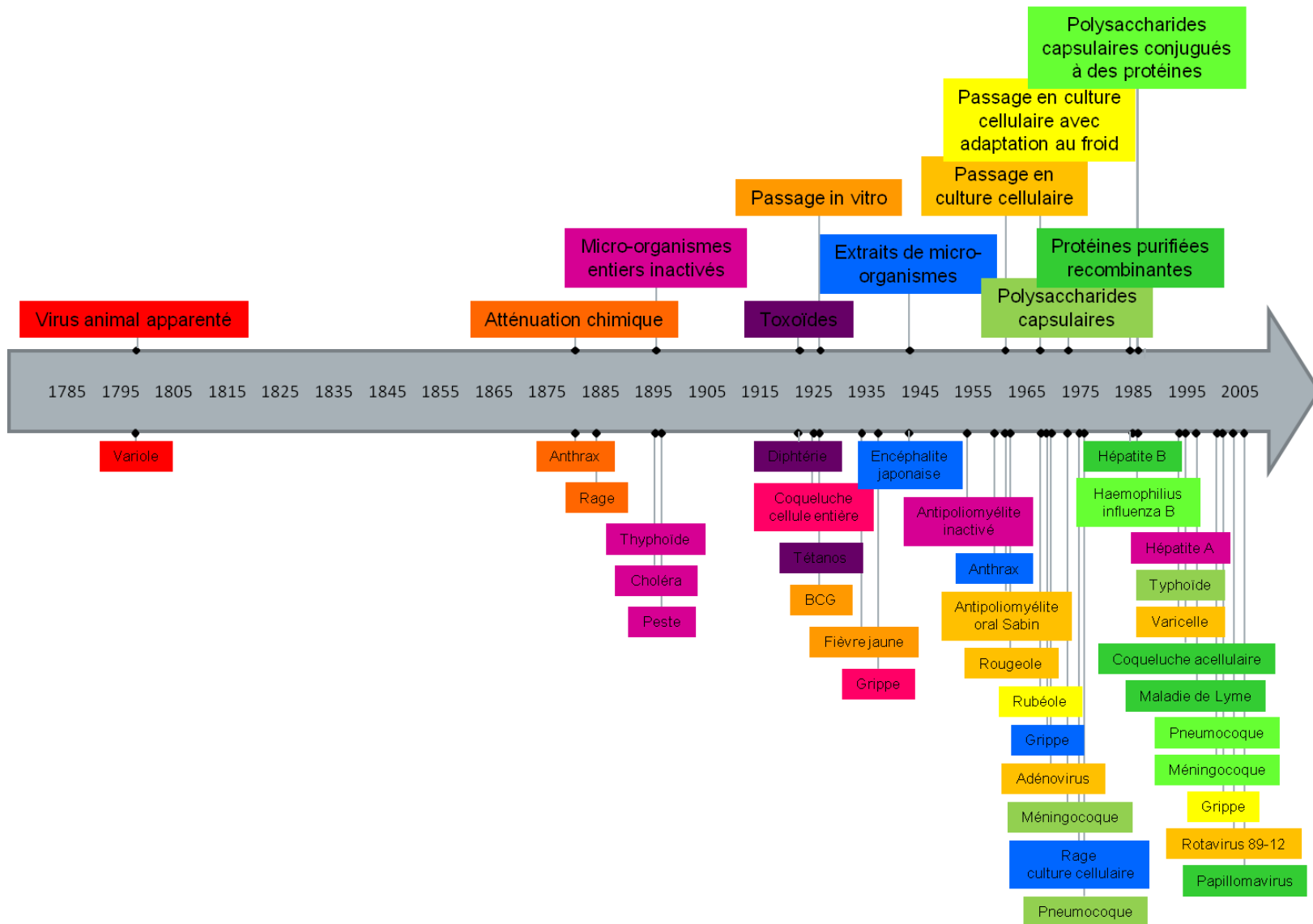


Figure 1 Chronologie des vaccins

Sur la partie supérieure de la chronologie sont figurés les différents types de vaccins, et sur la partie inférieure sont figurés les pathogènes ciblés
D'après (Plotkin, 2005)

qu'une technique de variolisation consistant à mettre en contact des enfants sains avec des malades atteints de « petite vérole de bonne espèce » existait en Europe dans certains milieux populaires, mais beaucoup de références attribuent à Lady Mary Wortley Montagu l'introduction et la promotion de la pratique en grande Bretagne en 1721 (Moulin, 1996). Lady Mary, qui fut elle-même atteinte de la variole, était l'épouse de l'ambassadeur anglais en Turquie. Ayant eu connaissance de la méthode de variolisation utilisée à la cour Ottomane, elle convainquit le médecin de l'ambassade d'inoculer ses propres enfants. Suite à cette initiative, d'autres tentatives de variolisation furent conduites, notamment sur des prisonniers, puis sur des enfants orphelins. S'appuyant sur ces succès et sa position sociale, Lady Mary fit la promotion du procédé, qui s'imposa comme une mode médicale dans les milieux aristocratiques anglais, avant de gagner rapidement et massivement toute l'Europe (Riedel, 2005). La variolisation atteignit le nouveau monde la même année, et fut utilisée lors de l'épidémie de 1721 à Boston (Fenner, 1988).

Malgré les risques qu'elle comportait, la pratique de la variolisation apportait un niveau de protection avéré du point de vue individuel, comme en attestent les travaux du mathématicien Daniel Bernoulli (Bazin, 2008), mais ses effets démographiques sont cependant incertains. En effet, si on enregistre bien, au moment de l'introduction de la variolisation, un déclin sensible de la mortalité due à la variole en Europe, le développement parallèle d'autres mesures sanitaires, telles que l'isolement des malades, ainsi que les variations naturelles de la virulence du virus peuvent également avoir contribué à cette tendance (Moulin, 1996).

2. Edward Jenner et l'introduction du vaccin antivariolique

Malgré le recours grandissant à la variolisation comme mesure préventive, la variole continuait de faire des ravages en Europe à la fin du XVIII^e siècle (Moulin, 1996). Or, au cours de cette même période, il a été de plus en plus observé en milieu rural que les laitières exposées à la variole des vaches étaient rarement grêlées, et souvent pas ou peu sensibles à la variolisation (Fenner et al., 1988). Plusieurs personnes ont donc testé indépendamment la possibilité de protéger les humains de la variole en leur inoculant la variole des vaches, mais c'est le médecin anglais Edward Jenner (1749-1823) qui démontra pour la première fois son caractère protecteur, et qui, en faisant inlassablement la promotion de cette nouvelle technique, contribua à sa diffusion dans le monde entier (Fenner, 1988). Le 17 mai 1796, E. Jenner administra du fluide provenant des lésions d'une laitière infectée par la variole des vaches à un enfant de 8 ans, James Phipps, avant de l'exposer à la variole humaine, par

variolisation. L'expérience confirma le caractère protecteur de la variole des vaches contre la variole humaine, et Jenner communiqua ses résultats en 1798 dans un petit livret intitulé *An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire and Known by the Name of Cow Pox* (Riedel, 2005; (Moulin, 1996) (Figure 1).

Au cours des trois années suivant sa publication, l'*Inquiry* fut traduite en cinq langues, et la vaccination Jennérienne se répandit rapidement dans toute l'Europe et en Amérique. Cette nouvelle procédure supplanta très vite la variolisation, car elle présentait une innocuité très supérieure. En effet, alors que le vaccin ne produisait qu'une lésion localisée au site d'inoculation, la variolisation, elle, pouvait entraîner des lésions généralisées qui étaient fatales chez 1 à 2% des sujets immunisés (Figure 2). D'autre part, cette procédure représentait une source de dissémination du virus de la variole, ce qui n'était le cas du vaccin, qui contenait des souches d'Orthopoxvirus différentes du virus de la variole humaine (Fenner, 1988).

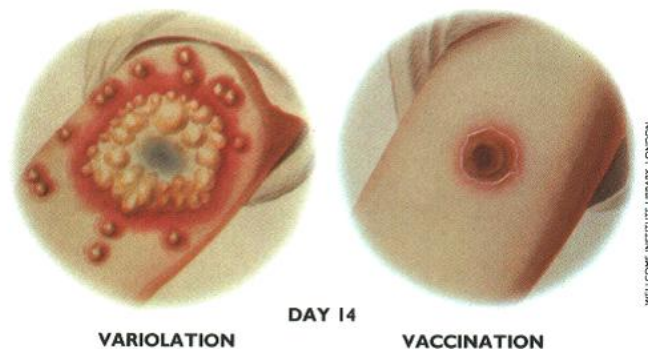


Figure 2 Aspect des lésions locales 14 jours après variolisation ou vaccination.

Dessins de Gold-Kirtland, 1801 (Fenner, 1988)

A l'origine, les vaccins étaient préparés à partir de lésions de vaches infectées par la vaccine, mais en raison de leur difficulté d'accès, E. Jenner proposa la vaccination de bras à bras (Figure 3). La méthode fut largement adoptée, mais fut ensuite remise en cause, car elle comportait des risques de transmission de la syphilis, et que son efficacité pouvait décliner au cours du temps. Les vaccins furent donc ensuite élaborés à partir de lésions de veaux inoculés, ou de chevaux souffrant d'une maladie également causée par un poxvirus appelée javart (Fenner et al., 1988).



Figure 3 La vaccination de bras à bras
"La Vaccine", 1822 Charles Desbordes

Tandis que la couverture vaccinale s'étendait, la mortalité due à la variole déclinait de façon spectaculaire et durable (Figure 4). Les épidémies étaient moins fréquentes et beaucoup moins sévères qu'au 18^e siècle, et les cas recensés étaient presque toujours relatifs à des personnes non vaccinées (Fenner et al., 1988).

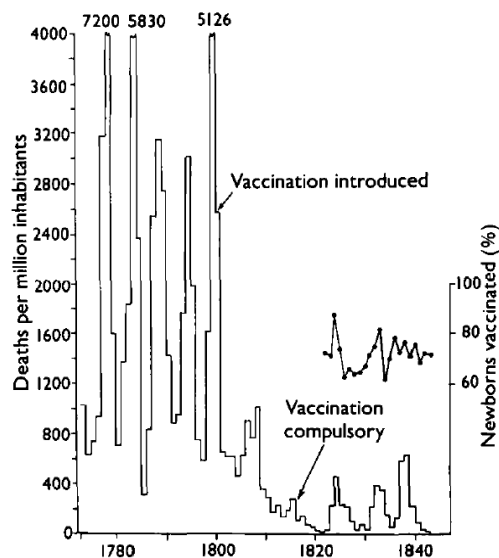


Figure 4 Nombre de morts par variole par million d'habitants entre 1722 et 1843 et nombre de nouveau-nés vaccinés entre 1820 et 1843 en Suède

(Fenner, 1988)

Dans ce contexte, les gouvernements de nombreux pays décidèrent que la protection contre la variole n'était pas quelque chose qui pouvait être laissée à l'appréciation de chacun: la variolisation, en tant que source potentielle de variole fut interdite, et la vaccination fut rendue obligatoire. Par la suite, les rappels de vaccination furent introduits, suite à l'apparition chez des adultes vaccinés de cas de symptomatologie toutefois modérée (Fenner et al., 1988). Les campagnes de vaccination se poursuivirent, et grâce à elles, la variole fut éliminée dans de nombreuses régions du monde. Edward Jenner pensait que son vaccin pouvait permettre d'éradiquer la variole, et en absence de réservoir animal du virus, ce scénario était théoriquement possible (Paul, 2008). En 1959, l'OMS lança donc une campagne de vaccination de masse, suivie d'une stratégie de « surveillance et d'endiguement », consistant à isoler les cas et à vacciner les individus aux alentours de foyers d'épidémie, afin d'éliminer la variole des régions où elle était toujours endémique, en particulier en Afrique subsaharienne et dans le sous continent Indien (Paul, 2008). Vingt ans plus tard, le 9 décembre 1979, soit 183 ans après l'expérience d'Edward Jenner, une commission d'experts certifia l'éradication de la variole. Cette terrible maladie devint la première, et jusqu'à ce jour la seule maladie contagieuse éradiquée activement.

3. Louis Pasteur et le principe de l'atténuation de la virulence

Le grand succès de la vaccination Jennérienne ne fut pas immédiatement suivi par l'apparition de nouveaux vaccins. A cette époque, ni le mode d'action de la vaccination, ni l'origine des maladies infectieuses n'étaient connus. Il fallut attendre près d'un siècle, et les travaux de Louis Pasteur (1822-1895) et de Robert Koch (1843-1910) pour qu'émerge la théorie de l'origine microbienne des maladies infectieuses, puis le concept de l'atténuation de la virulence qui donna naissance à une nouvelle génération de vaccins (Figure 1).

Dans les années 1880, Louis Pasteur observa que les bactéries responsables du cholera des poules perdaient leur virulence après de longues périodes de culture en milieu artificiel, et surtout que les animaux inoculés avec ces bactéries atténuées étaient protégés contre une infection ultérieure avec une culture fraîche et virulente. Pasteur conclut que l'atténuation des bactéries préserve leur immunogénicité, et proposa d'utiliser des germes pathogènes atténués pour développer une immunité contre les maladies. Il appliqua ce principe à d'autres maladies animales, puis à la rage, et inventa le terme de vaccination pour désigner les préparations immunisantes en hommage à Edward Jenner. Le concept de l'atténuation a servi de base au

développement de nombreux vaccins, en particulier le BCG, mis au point au siècle suivant par Calmette et Guérin à partir d'une souche atténuée de *Mycobacterium bovis* (Figure 1).

4. Les vaccins inactivés

Au 19^e siècle, peu de temps après l'idée originale de Pasteur, l'idée d'inactiver complètement les pathogènes pour préparer des vaccins émergea. C'est ainsi qu'à la fin du 19^e siècle, trois vaccins composés de bactéries entières inactivées ont été développés pour lutter contre le choléra, la fièvre typhoïde, et la peste. Dès le début du 20^e siècle (1920), un quatrième vaccin anti-coqueluche, contenant une forme inactivée de *Bordetella pertussis* fut développé. (Guérin, 2007) (Figure 1).

5. La culture cellulaire ouvre le champ de la vaccinologie aux virus

Le vaccin de Pasteur contre la rage, élaboré avant même que l'existence des virus ne soit établie, constitue le premier vaccin antiviral de l'histoire. Il demeura une exception pendant près de cinquante ans, car la fabrication de vaccins contre des virus était entravée par l'impossibilité d'isoler et de produire ces derniers en grande quantité. En effet, les virus nécessitent des cellules vivantes pour leur multiplication, et malgré l'essor, peu avant la guerre de 1914, des cultures tissulaires et cellulaires, celles-ci étaient sujettes à de fréquentes contaminations par des bactéries et des champignons et demeuraient hasardeuses (Berche, 2007). En 1931, Ernest William Goodpasture (1886-1960) mit au point la culture de virus sur œuf de poule embryonné, et très vite il apparut que cette technique de répllication virale était également un mode d'atténuation (Plotkin et al., 2008). Grâce à cette innovation, des vaccins vivants atténués contre la fièvre jaune et les oreillons, ainsi que le premier vaccin inactivé contre la grippe virent le jour (Figure 1). Après la seconde guerre mondiale, l'ajout d'antibiotiques aux cultures cellulaires fut un pas décisif, et grâce aux travaux de John Franklin Enders (1897-1985), il devint possible de cultiver facilement de nombreux virus sur des cellules provenant de tissus sains ou cancéreux, d'origine humaine ou animale (Berche, 2007). Grâce à cette révolution, un véritable âge d'or de la vaccination s'ouvrit, et de nombreux vaccins inactivés (vaccin antipoliomyélitique de Salk, antirabique et anti hépatite A) ou atténués (vaccin antipoliomyélitique oral de Sabin, rougeole, rubéole et varicelle) se développèrent (Figure 1).

6. Les vaccins sous-unitaires

Les vaccins sous-unitaires sont constitués de fractions antigéniques purifiées, qui peuvent être de nature protéique ou polysaccharidique. Les premiers vaccins contre la diphtérie et le tétanos, tous deux constitués d'exotoxines bactériennes inactivées, peuvent être considérés comme les premiers vaccins de ce type (Figure 1). Initialement préparés à partir d'extraits de cultures de micro-organismes, et de tissus ou de plasma d'individus infectés, les vaccins sous-unitaires ont connu un véritable essor à partir des années 70, avec l'avènement de la biologie moléculaire et du génie génétique (Paul, 2008) (Figure 1). Ces nouvelles techniques, qui ont considérablement facilité et sécurisé la production des Ag, ont permis le développement de nouveaux vaccins à base de protéines contre l'hépatite B, la coqueluche (Plotkin, 2005), et plus récemment le papillomavirus. D'autre part, le développement des connaissances dans le domaine de l'immunologie fondamentale a permis l'émergence de vaccins constitués d'Ag polysaccharidiques conjugués à des protéines porteuses. Ces derniers sont plus efficaces que leurs homologues non couplés, notamment chez l'enfant, et permettent de protéger contre les pneumocoques, les méningocoques, et contre *Haemophilus influenzae* B (Paul, 2008).

7. Le panel de vaccins disponibles

Plus de deux siècles après ses débuts, la vaccinologie a permis le développement d'un important arsenal de vaccins : actuellement, plus de 120 produits vaccinaux, toutes formes galéniques confondues, permettent de protéger contre 26 maladies (Tableau 1), et selon des données de l'OMS, plus de 80 candidats vaccins sont aux derniers stades des essais cliniques, et devraient être disponibles d'ici 2012 (Davey, 2009). Une trentaine d'entre eux ciblent des maladies pour lesquelles il n'existe encore aucun vaccin homologué, comme le paludisme, et une cinquantaine d'autres candidats visent à améliorer des vaccins existants pour les rendre plus efficaces, plus sûrs, plus faciles à administrer et enfin économiquement plus abordables. Il s'agit par exemple de vaccins contre les pneumocoques, l'encéphalite japonaise, l'hépatite A ou encore le choléra (Davey, 2009).

Maladies bactériennes	Maladies virales	Maladies virales/cancers
	Encéphalite européenne à tiques	
	Encéphalite japonaise	
Choléra	Fièvre jaune	
Coqueluche	Grippe (saisonnnière et pandémique)	
Diarrhée à <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (ETEC)	Hépatite A	
Diptérie	Oreillons	
Fièvre typhoïde	Poliomyélite	Hépatite B
Infections à <i>Haemophilus influenzae</i> de type B (Hib)	Rage	Infections à virus du papillome humain (VPH)
Infections à méningocoques	Rougeole	
Infections à pneumocoques	Rubéole	
Tétanos	Varicelle	
Tuberculose	Zona	
	Infections à Rotavirus	
	Variole	

Tableau 1 Les maladies évitables par la vaccination

Chapitre 2 Les mécanismes de la protection vaccinale

Les vaccins induisent une immunité protectrice contre certains pathogènes. En plus de protéger à l'échelle individuelle, ils peuvent contribuer à réduire la probabilité de transmission des infections, en diminuant le nombre d'individus sensibles dans les populations. Ce phénomène, appelé « immunité de groupe » a pour conséquence d'étendre la protection aux individus non vaccinés lorsque la couverture vaccinale est suffisamment importante. (Janeway, 2005).

La protection vaccinale repose sur le maintien, chez l'individu immunisé, d'effecteurs immunologiques spécifiques et/ou de cellules mémoire capables de générer rapidement des effecteurs en réponse à de nouvelles expositions au pathogène. La protection à long terme chez les individus vaccinés repose donc sur la mise en place de réponses immunitaires adaptatives, par opposition aux réponses immunitaires innées qui sont activées rapidement suite à une infection mais ne se maintiennent pas dans le temps (Plotkin et al., 2008).

1. Les effecteurs de la réponse vaccinale

Les effecteurs immunitaires induits par les vaccins sont essentiellement des anticorps. D'autres effecteurs potentiels sont les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques (CTL). La génération et le maintien de ces deux types d'effecteurs dépend généralement de l'activation préalable de cellules T $CD4^+$ (Th) spécialisées dites cellules auxiliaires.

1.1. Les lymphocytes T $CD4^+$

Les cellules T $CD4^+$ spécifiques d'Ag sont générées par tous les types de vaccins, à l'exception des vaccins à base de polysaccharides (PS) non conjugués (Plotkin et al., 2008). Elles reconnaissent principalement des Ag exogènes capturés par des cellules spécialisées appelées cellules présentatrices de l'Ag (CPA) et présentés par des molécules CMH II. Les cellules T $CD4^+$ ne permettent pas de prévenir l'infection par les pathogènes intra et extracellulaires mais participent à leur contrôle et à leur élimination. Leur action ne s'exerce pas de façon directe, mais via la mobilisation et l'activation d'autres cellules. Les cellules T $CD4^+$ activées exercent essentiellement un rôle d'appui des fonctions des CPA, auxquelles elles fournissent des signaux qui soutiennent l'activation des cellules B et des CTL.

L'induction de réponses mémoire est strictement dépendante de leur activation. (Plotkin et al., 2008). On distingue plusieurs sous types de cellules T CD4⁺ effectrices :

Les cellules Th1 sont impliquées dans l'immunité systémique, en particulier dans la défense contre les pathogènes intracellulaires. Elles sécrètent de l'IFN- γ et sont d'importants activateurs des macrophages, des cellules NK, et des cellules T CD8⁺ (Paul, 2008).

Les cellules Th2 sont importantes pour la défense au niveau des barrières muqueuse et cutanée, et sont directement impliquées dans la défense contre les pathogènes extracellulaires comme les helminthes (Plotkin et al., 2008). Elles sécrètent de l'IL-4, de l'IL-13 et de IL-5, et mobilisent et activent les éosinophiles, basophiles, mastocytes, et les macrophages activés (Paul, 2008).

Les cellules Th1 et Th2 soutiennent toutes deux l'activation et la différenciation des cellules B au cours de la réponse extra-folliculaire (Plotkin et al., 2008).

Les cellules ThF (Follicular helper T cells) interviennent dans l'activation des cellules B folliculaires, probablement via l'expression du ligand de CD40 et la sécrétion de cytokines Th1- et Th2-like. On les retrouve dans les ganglions lymphatiques, dans la périphérie des follicules (Paul, 2008).

Les cellules Th17 sont essentielles pour la défense contre les bactéries extracellulaires. Elles agissent de concert avec les neutrophiles et produisent de l'IL-17A, de l'IL-17F, de l'IL-6, et du TNF α (Paul, 2008).

A côté de ces sous-types de cellules T auxiliaires, on trouve également des cellules T régulatrices (Treg), qui inhibent les réponses immunitaires contre des Ag du soi ou du non soi: les Treg de type CD4⁺CD25⁺ inhibent la prolifération et la production d'IFN γ des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, probablement par contact direct cellule-cellule et par inhibition de la production d'IL-2, et les cellules Tr1 produisent des niveaux élevés d'IL-10 et de TGF β (Jäger et Kuchroo, 2010).

1.2. Les anticorps

Les anticorps sont des immunoglobulines (Ig), composées d'une région constante (Fc) et d'une région variable (Fab) qui peuvent reconnaître et neutraliser spécifiquement un Ag. Ils sont produits par des plasmocytes différenciés à partir de lymphocytes B spécifiques de l'Ag.

Les plasmocytes peuvent persister quelques mois après l'immunisation, et certains d'entre eux ont des durées de vie très longues et peuvent produire des anticorps protecteurs pendant de nombreuses années (Plotkin et al., 2008).

Les anticorps peuvent permettre de prévenir ou de réduire les infections par des agents extra- et intracellulaires (Plotkin et al., 2008) via le couplage de leur propriété de reconnaissance spécifique d'Ag de nature variée (sucres, lipides, peptides, composés chimiques...) à différentes fonctions effectrices (Figure 5).

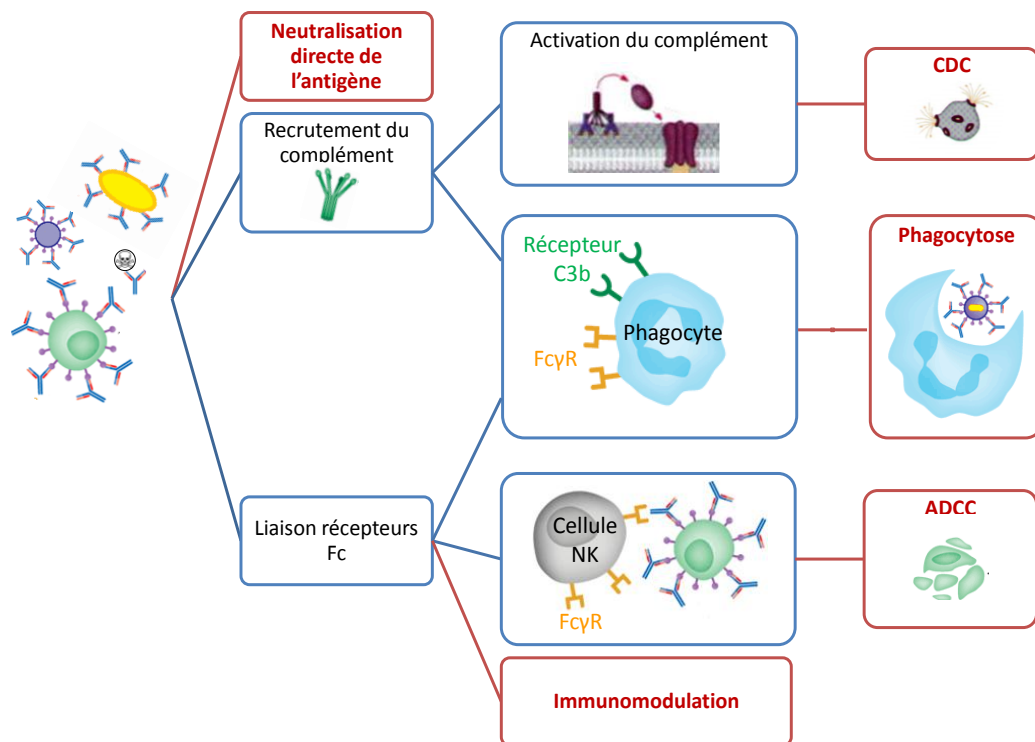


Figure 5 Les fonctions effectrices des anticorps

D'après (Marasco et Sui, 2007) et (Casadevall et al., 2004)

La fixation d'un anticorps sur un Ag peut entraîner le blocage de l'activité biologique de ce dernier. Les anticorps peuvent ainsi neutraliser des toxines microbiennes et prévenir leur diffusion, par exemple au niveau d'une blessure infectée (vaccin anti-tétanique) ou au niveau d'un organe (la gorge dans le cas du vaccin anti-diphtérique). S'ils sont présents à un titre suffisamment élevé à la surface des muqueuses, ils peuvent réduire l'adhérence des pathogènes aux cellules/récepteurs de l'hôte, et prévenir ainsi la réplication virale (vaccin anti-polio) ou la colonisation bactérienne (vaccins glycoconjugués contre les bactéries

encapsulées). Cependant, dans la plupart des cas, la vaccination n'induit pas des titres en anticorps suffisamment élevés et durables à la surface des muqueuses pour induire une immunité stérilisante. Les pathogènes franchissent donc la barrière mucoale, et ce sont les IgG sériques qui limitent leur multiplication, leur propagation, et préviennent l'apparition des signes cliniques (Plotkin et al., 2008).

Grâce à leur portion Fc, les anticorps peuvent recruter des cellules immunocompétentes portant des récepteurs spécifiques (RFc), ainsi que des molécules du complément. Les interactions Fc-RFc catalysent l'élimination des complexes immuns par les cellules phagocytaires, la lyse de cellules cibles selon un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps médié par les cellules NK (natural killer) appelé ADCC (*Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*), et enfin exercent des activités d'immunomodulation, en déclenchant notamment la libération de médiateurs de l'inflammation. La mobilisation des molécules du complément favorise également la phagocytose des complexes immuns et active la lyse de bactéries ou de cellules cibles. On parle alors de cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (Janeway, 2005) (Figure 5).

1.3. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL)

L'induction de réponses lymphocytaires T CD8⁺ soutenues est actuellement limitée aux vaccins vivants. Les cellules T CD8⁺ reconnaissent des peptides présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et dérivés de la dégradation de protéines cytosoliques, qui peuvent être des protéines de l'hôte normales ou mutées, ou des protéines d'origine microbienne. Les molécules CMH I étant présentes à la surface de pratiquement toutes les cellules nucléées, les cellules T CD8⁺ peuvent ainsi surveiller le contenu des cellules, et identifier et éliminer celles qui sont infectées par des pathogènes intracellulaires, ainsi que les cellules tumorales. Ces cellules ne permettent donc pas de prévenir les infections mais les réduisent, les contrôlent et les éliminent (Plotkin et al., 2008). Elles exercent leurs fonctions effectrices par le biais de la production de cytokines IFN- γ et TNF qui ont notamment des activités d'inhibition de la réplication virale, et par le biais d'activités cytotoxiques. Les CTL détruisent les cellules cibles principalement par apoptose, grâce à deux mécanismes : la voie perforine/granzyme, qui est initiée par l'engagement du complexe TCR/CMH entre la cellule effectrice et la cellule cible (Trapani et al., 1998) et la voie de signalisation par les récepteurs de mort, principalement celle

impliquant FasL (Nagata et Golstein, 1995). L'activation et la qualité des réponses cellulaires T CD8⁺ est régulée par les cellules T auxiliaires.

2. Les vaccins et leurs effecteurs

Le fait qu'un vaccin induise spécifiquement un certain type d'effecteurs n'implique pas nécessairement que l'ensemble de ceux-ci soient responsables de l'efficacité vaccinale (Plotkin et al., 2008). Ainsi, la plupart des vaccins actuels activent à la fois des réponses cellulaires T et B, mais la majorité d'entre eux exercent leurs effets protecteurs grâce aux réponses B. En effet, les vaccins induisent généralement la production d'anticorps spécifiques, majoritairement des IgG sériques, dont le pouvoir protecteur dépend de leur concentration et de leur affinité (Tableau 2). Le BCG est le seul vaccin humain actuellement utilisé pour lequel les cellules T constituent les effecteurs principaux. Cependant, il existe des preuves indirectes de la contribution des cellules T à la protection conférée par certains vaccins (Plotkin et al., 2008). Il semble par exemple que ces cellules soient responsables de la protection des nouveau-nés contre les formes sévères de la rougeole, en absence de réponses anticorps. En effet, en raison de l'immaturation de leur système immunitaire et/ou de la présence résiduelle d'anticorps maternels, les nourrissons sont incapables de développer des réponses anticorps, mais produisent des nombres significatifs de cellules T CD4⁺ productrices d'IFN γ qui présentent une activité antivirale potentielle (Gans et al., 1999). Ainsi, si seuls les anticorps sont capables de prévenir l'infection, les cellules T peuvent exercer un contrôle de la sévérité de la maladie, notamment en l'absence d'anticorps spécifiques (Plotkin et al., 2008).

Vaccin	Type de vaccin	IgG sériques	IgG mucosales	IgA mucosales	Cellules T
Coqueluche acellulaire	Protéine	++			+?(CD4)
Coqueluche, cellule entière	Inactivé	++			
Diphthérie (toxöide)	Toxoïde	++	(+)		
Fièvre jaune	Vivant atténué	++			
Grippe	Inactivé sous unitaire	++	(+)		
Grippe (intranasal)	Vivant atténué	++	+	+	+(CD8)
Hépatite A	Inactivé	++			
Hépatite B (Ag HBs)	Protéine	++			
Hib PS	Polysaccharide	++	(+)		
Hib glycoconjugué	Polysaccharide -	++	++		
Méningocoque PS	Polysaccharide	++	(+)		
Méningocoque conjugué	Polysaccharide -	++	++		
Oreillons	Vivant atténué	++			
Papillomavirus	VLPs	++	++		
Pneumocoque PS	Polysaccharide	++	(+)		
Pneumocoque conjugué	Polysaccharide -	++	++		
Polio Sabin	Vivant atténué	++	++	++	
Polio Salk	Inactivé	++	+		
Rage	Inactivé	++			
Rotavirus	Vivant atténué			++	
Rougeole	Vivant atténué	++			+(CD8)
Rubéole	Vivant atténué	++			
Tétanos toxöide	Toxoïde	++			
Tuberculose (BCG)	Vivant				++(CD4)
Typhoïde PS	Polysaccharide	+	(+)		
Varicelle	Vivant atténué	++			+?(CD4)

Tableau 2 Corrélats de protection des vaccins homologués

(Plotkin *et al.*, 2008)

3. Les cellules mémoire

3.1. Caractéristiques des cellules mémoire

Les cellules mémoire n'ont pas d'activité anti-microbienne intrinsèque comme leurs homologues effectrices, et ne sont donc pas protectrices, mais sont destinées à se réactiver pour faire émerger de nouveaux effecteurs en réponse à une nouvelle exposition à l'Ag dont elles sont spécifiques. Elles présentent une fréquence beaucoup plus élevée que les cellules naïves initiales, ce qui leur permet d'être réactivées rapidement, avec des quantités d'Ag plus faibles que lors de la réponse primaire.

Les cellules T mémoire peuvent être distinguées en deux catégories, qui présentent des profils de migration et des niveaux de différenciation distincts :

Les cellules T mémoire centrales (T_{mc}) expriment les molécules CCR7 et CD62L, et migrent vers les tissus lymphoïdes primaires et secondaires, incluant la moelle osseuse (Mazo et al., 2005; Sallusto et al., 1999). Ces cellules présentent un faible niveau de différenciation. Elles fonctionnent comme un réservoir de cellules qui acquièrent le statut effecteur au cours de la réinfection (Zaph et al., 2004).

Les cellules T mémoire effectrices (T_{me}) sont des cellules différenciées qui produisent de l'IFN- γ (Th1), de l'IL-4 (Th2) ou renferment de la perforine. Elles n'expriment pas CCR7 ni CD62L, mais des récepteurs de chimiokines associés à l'inflammation, qui leur permettent de migrer vers les tissus non lymphoïdes enflammés. Contrairement aux cellules T_{me} qui doivent subir une différenciation terminale avant de pouvoir exercer leurs fonctions effectrices, ces cellules sont capables d'exprimer leurs gènes effecteurs immédiatement après leur réactivation, ce qui les assimile à des sentinelles garantes de la surveillance et de la protection en périphérie.

Chez l'homme, toutes les cellules B mémoire recirculent dans le sang, mais les tissus lymphoïdes, comme la moelle osseuse et la rate, constituent leur réservoir principal (Paramithiotis et Cooper, 1997)(Mamani-Matsuda et al., 2008). Ces cellules, qui ont subi les processus d'hypermutation somatique et, éventuellement, de commutation isotypique, expriment CD27⁺ et des Ig membranaires de classe IgM seule, ou IgG, IgA ou IgE. Les cellules B mémoire sont plus affines pour l'Ag que les cellules B naïves, et leur réactivation donne lieu à un processus de prolifération et de différenciation en plasmocytes qui permet de

générer des niveaux de réponse en anticorps significativement plus élevés, avec une cinétique plus rapide que lors de l'immunisation primaire. Les cellules B mémoire peuvent persister plusieurs décennies après que les anticorps vaccinaux aient éventuellement disparu.

3.2. Mémoire B et protection vaccinale

Tous les vaccins actuellement sur le marché induisent une mémoire immunologique, à l'exception des vaccins polysaccharidiques. Néanmoins, cela ne constitue pas pour autant un marqueur de leur efficacité à long terme (Trotter et al., 2004). Par exemple, une mémoire vaccinale a pu être mise en évidence chez des enfants présentant un échec du vaccin Hib (J McVernon, Johnson, et al. 2003). En fait, comme nous l'avons vu, l'efficacité des vaccins dépend souvent de la présence d'anticorps protecteurs au moment de l'exposition au pathogène, et la mémoire immunitaire persistante n'est parfois pas suffisante pour protéger contre l'infection quand la concentration de ces derniers décline. Ainsi, les vaccins glycoconjugués utilisés contre les maladies à méningocoques du groupe C sont beaucoup plus efficaces au cours de la première année après la vaccination qu'au cours des trois années qui suivent, malgré la démonstration de l'induction d'une mémoire immunitaire persistante (Plotkin et al., 2008). De la même manière, il a été montré que le vaccin contre l'hépatite B ne permet pas de protéger contre l'infection virale aigüe quand les titres en anticorps anti-HBsAg sont inférieurs à 10 UI/L (Whittle et al., 1995). Si elles peuvent s'avérer insuffisantes pour empêcher l'infection, les cellules mémoire vaccinales peuvent cependant induire des cellules effectrices capables de prévenir la progression vers la forme chronique de la maladie. Selon Claire-Anne Siegrist (Plotkin et al., 2008), la capacité protectrice des cellules B mémoire pourrait être conditionnée par leur cinétique de réactivation, qui doit être suffisamment courte pour générer des quantités d'anticorps permettant d'interrompre l'invasion microbienne avant l'apparition des symptômes cliniques de la maladie, c'est-à-dire avant la fin de la période d'incubation du pathogène. Cette considération pourrait avoir des conséquences sur les programmes d'immunisation. En effet, dans les cas où la période d'incubation des pathogènes est supérieure au délai de réactivation de la mémoire immunologique, les rappels vaccinaux pourraient s'avérer superflus.

Chapitre 3 Succès, limites et perspectives des vaccins

1. Les vaccins ont contribué de façon remarquable à l'amélioration de la qualité de vie...

Contrairement à la plupart des médicaments dont l'action est curative, les vaccins ont la particularité d'offrir une protection préventive contre certaines maladies infectieuses. En outre, dans le cadre de campagnes étendues, grâce à l'effet d'immunité de « groupe » (voir définition chapitre 2, paragraphe 1), les vaccins permettent de diminuer l'incidence des maladies dans les populations, ce qui renforce encore leur pouvoir protecteur (Janeway, 2005). Ces propriétés uniques font des vaccins de très puissants outils de lutte contre la mortalité et la morbidité liées aux maladies infectieuses. On leur doit l'éradication de la variole, et le contrôle, au moins dans certaines parties du monde, de la diphtérie, du tétanos, de la fièvre jaune, de la coqueluche, des oreillons, de la rubéole, de la maladie due à *Hemophylius influenza* de type b, de la typhoïde et de la rage (Figure 6). Ils devraient également permettre, d'après les estimations de l'OMS, d'éradiquer la poliomyélite et d'éliminer la rougeole dans tous les pays d'ici 2020 (Davey, 2009). D'autre part, les vaccins bénéficient d'un excellent rapport coût-efficacité. A titre d'exemple, grâce à un investissement de 100 millions de \$ sur 10 ans, la campagne d'éradication de la variole permet d'économiser en frais de traitement et de prévention environ 1,3 milliards de \$ par an dans le monde (Davey, 2009).

En combinaison avec le développement socio-économique, les progrès de l'hygiène, et l'introduction des antibiotiques, les vaccins ont contribué de manière importante à l'augmentation de l'espérance de vie observée depuis le début du 18^e siècle dans les pays développés (Figure 7). En particulier, le succès de la vaccination contre la variole fut l'un des principaux moteurs de la baisse spectaculaire de la mortalité infantile qui est en grande partie à l'origine de cette révolution démographique. Alors qu'au 18^e siècle, en France, près d'un nouveau-né sur trois mourait avant son premier anniversaire, le plus souvent victime d'une maladie infectieuse, aujourd'hui, la mort des enfants est devenue un phénomène rare et accidentel en France comme dans tous les pays développés. Les vaccins ont en partie contribué à cette révolution et aujourd'hui encore, en évitant chaque année dans le monde 2,5 millions de décès parmi les enfants de moins de cinq ans (Davey, 2009), ils constituent plus que jamais un outil de développement et de lutte contre la mortalité infantile.

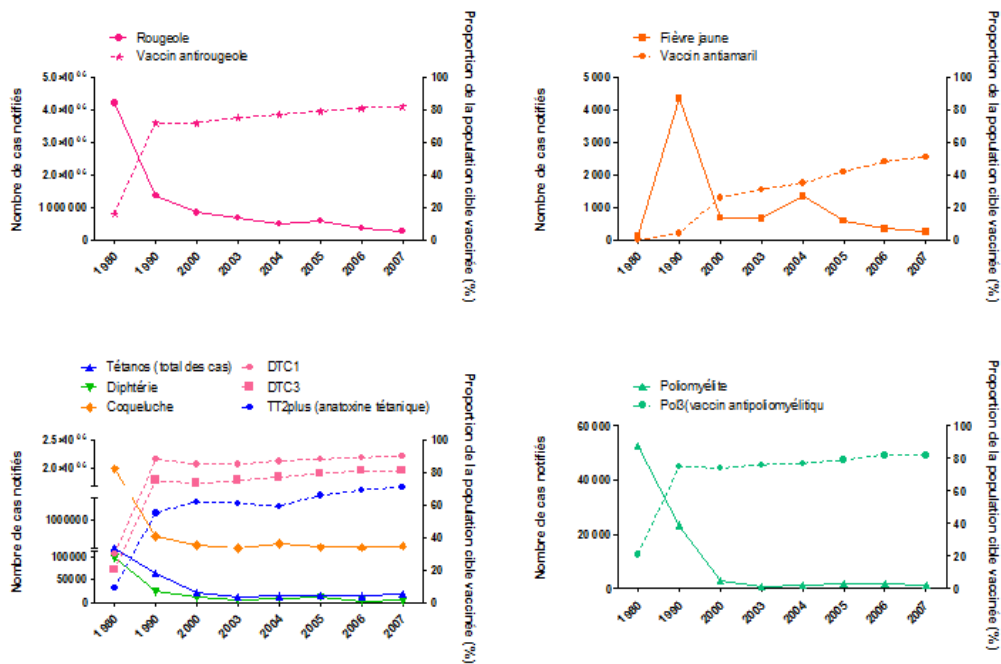


Figure 6 Incidence des maladies et couverture vaccinale mondiale

D'après (Davey, 2009)

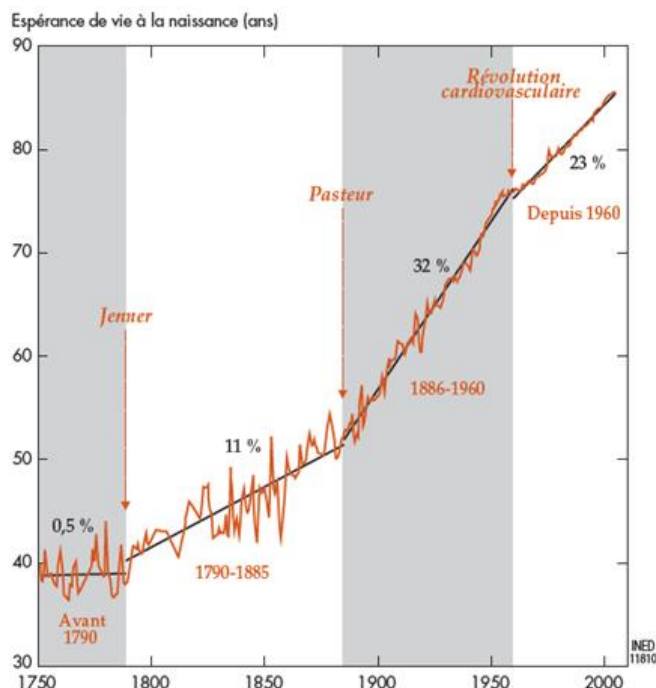


Figure 7 Espérance de vie féminine nationale la plus élevée observée à un moment donné dans le monde (1750-2005)

Les changements de rythme sont mesurés par la pente (en %) des droites d'ajustement. Une pente de 10 % signifie que l'espérance de vie augmente d'un dixième d'année chaque année ; 20 % un cinquième d'année ; 33 % un tiers d'année. D'après (J. Vallin et F. Meslé, *Population & Sociétés*, n° 473, Ined, décembre 2010)

2. ...mais ils présentent des limites...

Les grands succès de la vaccination ont fait espérer que les principes relativement empiriques de l'immunisation établis par Louis Pasteur pourraient s'appliquer à l'ensemble des pathogènes, et permettraient de concevoir des vaccins contre toutes les maladies. Cependant, les échecs rencontrés dans la mise au point de vaccins contre le paludisme, le sida ou la tuberculose de l'adulte (contre laquelle la vaccination par le BCG n'est pas efficace), attestent des difficultés rencontrées par les approches vaccinales conventionnelles.

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, paragraphe 2, la protection conférée par les vaccins repose principalement sur les réponses anticorps, même si pour certains vaccins atténués, les cellules T contribuent vraisemblablement à la protection. (Rappuoli, 2007). Ces vaccins conventionnels s'avèrent efficaces pour protéger contre des agents pathogènes qui peuvent être totalement neutralisés par des quantités suffisantes d'Ig dans le sérum ou au niveau des muqueuses. Mais pour de nombreux pathogènes, comme les mycobactéries, certains virus, et de nombreux parasites, la réponse humorale ne semble pas correspondre au bras effecteur du système immunitaire le plus à même de conférer une protection, ce qui pourrait expliquer que la plupart des tentatives de développement de vaccins traditionnels contre ces pathogènes ont échoué (Germain, 2010).

Le second obstacle à la conception de nouveaux vaccins réside dans la fréquence de la variabilité antigénique des pathogènes. Pour les pathogènes présentant une variabilité antigénique nulle à modérée et un nombre limité de sérotypes, le succès des vaccins conventionnels est patent. La composition des vaccins peut intégrer plusieurs Ag couvrant l'ensemble du spectre des souches ciblées. C'est notamment le cas pour le vaccin contre le virus grippal, dont la fabrication saisonnière s'appuie sur un système d'alerte qui permet d'anticiper les variations des déterminants neutralisants du virus. (Germain, 2010). Pour les pathogènes présentant des changements mutationnels rapides, la situation s'avère beaucoup moins favorable car l'infection débouche rapidement sur la sélection de mutants capables d'échapper à la réponse vaccinale. C'est notamment ce qui est observé pour le VIH, dont la variabilité antigénique extrême rend difficile la mise en place d'un vaccin capable de reproduire de façon adéquate l'ensemble des variants.

La probabilité de succès du développement d'un vaccin selon l'approche traditionnelle est donc définie par la combinaison de deux paramètres majeurs : le type d'immunité (cellulaire ou humorale) qui est critique pour son contrôle d'une part, et la variabilité

antigénique du pathogène ciblé d'autre part (Figure 8) (Levine et al., 2009). Les chances de succès sont plus élevées quand la protection est médiée par des anticorps et que la variabilité des Ag est limitée ou nulle. A l'inverse, le risque d'échec est plus important lorsque les Ag sont extrêmement variables et/ou que la protection repose uniquement sur l'immunité médiée par les cellules T.

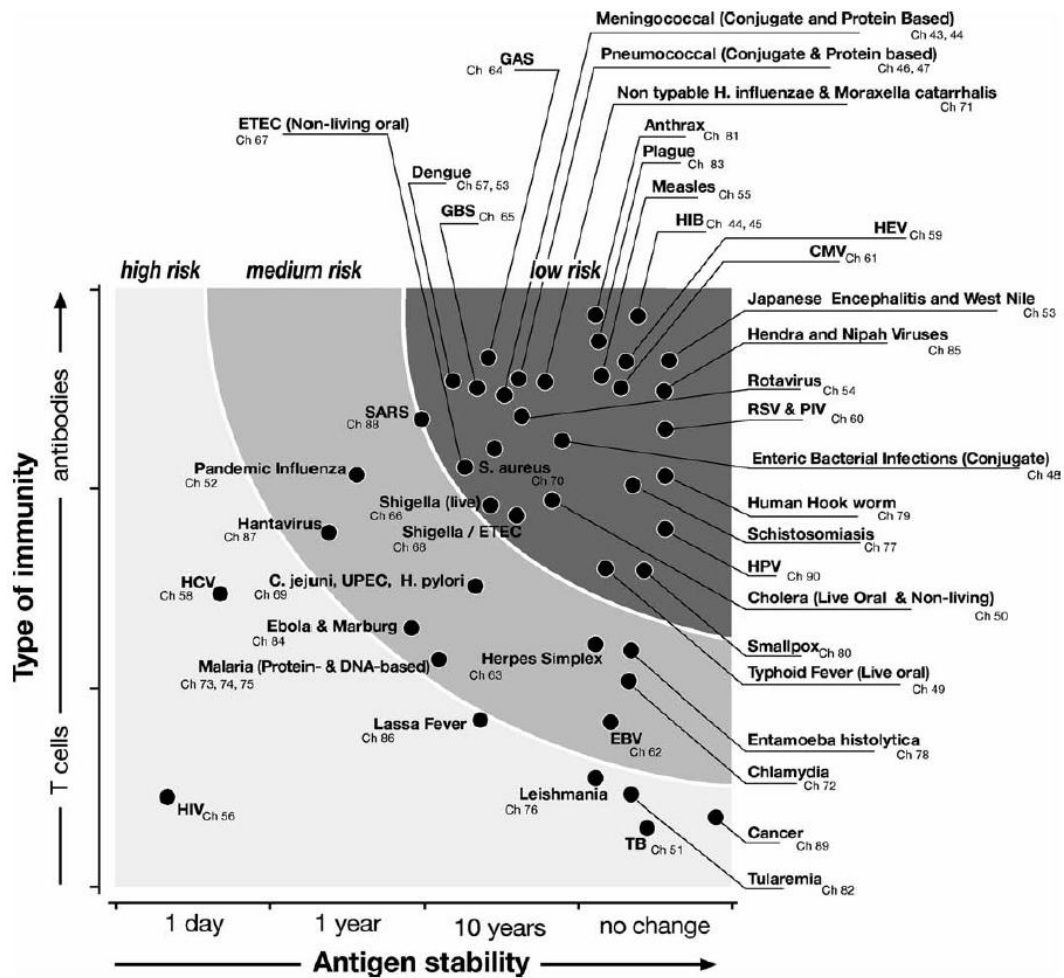


Figure 8 Probabilité de succès des vaccins en fonction du type de réponses nécessaires à la protection et de la variabilité antigénique des pathogènes ciblés

Les vaccins sont classés sur le graphique en fonction (1) du type d'immunité qui est critique pour la protection contre la maladie sur l'axe des y et (2) de la stabilité antigénique sur l'axe des x. Le quadrant en haut à droite représente les vaccins avec un risque faible d'échec au cours du processus de développement. (Levine et al., 2009)

3. ...et de nouvelles approches sont nécessaires pour étendre leur champ d'action et améliorer leurs performances

Face à l'échec des stratégies conventionnelles pour développer de nouveaux vaccins, la vaccinologie a maintenant pour objet de faire émerger des facteurs prédictifs du type d'immunité qu'un vaccin devrait générer, en s'appuyant, en particulier, sur l'étude de plus en plus fine des relations hôte pathogène.

En raison du caractère persistant de certains pathogènes, il n'est pas toujours possible de définir le profil des réponses immunitaires protectrices sur la base des réponses immunitaires naturelles induites au cours d'une infection. En revanche, l'étude des marqueurs associés à une moindre progression de la maladie, dans le cas du VIH, ou qui permettent de distinguer les réponses des individus sains infectés de façon latente, dans le cas de la tuberculose, pourrait guider la conception des vaccins. De nombreuses études s'attachent également à caractériser les réponses biologiques générées par les vaccins existants, afin de mieux comprendre leurs mécanismes protecteurs.

Pour répondre à cette problématique, des approches de biologie intégrative sont de plus en plus utilisées. Cette démarche fait intervenir des techniques de transcriptomique et de métabolomique comparatives, des techniques de marquage par des tétramères, l'ELISPOT, ou encore le marquage intracellulaire des cytokines qui permettent une mesure précise des réponses immunitaires cellulaires induites par les vaccins. Parallèlement, d'intenses recherches sont conduites pour faire émerger de nouveaux systèmes capables de déclencher sélectivement le type de réponses d'intérêt. Je décrirais certains d'entre eux dans le chapitre 6.

D'ores et déjà, grâce aux apports de l'immunologie fondamentale, le développement de vaccins glyco-conjugués a permis une réduction remarquable de maladies causées par des micro-organismes qui colonisent leur hôte de manière continue, comme *Haemophilus influenza*, et un nouveau vaccin permet de prévenir des infections contre certains papilloma virus, des agents qui ne sont généralement pas naturellement éradiqués par le système immunitaire (Germain, 2010).

Pour surmonter les carences des vaccins traditionnels face à la variabilité antigénique des pathogènes, une nouvelle approche visant à rationaliser la sélection des Ag, appelée «vaccinologie inverse», s'est développée. La vaccinologie inverse tire parti de la puissance des techniques de séquençage des génomes microbiens, qui rendent tous les Ag potentiels de

chaque pathogène accessibles, pour sélectionner ceux qui présentent une variabilité limitée ou absente. Ces techniques donnent également accès au répertoire épitopique CD4 et CD8 des pathogènes, ouvrant le champ à la conception de vaccins qui ciblent des réponses T. Grâce à cette nouvelle approche, plusieurs candidats vaccins ont été développés, et certains d'entre eux sont actuellement aux derniers stades des essais cliniques (Rappuoli, 2000).

Selon Rino Rappuoli (Rappuoli, 2007), grâce la combinaison de ces nouvelles approches, dans un futur proche, le champ d'action des vaccins pourrait considérablement s'étendre (Figure 9).

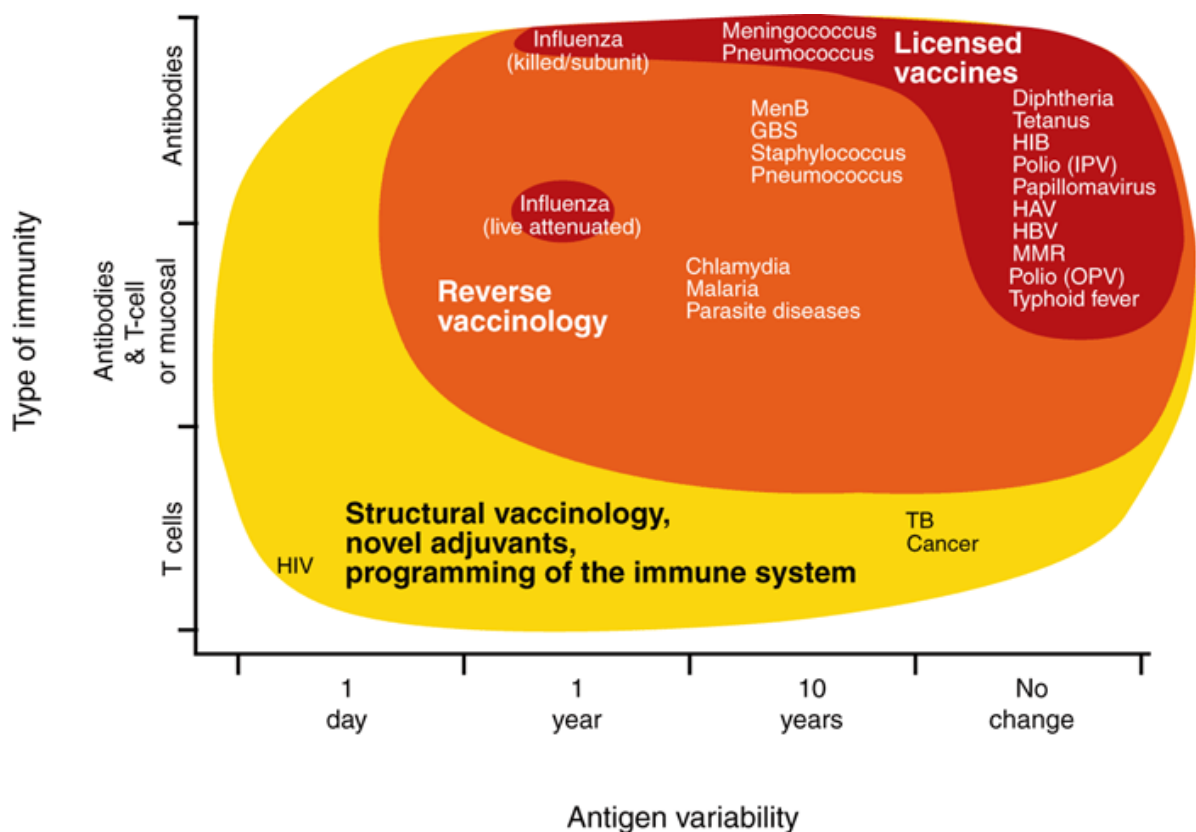


Figure 9 Nouvelles approches pour le développement des vaccins

La vaccinologie inverse pourrait permettre d'étendre de manière considérable le champ couvert par les vaccins (rouge), en recherchant dans le génome des pathogènes des antigènes relativement conservés (orange). Pour les pathogènes situés dans partie inférieure gauche du graphique, pour lesquels les antigènes sont extrêmement variables et la protection repose principalement sur les réponses T, l'amélioration des connaissances en vaccinologie structurale, le développement de nouveaux adjuvants et le développement d'approches permettant de programmer le système immunitaire de manière rationnelle pourraient permettre le développement de nouveaux vaccins (jaune).

MenB, Meningocoque séro groupe B; GBS, group B streptococcus (Rappuoli, 2007)

Parallèlement à ces nouveaux développements, les stratégies d'immunisation, qui étaient jusqu'à présent limitées aux maladies infectieuses, sont désormais envisagées pour une grande variété d'applications. Des approches vaccinales anticancéreuses thérapeutiques et même prophylactiques chez des individus présentant des prédispositions héréditaires au cancer sont actuellement à l'essai (Finn, 2003). Des stratégies d'immunisation avec des fractions de cholestérol, d'amyloïde, de drogues comme la nicotine, la méthamphétamine et la cocaïne ou encore d'hormones sont à l'étude pour contrôler respectivement l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, les addictions aux drogues, ou constituer de nouveaux contraceptifs. (Plotkin, 2005). Enfin, grâce à ses propriétés immunomodulatrices potentielles, l'immunisation est également envisagée pour traiter des maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques, le diabète, ou encore les allergies, via la tolérisation d'auto-Ag ou la modulation des réponses anticorps contre des allergènes (Plotkin, 2005).

Chapitre 4 Sécurité versus immunogénicité : le « dilemme vaccinal »

La sécurité constitue une exigence cruciale pour les vaccins, qui sont presque exclusivement utilisés à des fins prophylactiques. Les premiers vaccins induisaient souvent des réponses immunitaires protectrices à long terme, mais la tolérance était un problème majeur. De nos jours, la mortalité associée à la vaccination est extrêmement faible, mais avec l'augmentation de la couverture vaccinale, et la chute de l'incidence des maladies évitables grâce à la vaccination, le rapport bénéfice/risque des stratégies de vaccination peut évoluer. La nécessité de se faire vacciner devient moins évidente pour le public, et dans le même temps, celui-ci se préoccupe davantage des effets secondaires réels ou supposés des vaccins. Actuellement, il y a donc une demande croissante de sécurité vaccinale, alimentée en partie par les groupes anti-vaccination (Wilson et Marcuse, 2001). L'impact de plusieurs rumeurs sur la couverture vaccinale en est une parfaite illustration : en 1999, une étude britannique qui prétendait avoir établi un lien entre le vaccin rougeole – oreillons – rubéole (ROR) et l'autisme a entraîné une diminution de la couverture vaccinale dans de nombreux pays. Des effets similaires ont été observés en 2002 au Nigéria à la suite d'une rumeur selon laquelle le vaccin antipoliomyélitique oral était administré pour réduire la fertilité des filles. Plus récemment, une étude menée dans le cadre d'une campagne de vaccination contre la grippe H1N1a a montré que la crainte de problèmes de sécurité, en particulier liés à la présence d'un adjuvant jugé dangereux, est à l'origine d'une importante réduction de l'acceptation de la vaccination par les personnes (Ahmed et al., 2011).

Si la plupart des rumeurs qui limitent la couverture vaccinale sont infondées, de réels problèmes de sécurité associés aux vaccins ont toutefois été identifiés, en particulier pour les vaccins atténués. Les pathogènes atténués peuvent dans de rares cas déclencher des infections disséminées, comme cela a pu être observé avec le BCG (Davey, 2009) et ils présentent le risque potentiel de retrouver un certain degré de virulence par mutation ou recombinaison. Pour cette raison, ces vaccins sont contre indiqués chez les personnes immunodéprimées. A l'inverse, les vaccins inactivés ou sous-unitaires préparés à partir de culture de pathogènes sont inertes, mais contiennent également des substances d'origine bactérienne ou virale qui peuvent être la cause d'effets secondaires. Grâce aux nouvelles technologies, les nouveaux vaccins sous-unitaires recombinants sont bien définis au niveau moléculaire et sont de ce fait plus sûrs. C'est pourquoi ces derniers sont privilégiés pour la conception des nouveaux

vaccins, mais également pour remplacer certains vaccins existants. D’ores et déjà, le vaccin contre la coqueluche à germes entiers a été remplacé par un vaccin acellulaire, et le vaccin contre la rage, initialement préparé avec des cerveaux, a été remplacé par un vaccin préparé en culture cellulaire. Dans le futur, le BCG pourrait être remplacé par des vaccins issus de l’ingénierie (Davey, 2009).

Si le recours à des formulations sous-unitaires représente une approche attractive pour améliorer la sécurité des vaccins modernes, cela contribue malheureusement également à altérer leur profil d’immunogénicité (Figure 10). Une série d’observations cliniques et expérimentales montre que les formulations subcellulaires ou sous-unitaires présentent une immunogénicité réduite par rapport aux organismes entiers inactivés, qui présentent eux même une immunogénicité largement inférieure à celle des vaccins vivants atténués. En fait, la plupart des protéines ne sont pas immunogènes lorsqu’elles sont injectées sous forme soluble. Les vaccins commerciaux sous-unitaires composés de protéines doivent donc généralement être administrés en association avec un adjuvant pour déclencher des réponses immunitaires efficaces.

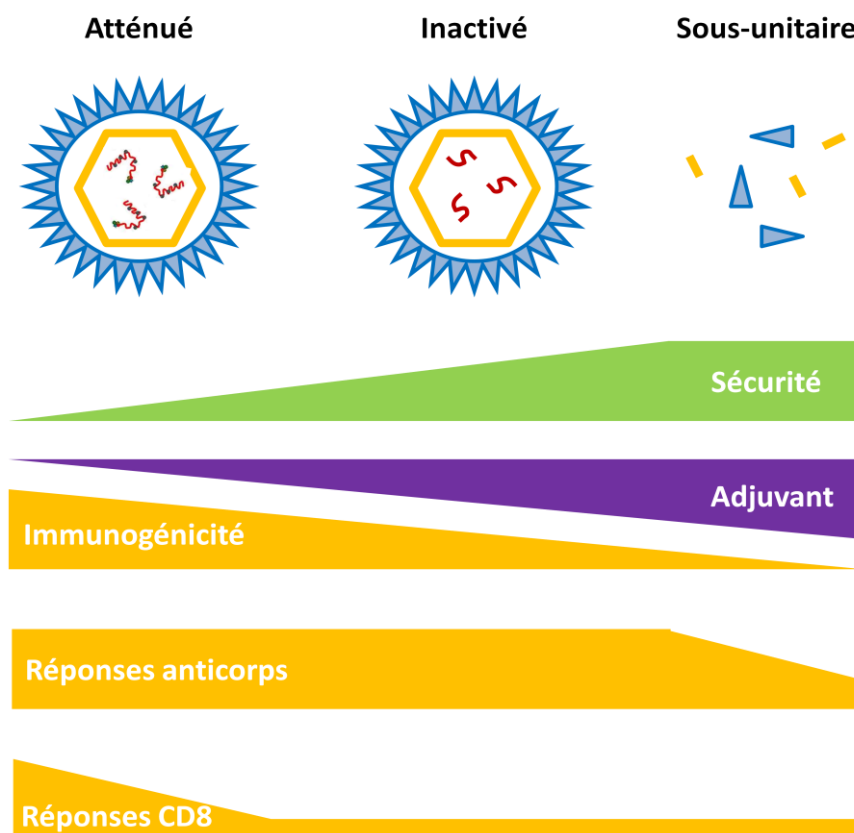


Figure 10 Profil de sécurité et d'immunogénicité des différents types de vaccins

(D'après B. Bellier 2009)

Si la sécurité des adjuvants utilisés Les adjuvants (du latin *adjuvare* qui signifie aide) sont des composés qui ne sont pas intrinsèquement immunogènes, mais qui permettent d'améliorer l'efficacité des vaccins en accélérant, augmentant, prolongeant ou modulant l'intensité et/ou la qualité des réponses immunitaires contre un Ag donné (Wassef et Plaeger, 2002). Les adjuvants sont utilisés depuis le début des années 1920. Leur mode d'action est longtemps resté mystérieux et leur utilisation empirique, mais depuis quelques années, la connaissance de leur mécanisme d'action a été largement améliorée. Des données récentes suggèrent que les adjuvants ont de multiples mécanismes d'action: ils améliorent l'absorption des Ag, activent l'immunité innée de manière dépendante ou indépendante des récepteurs Toll (Toll-like receptor ; TLR) et induisent un recrutement local des cellules effectrices de l'immunité (Tritto et al., 2009). Un grand nombre de substances présentant une activité adjuvante ont été décrites (produits bactériens, sels minéraux, émulsions, microparticules, acides nucléiques, petites molécules, saponines liposomes). Cependant, la grande majorité d'entre elles n'a pas été homologuée pour l'usage chez l'homme, en raison de problèmes de sécurité réels ou hypothétiques. En particulier, la capacité des adjuvants à activer l'immunité innée a fait craindre la possibilité d'un risque accru de maladies auto-immunes. Ces préoccupations sont fondées sur la démonstration, dans des modèles animaux, que l'activation de l'immunité innée, en outrepassant l'action des cellules T régulatrices, peut conduire à une rupture de la tolérance aux Ag du soi. Ce résultat est renforcé par l'observation que certaines infections peuvent, via l'activation d'effecteurs de l'immunité innée, déclencher ou aggraver certaines maladies auto-immunes. Par exemple, des infections virales peuvent déclencher des crises chez des patients atteints de lupus, via l'induction d'IFN de type 1 (Coffman et al., 2010). En réalité, la stimulation de l'immunité innée avec des vaccins sous-unitaires est de courte durée et restreinte au site d'injection et à son drainage lymphatique. De plus, les adjuvants sont conçus pour améliorer la réponse contre des Ag du non-soi et ne sont pas capables de fournir toutes les activités nécessaires pour déclencher l'auto-immunité contre un auto-Ag, même en présence de lymphocytes T autoréactifs. Enfin, les vaccins vivants atténués, qui reposent sur une forte activation de l'immunité innée n'ont pas été associés à un risque accru de maladie auto-immune. (Coffman, Sher, et Seder 2010). Malgré tout, l'utilisation d'adjuvants en vaccination a été limitée à l'Alum. Cet adjuvant, composé de particules de sels d'aluminium, est encore le seul adjuvant homologué aux États-Unis. En Europe, en plus de l'Alum, deux émulsions huile-eau (MF59 et AS03) ont été autorisées, ainsi qu'une combinaison de deux adjuvants (le monophosphoryl lipide A (MPL) et l'hydroxyde d'aluminium) appelée AS04 (Tritto, Mosca, De Gregorio et 2009).

actuellement est jugée satisfaisante, malheureusement, aucun d'entre eux ne permet d'obtenir le degré d'activation immunitaire généré par les vaccins vivants. Les vaccins sous-unitaires nécessitent donc plusieurs injections pour être efficaces, et doivent faire l'objet d'injections de rappel pour maintenir des niveaux suffisants d'anticorps protecteurs à long terme. En effet, en absence d'exposition ultérieure à l'Ag susceptible de réactiver la mémoire immunitaire, les anticorps induits par les vaccins non vivants peuvent s'estomper. Une étude longitudinale a montré que les anticorps sériques initiaux induits par une infection ou une vaccination avec des virus vivants sont stables avec des demi-vies allant de 50 à 200 ans, alors que les anticorps induits par les vaccins à base de protéines ont des demi-vies de 10 à 20 ans (Lanzavecchia et Sallusto, 2009). Quant aux vaccins à base de polysaccharides non conjugués, ils induisent des réponses anticorps à courte durée de vie, et ils ne sont pas capables d'induire de mémoire immunitaire.

La faible immunogénicité des vaccins sous unitaires recombinants représente donc une limite importante à leur développement, et il est clair que les adjuvants actuels ne permettent pas de pallier cette carence. Dans ce contexte, le développement de nouveaux systèmes hautement immunogènes à la fois sûrs et bien tolérés est un enjeu d'importance pour l'industrie du vaccin. Des efforts considérables ont donc été faits pour développer de nouvelles stratégies afin d'améliorer l'immunogénicité des vaccins. Ces efforts se sont largement appuyés sur la connaissance de plus en plus précise des mécanismes qui régissent le déclenchement des réponses immunitaires.

Je consacrerai le prochain chapitre à la description des grands principes de l'induction des réponses immunitaires vaccinales, avant de décrire certaines des approches inspirées de ces connaissances qui sont actuellement à l'étude pour augmenter l'immunogénicité des vaccins.

Chapitre 5 L'induction des réponses vaccinales

1. Les réponses cellulaires T

L'activation des cellules T dépend de la reconnaissance par leur récepteur cellulaire T (TCR) de peptides dérivés de protéines vaccinales liés à des molécules présentatrices CMH I ou CMH II exposées à la surface des CPA. Les CPA comprennent les lymphocytes B, les macrophages ($M\phi$), et les cellules dendritiques (DC). Elles sont au cœur de l'activation des cellules T. Elles capturent les Ag vaccinaux, les apprêtent et les présentent à leur surface aux cellules T. D'autre part, elles intègrent et restituent les signaux inflammatoires issus de la préparation vaccinale sous forme de signaux de co-stimulation qui permettent d'activer pleinement les cellules T et modulent leur engagement dans les voies de différenciation appropriées. A ce titre, elles constituent un véritable pont entre immunité innée et adaptative.

1.1. Les voies de présentation de l'Ag

1.1.1. La présentation de l'Ag par les molécules CMH II

Les molécules CMH II présentent essentiellement des peptides dérivés d'Ag exogènes capturés par les CPA aux cellules T $CD4^+$, bien que des voies de présentation d'Ag endogènes aient été décrites (Vyas et al., 2008).

a) Capture des Ag

Les DC sont capables d'endocyter un large panel d'Ag via de nombreux mécanismes d'endocytose (pinocytose ou phagocytose, médiées ou non par des récepteurs), et sont très efficaces pour présenter les Ag aux cellules T. A l'inverse, les $M\phi$ ne sont pas très efficaces pour la présentation antigénique, malgré leur forte capacité d'endocytose. Ils ont en effet la capacité de capturer un large spectre d'Ag par phagocytose, par pinocytose non spécifique ou par pinocytose médiée par des récepteurs (par exemple les récepteurs $Fc\gamma$, et de nombreuses lectines comme le récepteur au mannose). Ces cellules jouent en revanche un rôle important dans l'activation des réponses immunitaires innées qui sont indispensables pour l'activation des réponses cellulaires T. Les lymphocytes B ont une capacité d'endocytose limitée (Paul, 2008). Ils ne sont en général pas capables de phagocyter des particules de grande taille, et sont assez peu efficaces pour la capture d'Ag par micro-pinocytose. Cependant, les lymphocytes B

internalisent très efficacement les Ag solubles qui se lient de manière spécifique à leurs Ig de surface. La spécificité de l'Ig pour un Ag donné permet de concentrer cet Ag et de le présenter aux cellules T à des doses 1000 fois inférieures à celles qui seraient nécessaires si le lymphocyte B n'était pas spécifique de l'Ag (Paul, 2008). Les lymphocytes B expriment également des récepteurs Fc γ qui pourraient en principe permettre à n'importe quel complexe immun d'être internalisé et présenté. Cependant, un épissage alternatif des ARNm rend ces récepteurs incompétents pour médier une endocytose efficace pour la présentation antigénique. La capacité d'internalisation des cellules B se limite donc à un seul type d'Ag, correspondant à leur spécificité (Paul, 2008).

b) Génération des peptides antigéniques

Les différents modes d'internalisation d'Ag conduisent à la formation d'endosomes ou de phagosomes, qui constituent les premiers compartiments d'endocytose. La voie d'endocytose est composée d'une succession de vésicules (endosomes précoces, endosomes tardifs et lysosomes) qui présentent une acidité croissante depuis la membrane plasmique vers le centre de la cellule (Figure 11). La fonction première du compartiment endosomal/lysosomal tardif est de dégrader les protéines en acides aminés, grâce une grande variété d'enzymes protéolytiques parmi lesquelles on retrouve l'enzyme non protéasique GILT (gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase), et les cathepsines qui regroupent des protéases à cystéine, des protéases à aspartate, et l'Asparaginyl EndoProtease (AEP). Dans cet environnement, les peptides antigéniques sont donc voués à la destruction. La capacité des CPA à présenter les épitopes antigéniques est donc liée à leur capacité à préserver ces épitopes, et donc à l'intensité de leur activité protéasique. Les M ϕ expriment des niveaux très élevés de protéases lysosomales, ce qui leur confère une capacité d'élimination rapide des Ag capturés mais peut limiter la génération de peptides antigéniques en raison d'une destruction prématurée. A l'inverse, les DC et les cellules B contiennent de faibles taux de protéases, et présentent une capacité de dégradation des Ag réduite. Cette propriété permet également aux DC de séquestrer les Ag capturés pendant plusieurs jours, ce qui prolonge leur capacité de présentation antigénique. (Delamarre et al., 2005). Cette caractéristique est l'une des raisons qui font des M ϕ des cellules mieux adaptées à l'élimination des pathogènes capturés qu'à leur présentation aux cellules T par rapport aux DC et aux cellules B.

c) Assemblage des complexes CMH II-peptide

Les molécules CMH II sont synthétisées et assemblées dans le réticulum endoplasmique (RE) où elles s'associent à la chaîne chaperonne invariante Ii (Figure 11). La

chaîne Ii contribue à l'assemblage et à la stabilisation de la molécule CMH-II, prévient son chargement prématuré par des peptides dans le RE et favorise son transport vers les voies endosomales où le chargement des peptides antigéniques a lieu. Tandis que les molécules progressent à travers les voies d'endocytose via les lysosomes, la chaîne Ii est progressivement dégradée, et seul un peptide temporaire, appelé CLIP (class II associated invariant chain peptides), reste dans le sillon peptidique de la molécule CMH II. La dissociation du peptide CLIP, catalysée par la chaperonne DM, permet de démasquer le site de liaison du CMH-II au peptide et supprime le signal de rétention dans les endosomes. La molécule peut alors s'associer à un peptide antigénique et migrer vers la membrane cellulaire (Figure 11).

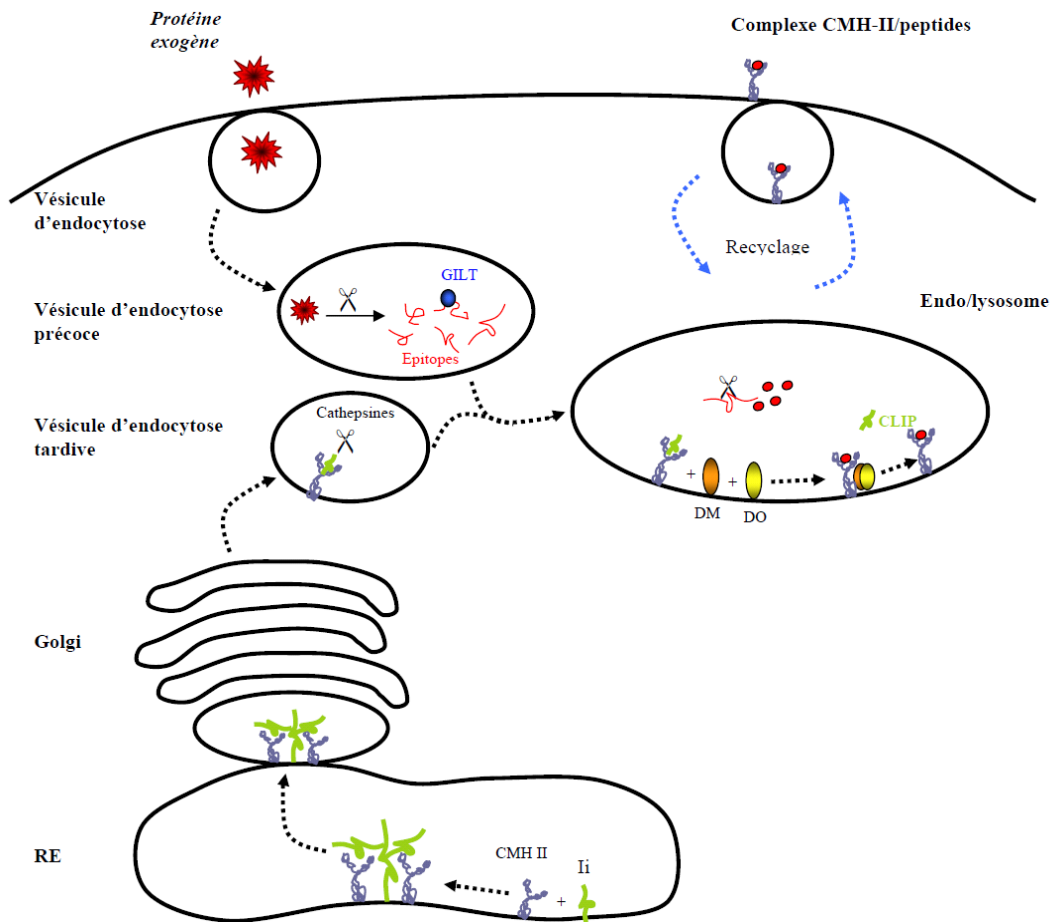


Figure 11 Apprêtement et présentation des Ag sur les molécules CMH-II

Dans le réticulum endoplasmique (RE), les molécules CMH-II nouvellement synthétisées s'associent à la chaîne invariante Ii. Ce complexe est importé dans l'appareil de Golgi, puis dans des vésicules d'endocytose. Parmi les enzymes protéolytiques impliquées dans la dégradation des Ag on retrouve les cathepsines, l'AEP (*Asparaginyl EndoProtease*) ou encore l'enzyme non protéasique GILT (*gamma*interferon- inducible lysosomal thiol reductase). Dans les endo/lysosomes, le peptide CLIP est progressivement remplacé par des peptides issus de dégradation protéique. Les molécules CMH-II chargées en peptide sont ensuite externalisées. (D'après Bowers, *Microbiology and Immunology on line*, 2004)

d) Régulation de la capture, de l'apprêtement et de la présentation de l'Ag dans les DC

A l'état basal, les DC se comportent comme des sentinelles. Elles présentent un phénotype dit « immature » qui se caractérise par une activité d'endocytose importante et une faible capacité d'apprêtement et de présentation des Ag. Dans les DC immatures, l'activité protéasique est limitée, et les molécules CMH II sont retenues et éventuellement dégradées dans les lysosomes, ou ubiquitinylées et conduites vers les voies de dégradation lorsqu'elles atteignent la membrane plasmique. En revanche, sous l'influence des stimuli inflammatoires et microbiens, les DC subissent un véritable processus de différenciation qui s'accompagne d'une réorganisation structurale très importante des cellules et change de manière drastique leurs capacités de capture et de présentation des Ag. Au cours de ce processus, les DC réduisent leurs capacités d'endocytose, augmentent leurs activités protéolytiques endosomales et régulent le trafic des molécules CMH II. Après maturation, des tubules lysosomaux se forment et se déplacent de manière rétrograde pour fusionner directement avec la membrane plasmique, favorisant le recyclage membranaire des lysosomes qui est conventionnellement considéré comme inefficace. En présence de cellules T spécifiques, ces tubules peuvent même être ciblés spécifiquement à l'interface DC-T (Boes et al. 2002), facilitant la présentation de l'Ag aux cellules T. L'ubiquitination des molécules CMH II ne se produit plus, ce qui entraîne leur accumulation à la surface des DC (Shin et al. 2006;van Niel et al. 2006).

1.1.2. La présentation de l'Ag par les molécules CMH I

Les molécules CMH I présentent principalement des peptides issus de la dégradation de protéines cytosoliques, qui peuvent être des protéines de l'hôte normales ou mutées, ou des protéines d'origine microbienne. Les molécules CMH I peuvent également présenter des peptides dérivés de protéines exogènes via un processus appelé présentation croisée.

a) La présentation CMH I classique

(1) Génération des peptides antigéniques

Les peptides présentés par les molécules CMH I sont essentiellement générés par la voie de dégradation cytosolique du protéasome. Le protéasome constitutif 26S reconnaît des substrats protéiques conjugués à l'ubiquitine grâce au complexe régulateur 19S, et catalyse leur protéolyse grâce à la particule core 20S. En présence d'IFN γ , de nouvelles sous-unités catalytiques remplacent leurs homologues basales pour constituer l'immunoprotéasome. Ce

processus altère qualitativement l'activité du protéasome en modulant la spécificité des clivages. En particulier, les clivages entre les résidus basiques et hydrophobes qui lient les molécules CMH I de façon préférentielle sont favorisés, augmentant ainsi la production de peptides antigéniques. Le protéasome génère des peptides dont la taille varie entre 2 à 25 acides aminés. Les peptides de 8 à 10 acides aminés sont capables de lier les molécules CMH I de façon stable. Aussi, pour pouvoir devenir des épitopes CMH I potentiels, les peptides plus longs peuvent subir une digestion supplémentaire grâce à des aminopeptidases et à des endopeptidases cytosoliques telles que la peptidase LAP (Leucine AminoPeptidase), la bleomycine hydrolase (BH), l'aminopeptidase sensible à la puromycine (PSA) et la peptidase TOP (Thimetoligoendopeptidase). Une digestion supplémentaire peut également avoir lieu dans le RE, grâce à une autre peptidase appelée ERAAP (aminopeptidase associated with Ag processing in the endoplasmic reticulum) (Paul, 2008). Grâce à des expériences d'inhibition des protéasomes, une voie alternative de génération de peptides antigéniques, impliquant la tripeptidyl peptidase II (TPPII) a été mise en évidence (Tomkinson et al., 1987). Cette peptidase peut également agir en aval du protéasome 26S.

(2) Transport des peptides et assemblage des complexes CMH I/peptide dans le réticulum endoplasmique

Les peptides générés dans le cytosol sont pris en charge par des protéines « heat shock » (HSP70 et HSP90) qui les protègent d'une dégradation supplémentaire et participent à leur transport jusqu'au RE, où l'assemblage des complexes CMH I/peptide a lieu (Srivastava et al. 1994). L'accès des peptides au RE se fait grâce à un transporteur appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) appelé TAP (transporter associated with antigen processing) qui est capable de lier spécifiquement des peptides de 8 à 16 acides aminés présentant des résidus particuliers au sein de leur séquence peptidique (Uebel and Tampe, 1999 ; van Endert et al., 1995). L'assemblage des complexes peptide/CMH I est un processus complexe qui requiert des molécules chaperonnes (calnexine tapasine, calréticuline et Erp57) qui aident au repliement de la chaîne lourde de la molécule CMH I, à sa liaison à la β_2 -microglobuline (β_2m), et au chargement du peptide. Une fois formés, les complexes sont acheminés vers la surface des cellules grâce à un transport vésiculaire (Figure 12).

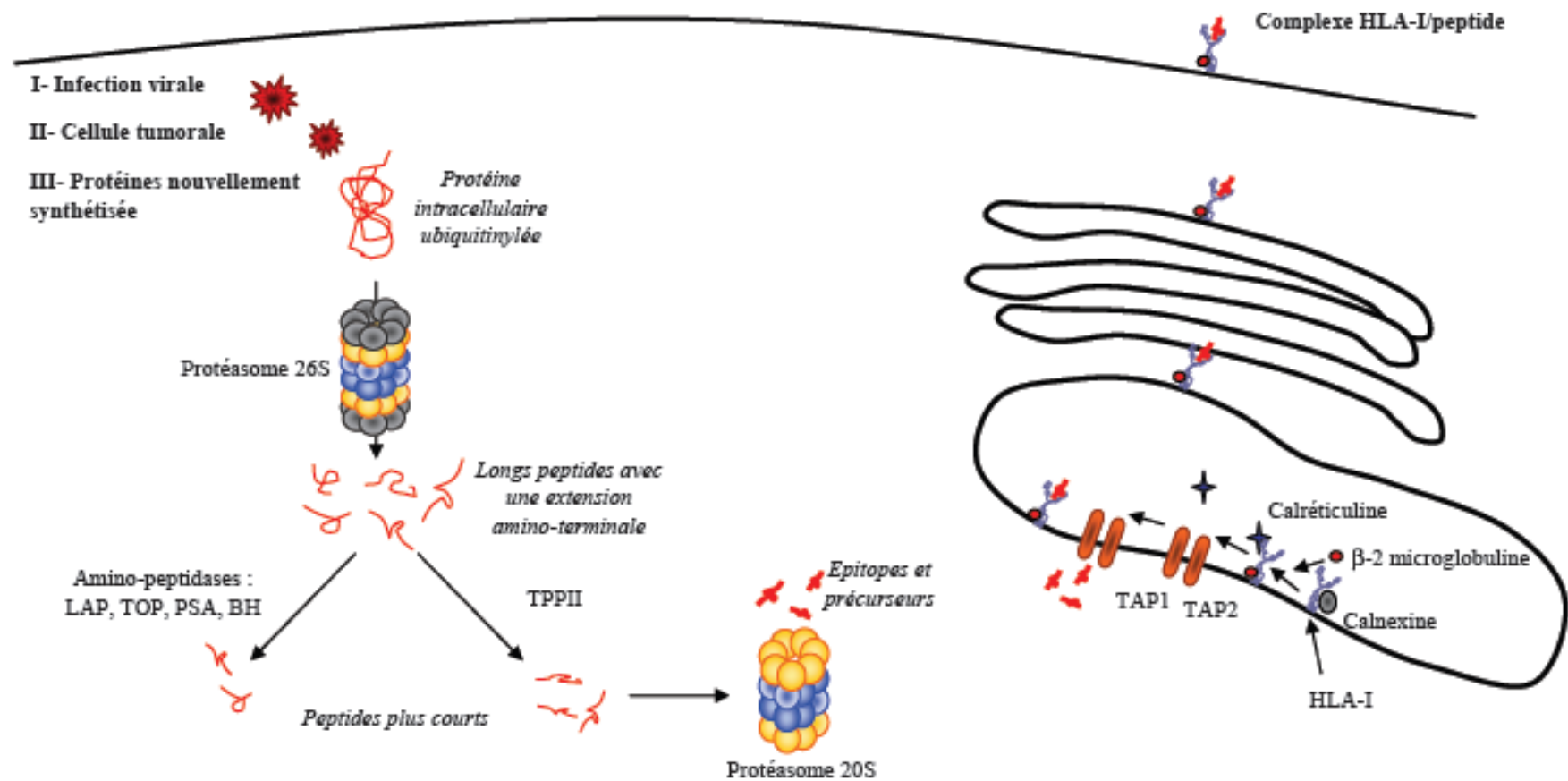


Figure 12 Apprêtement et présentation des Ag endogènes sur les molécules CMH-I

(D'après Bowers, Microbiology and Immunology on line, 2004)

b) *La présentation croisée*

Les modalités de la voie de présentation CMH I classique restreignent la capacité d'induction des cellules T CD8⁺ cytotoxiques aux seuls vaccins capables de délivrer les Ag dans le cytosol des CPA, et donc majoritairement aux vaccins vivants capables d'infecter ces cellules. Cependant, il existe un processus qui permet naturellement aux CPA de présenter des Ag d'origine extracellulaire sur les molécules CMH I (Carbone et Bevan, 1990). Ce processus est appelé présentation croisée. De façon remarquable, les modalités de la présentation des protéines par la voie de présentation classique ou la voie de présentation croisée sont différentes, et par conséquent le répertoire de peptides présenté par le CMH I pourrait être influencé par les voies qu'elles suivent (Paul, 2008).

In vitro, les Mφ et les DC sont les principales cellules capables de présenter des peptides dérivés d'Ag exogènes sur des molécules CMH I (Norbury et al., 1997), mais récemment, il a été suggéré que les cellules B pouvaient également faire de la présentation croisée (Heit et al., 2004 ; Tobian et al., 2005). En revanche, les DC sont les plus efficaces dans ce processus, et leur rôle semble prédominer *in vivo*. En effet, des expériences murines de déplétion des DC CD11c⁺ *in vivo* a pour conséquence l'abolition de l'activation des cellules T CD8⁺ spécifiques d'Ag strictement dépendants de la présentation croisée (Jung et al., 2002). Il semble que la phagocytose soit la voie d'internalisation privilégiée pour la présentation croisée des peptides issus de protéines exogènes, mais des données montrent que les peptides antigéniques peuvent également être transférés du cytosol d'une cellule directement dans le cytosol de cellules avoisinantes à travers les jonctions gap. (Neijssen et al., 2005). Des études montrent que des protéines intactes et stables dérivées de cellules apoptotiques constituent la source principale d'Ag qui suivent la voie de présentation croisée *in vivo* (Shen et Rock, 2004)

Après leur capture par les CPA, les Ag peuvent rejoindre les voies de présentation CMH I grâce à deux mécanismes (Figure 13). La première voie, dite voie vacuolaire, est indépendante de l'activité du protéasome et de TAP. La seconde voie est dépendante de TAP. Il semble que la nature de l'Ag influence son destin intracellulaire après sa capture. Par exemple, l'ovalbumine soluble ou liée à des billes de latex est présentée de manière protéasome et TAP dépendante, tandis que le même Ag incorporé dans des microsphères composées de copolymère biodégradable est présenté par une voie TAP-indépendante (Shen et al., 2004). La voie vacuolaire implique la protéolyse de l'Ag et le chargement du peptide sur les molécules du CMH I dans les compartiments d'endocytose. Des études montrent que

la génération des Ag peptidiques dépend de l'activité de la cathepsine S, qui est une protéase lysosomale (Shen et al., 2004). Ce mécanisme implique également que les molécules de CMH I soient adressées vers le compartiment d'endocytose, une propriété probablement médiée par un signal tyrosine présent dans leur queue cytoplasmique (Lizée et al., 2003). En revanche, le mécanisme qui permet aux peptides générés d'être chargés sur les molécules CMH I dans les compartiments d'endocytose, qui sont généralement dépourvus de la panoplie de chaperonnes impliquées dans la formation des complexes peptides-CMH I dans le RE est mal compris.

Dans la voie TAP-dépendante, les Ag capturés sont transférés des vésicules d'endocytose vers le cytosol pour y subir une protéolyse médiée par le protéasome, avant de rejoindre les molécules CMH I en suivant la voie classique. La manière dont les Ag rejoignent le cytosol n'est pas claire. Une possibilité est que les vésicules endosomales fuient ou se rompent, déversant leur contenu dans le cytosol. La rupture expérimentale des vésicules d'endocytose a longtemps été connue pour induire la présentation croisée Ag internalisés (Moore et al., 1988). Une autre possibilité est le transport sélectif d'Ag exogènes depuis les compartiments d'endocytose vers le cytosol via des molécules transporteuses spécifiques (Rodriguez et al., 1999). Il a été proposé que la présentation croisée implique la fusion directe des phagosomes ou des macropinosomes avec le RE (Ackerman et al., 2003;Guernonprez et al., 2003;Houde et al., 2003;Ackerman et al., 2005). En conséquence, les protéines endocytées auraient accès à la machinerie ERAD (ER-associated degradation) requise pour leur relargage dans le cytosol, et ainsi à la machinerie d'apprêtement CMH I (Ackerman et al., 2006). Ce modèle a cependant été remis en cause par une autre étude (Touret et al., 2005).

L'activité protéasique lysosomale est un important régulateur de la présentation croisée. En effet, la fonction première des protéases lysosomales est de dégrader les protéines en acides aminés, et la limitation de leur activité permet de préserver les Ag internalisés avant leur délivrance dans le cytosol. Ainsi, la diminution artificielle de l'acidification des compartiments endosomaux augmente le transfert des Ag endocytés vers le cytosol et augmente leur présentation croisée (Accapezzato et al., 2005). De la même manière, il a été montré que dans les DC, les phagosomes recrutent NOX2 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) pour neutraliser le pH phagosomal et promouvoir la présentation croisée (Savina et al., 2006). Le ciblage de l'Ag vers les endosomes recyclant faiblement les protéases pourrait également favoriser la présentation croisée, probablement en séquestrant les Ag hors de la dégradation lysosomale (Burgdorf et al., 2007).

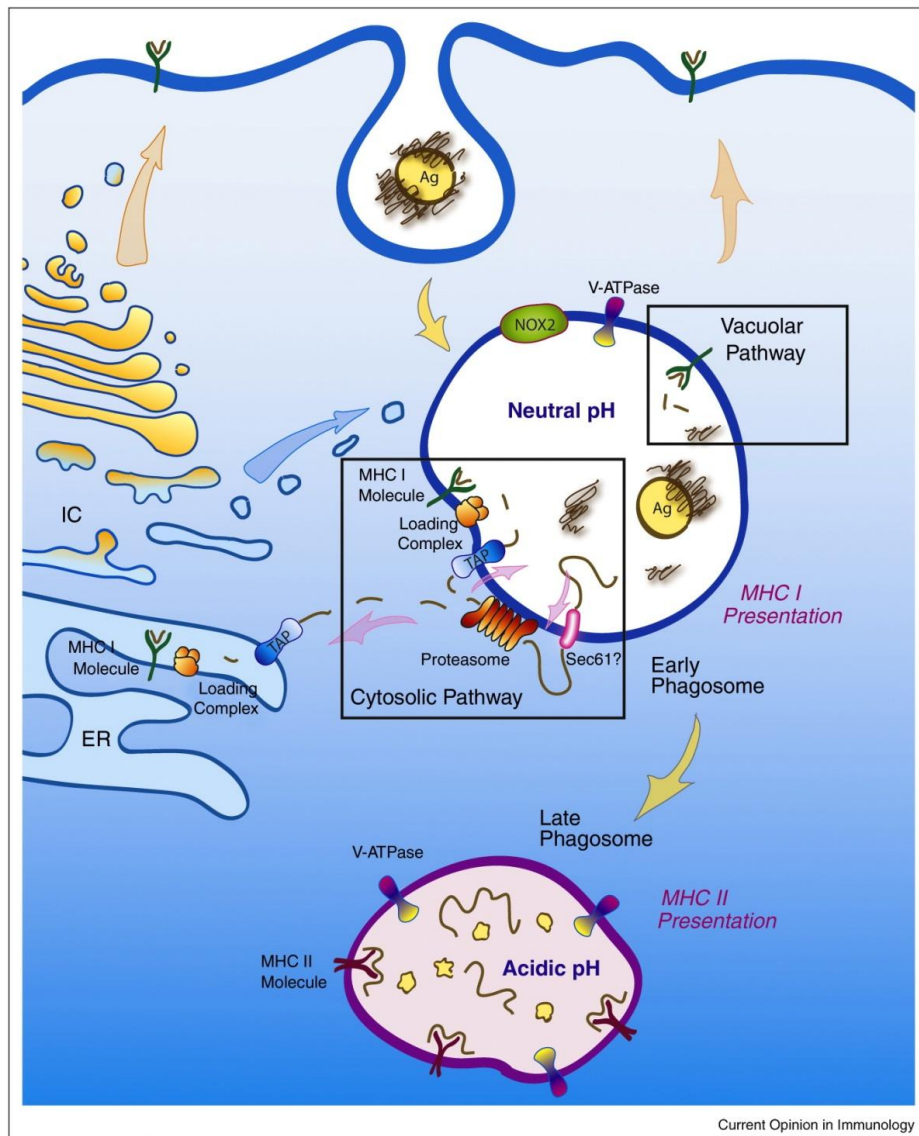


Figure 13 Apprêtement et présentation des Ag exogènes sur les molécules CMH-I : la « présentation croisée »

Selon la voie dite vacuolaire de présentation croisée, les protéines contenues dans les phagosomes peuvent être dégradées en peptides directement dans ce compartiment par des protéases phagosomiques avant d'être associées aux molécules du CMH de classe I. Selon la voie cytosolique, les protéines phagosomiques rejoignent le cytosol, probablement via Sec61b, où elles sont dirigées vers le protéasome et dégradées. Les peptides résultants peuvent soit être transloqués dans le RE et suivre la voie endogène de chargement sur les molécules CMH-I ou bien être réimportées vers le compartiment d'endocytose pour être chargés sur les molécules CMH-I. Tandis que les endosomes et les phagosomes mûrissent, la présence de protéines dérivées du RE diminue, le pH diminue et le niveau de protéolyse augmente. Les compartiments deviennent incompetents pour la présentation croisée, mais acquièrent les caractéristiques environnementales nécessaires pour le chargement des peptides sur les molécules CMH-II. (Amigorena et Savina, 2010)

1.2. Les mécanismes d'activation des cellules T

Les modalités d'activation des cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ sont similaires et consistent en l'intégration de signaux d'activation provenant des CPA. Ces signaux incluent la reconnaissance d'un complexe peptide antigénique-CMH, ainsi que des signaux co-stimulateurs et des cytokines. L'aide des cellules T CD4⁺ est reconnue comme un élément majeur dans l'activation des cellules T CD8⁺ Ag-spécifiques. (Beuneu et al., 2006)

1.2.1. Le dialogue T-DC

L'activation des lymphocytes T naïfs par les CPA a lieu dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires. Il existe au moins deux voies de transport des Ag vaccinaux vers les organes lymphoïdes secondaires. Tout d'abord, les Ag peuvent être drainés à travers les canaux lymphatiques afférents et parvenir en quelques heures dans les sinus sous-capsulaires des ganglions lymphatiques drainants. Ils sont ensuite canalisés vers la zone T par un réseau complexe de tubes fermés composés de fibres de collagène enveloppés d'une couche de cellules réticulaires fibroblastiques (FRCs). Ils sont alors captés, apprêtés et présentés aux cellules T par les DC résidentes qui interagissent physiquement avec les canaux (Pape et al., 2007). Plus lentement, entre plusieurs heures et quelques jours, les Ag vaccinaux peuvent être présentés par des DC CCR7⁺ qui, sous l'influence des signaux inflammatoires présents dans la préparation vaccinale, mûrissent et migrent à partir du site d'injection vers les ganglions drainants via les vaisseaux lymphatiques (Cyster, 2005). Les vaccins vivants ont une capacité de dissémination et de réplication qui leur permet d'activer des DC dans de multiples sites, créant ainsi de multiples foyers d'activation des cellules T dans plusieurs ganglions drainants. A l'inverse, en absence de réplication microbienne, les vaccins non vivants activent essentiellement des réponses immunitaires innées au niveau de leur site d'injection, et présentent un profil d'activation limité, au niveau temporel comme au niveau spatial. Pour ces vaccins, le site et la voie d'administration sont donc particulièrement importants, contrairement aux vaccins vivants, pour lesquels ce paramètre n'est pas décisif.

A l'intérieur des zones riches en cellules T des organes lymphoïdes secondaires, les cellules T naïves se déplacent rapidement et de manière aléatoire et sondent les DC résidentes ou fraîchement arrivées, à la recherche du ligand de leur récepteur à l'Ag. Les cellules T naïves qui n'ont pas rencontré leur ligand après plusieurs heures quittent le ganglion et commencent un nouveau cycle de surveillance dans un autre organe lymphoïde secondaire. A

l'inverse, les cellules T naïves exposées à des DC matures présentant des complexes peptide /CMH établissent un véritable dialogue avec les DC avec lesquelles elles établissent des contacts forts et de plus en plus longs (Miller et al., 2002; Bousso et Robey, 2003).

1.2.2. Les étapes moléculaires de l'activation des cellules T

La reconnaissance par le TCR des complexes CMH-peptide antigénique constitue le premier signal d'activation des cellules T. Ce premier signal, s'il n'est pas soutenu par un signal de co-stimulation, entraîne l'apoptose ou l'anergie de la cellule T. Le second signal est délivré par des molécules de co-stimulation exprimées par les CPA en réponse aux stimuli inflammatoires associés à l'Ag vaccinal. Parmi ces molécules on trouve les récepteurs de la famille B7, (B7-1 ou CD80, et B7-2 ou CD86) et le récepteur CD40. Les récepteurs B-7 et CD40 sont respectivement engagés par le récepteur CD28 et le ligand CD40L exprimés par les cellules T. Cet événement, associé à une liaison suffisante des molécules TCR aux complexes peptides étranger/CMH entraîne une augmentation de la sécrétion de l'IL-2 (Wells et al., 1997) et de l'expression de son récepteur associé (Shahinian et al., 1993), ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-XL dans les cellules T (Boise et al., 1995). L'engagement du récepteur CD28 peut également induire l'expression de récepteurs pour d'autres molécules de co-stimulation (OX40L, 4-1BBL et ICOSL). Ces événements favorisent respectivement la prolifération (Schwartz, 1992) et la survie des lymphocytes activés (Boise et al., 1995) et permettent la mise en place de l'expansion clonale. L'activation des cellules T est modulée par la quantité et la qualité des interactions dictées par l'engagement du TCR et des molécules de co-stimulation. Afin d'éviter un emballement du système immunitaire, la molécule CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CD152), qui présente des homologies avec CD28 et qui peut ainsi interagir avec les molécules B7, délivre un signal inhibiteur aux LT activés, limitant alors leur prolifération (Chambers et al., 2001).

L'ensemble des molécules de signalisation nécessaires à l'activation des cellules T se structure au sein d'un complexe moléculaire appelé synapse immunologique, qui se forme au niveau de la zone de contact entre la DC mature et la cellule T (Figure 14) (Cemerski et Shaw, 2006). Ce phénomène a pour effet de stabiliser l'interaction cellule T-CPA pendant quelques minutes à plusieurs heures, favorisant l'activation de la cellule T (Celli et al., 2008). Au sein de la synapse immunologique, les molécules intervenant dans la signalisation de la cellule T, comprenant TCR et CD28, en contact avec leurs ligands sur la cellule présentatrice, sont organisées en cluster entouré d'un anneau contenant des molécules d'adhérence comme LFA-

1, également en interaction avec leur ligand sur la CPA, et des récepteurs de chimiokines et de cytokines. En parallèle, les molécules intervenant dans la répulsion intercellulaire, comme CD43 ou possédant des effets inhibiteurs comme CD45, sont repoussées en périphérie de la synapse, ou migrent vers le pôle distal de la cellule T, en dehors de la zone de contact. (Maldonado et al., 2004)(Molon et al., 2005). Ces mouvements sont dépendants de l'activité du cytosquelette et facilités par la coalescence de radeaux lipidiques. D'autres réorganisations cellulaires s'opèrent dans la cellule T lors de cette interaction avec les DC : le centre organisateur des microtubules et l'appareil de Golgi sont polarisés vers le site de contact, facilitant la sécrétion directionnelle d'IL-2 et d'IFN- γ au niveau de la zone de contact entre cellule T et DC (Huse et al. 2006;Reichert et al. 2001).

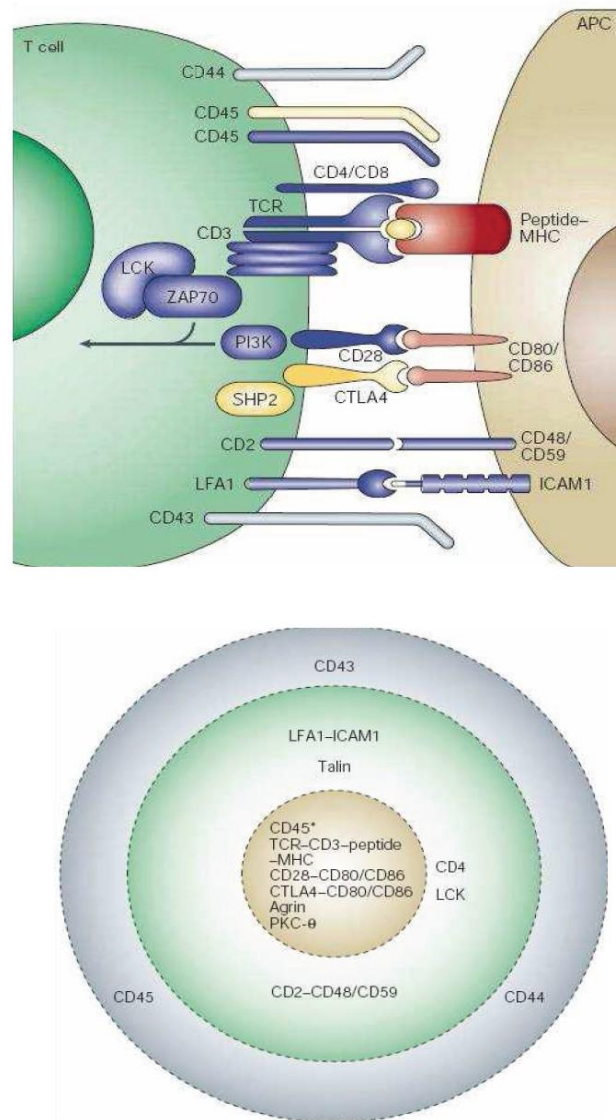


Figure 14 Vue générale de la synapse immunologique mature

D'après Huppa et al., 2003

1.2.3. Après activation des cellules T : instruction et orientation

Bien que des différences entre les effecteurs matures $CD4^+$ et $CD8^+$ soient évidentes, la stratégie globale pour les deux types cellulaires est similaire : une fois activées, les cellules T naïves subissent un processus de division et de différenciation régulé, qui coordonne l'acquisition d'informations migratoires vers les sites d'infection et d'inflammation et l'acquisition de fonctions effectrices spécifiques. Les DC et le reste du milieu cellulaire/soluble des organes lymphoïdes secondaires sont responsables de ce procédé de coordination, bien que les signaux spécifiques ne soient pas encore entièrement connus (Paul, 2008).

a) *L'acquisition des marqueurs d'adressage vers les tissus cible*

Les cellules T effectrices fraîchement activées doivent être capables de migrer de façon appropriée vers les tissus infectés ou enflammés pour exercer leurs fonctions (Mora et von Andrian, 2006). Cela est favorisé par la perte des récepteurs de homing vers les organes lymphoïdes secondaires, comme CD62L et CCR7, et l'acquisition d'un nouvel éventail de molécules, comme PSGL-1, CD44, CCR5, et CXCR3, qui lient des ligands dans les tissus enflammés et des marqueurs spécifiques des tissus cibles. Par exemple, une cellule T effectrice migrant vers la peau peut exprimer le cutaneous leukocyte antigen. Ce système de « code barre » permettant l'adressage des cellules T dans les tissus spécifiques est le reflet de l'histoire des CPA responsables de leur activation : les DC intestinales induisent par exemple des récepteurs de homing intestinal, et les DC cutanées des récepteurs de homing vers la peau (Mora et al., 2003; Mora et al., 2005). Les cellules T $CD4^+$ ThF restent dans le ganglion lymphatique et migrent vers les follicules B pour exercer leurs fonctions auxiliaires (Campbell et al., 2001).

b) *Les mécanismes de polarisation des cellules T*

La différenciation des cellules T $CD4^+$ naïves en cellules effectrices Th1, Th2, Tfh, Th17 ou Treg est sous le contrôle de nombreux facteurs, incluant la dose d'Ag (les doses de vaccin plus faibles étant préférentiellement associées à des réponses Th1), et la voie d'administration, qui détermine le ciblage différentiel des différentes populations de DC (Plotkin et al., 2008). Néanmoins, le principal déterminant de la différenciation des cellules T $CD4^+$ est le niveau et le type d'activation des DC par le système immunitaire inné. Les DC répercutent les signaux inflammatoires de la préparation vaccinale qu'elles reçoivent au cours des étapes précoces de la stimulation par les immunogènes en exprimant de manière

combinatoire des cytokines, des molécules de co-stimulation et des ligands de Notch. Ainsi, différents types de cellules effectrices sont induites par les DC en réponse à des signaux de danger, et à l'inverse, des cellules Treg peuvent être induites de manière spécifique par des DC qui capturent l'Ag en absence de signaux de danger (Plotkin et al., 2008). Ces cellules peuvent limiter l'efficacité des vaccins quand les signaux de dangers ne sont pas suffisants pour générer une immunité, par exemple dans le cadre des infections chroniques ou des cancers. Cela a été formellement démontré chez l'homme, où une augmentation des réponses vaccinales anti-cancer a été observée après déplétion des cellules Treg (Dannull et al., 2005). Les voies de signalisation critiques pour obtenir les différents sous types de cellules T auxiliaires ne sont pas encore entièrement connues, mais plusieurs régulateurs positifs et négatifs ont été définis et sont résumés dans la Figure 15.

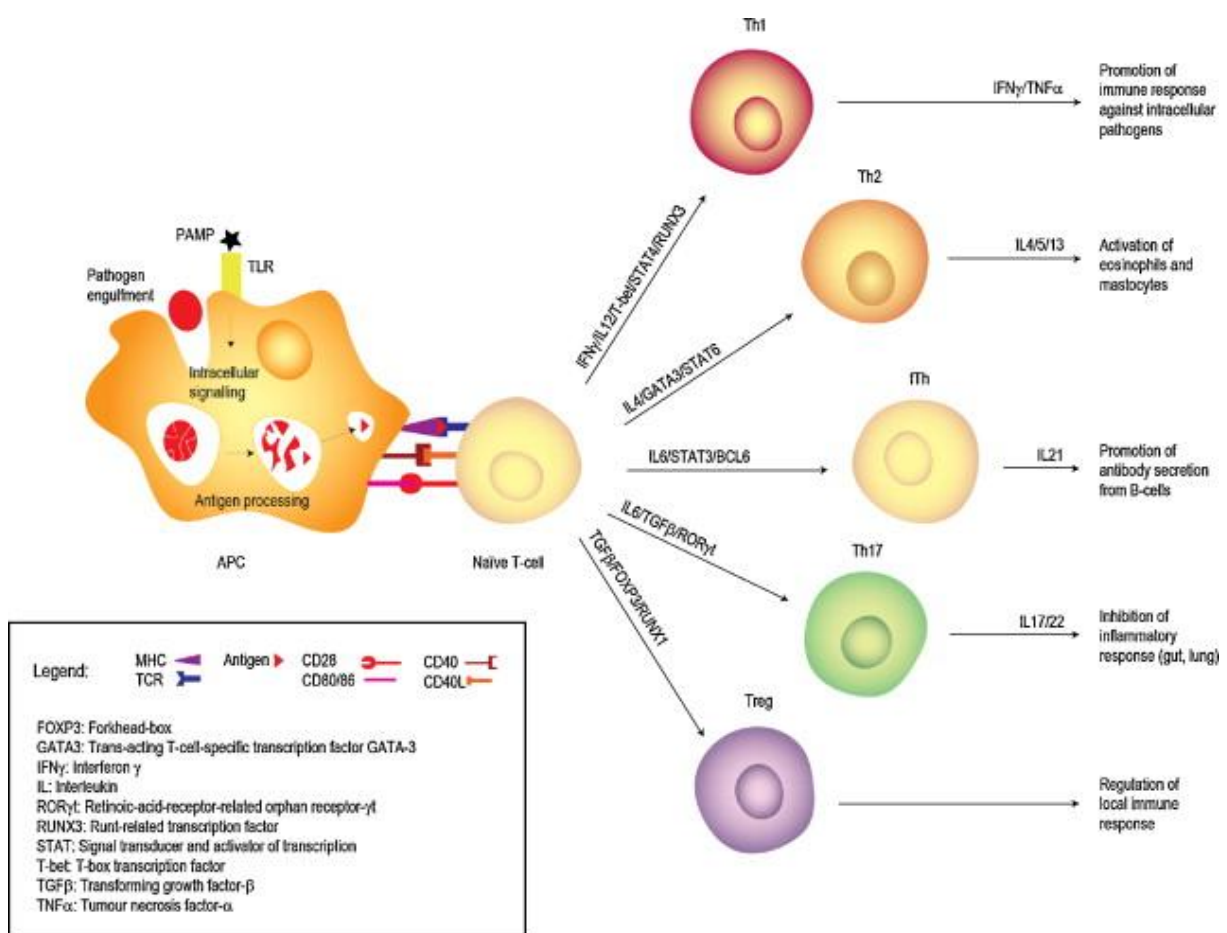


Figure 15 Les sous types de cellules T auxiliaires effectrices et régulatrices

(Moser et Leo, 2010)

La spécification des sous types de cellules T auxiliaires est contrôlée par un réseau de facteurs de transcription spécifiques, qui se lient à des éléments régulateurs sur les gènes codant pour des cytokines et d'autres facteurs de transcription. Pour chacune des classes de cellules T auxiliaires, il existe un facteur de transcription clé, essentiel pour l'engagement dans l'une des voies de différenciation. L'ensemble de ces facteurs est présenté dans la Figure 15. Le contexte nucléaire dans lequel ces facteurs de transcription agissent est affecté par des processus épigénétiques, qui permettent aux programmes d'expression géniques d'être hérités par les cellules filles tandis qu'elles se divisent et migrent vers les tissus, même après que les signaux initiateurs aient disparu (Ansel et al., 2003).

La différenciation des cellules T CD8⁺ effectrices dépend également de l'activité de facteurs de transcription spécifiques. T-bet, le facteur de transcription responsable de l'engagement des cellules T CD4 dans la voie Th1 est également exprimé dans les cellules T CD8⁺ et pourrait jouer un rôle similaire en induisant l'expression de gènes effecteurs (Sullivan et al., 2003). Un autre facteur de transcription hautement homologue à T-bet, appelé Eomes (Eomesodermine), est également exprimé dans les cellules T CD8⁺. (Intlekofer et al., 2005). Cependant, contrairement aux cellules T CD4⁺ auxiliaires, les CTL ont un répertoire de gènes effecteurs limité à l'IFN- γ , à la perforine et aux granzymes

1.2.4. Les cellules mémoire

Une fois l'Ag éliminé, une phase de mort cellulaire massive s'initie et conduit à l'élimination de la plupart des cellules T effectrices. Les bases de cette disparition ne sont pas entièrement comprises, mais doivent impliquer des combinaisons de manque de cytokines, des signaux de mort médiés par des récepteurs, ou la toxicité de produits effecteurs. Après l'élimination d'environ 90% des cellules effectrices, un groupe de cellules T mémoire persiste, dont la fréquence, plus élevée qu'à l'état pré-immun, reflète l'expansion initiale des cellules (dont le déterminant principal est la dose d'Ag au cours de l'immunisation) et sa contraction successive (Paul, 2008). Les cellules mémoire seraient donc de simples cellules effectrices ayant échappé à la délétion clonale en état de repos (Moulton et Farber, 2006), mais une théorie alternative suggère qu'elles pourraient être issues d'un processus de différenciation actif d'une population de cellules filles spécifiques de l'Ag qui se détacheraient de la voie de différenciation effectrice après l'activation initiale (Manjunath et al., 2001; Wherry et al., 2003). La contribution relative de ces deux modèles de formation des cellules T mémoire au cours des différentes réponses immunes n'a pas encore été élucidé.

La proportion de cellules T_{mc} et T_{me} est principalement contrôlée par la persistance de l'Ag : les cellules T_{mc} prédominent quand l'Ag est rapidement éliminé, et les cellules T_{me} quand celui-ci persiste (Plotkin et al., 2008).

2. Les réponses anticorps

Comme pour les cellules T, l'activation des cellules B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps dépend initialement de l'engagement de leur récepteur à l'Ag appelé BCR (B cell receptor) après capture de l'Ag vaccinal en périphérie. Ce premier signal doit cependant être complété par d'autres signaux provenant de cellules T auxiliaires et de sous-classes de DC pour permettre l'induction d'une réponse humorale efficace.

2.1. Cinétique de la réponse anticorps vaccinale

La réponse anticorps vaccinale peut être découpée en plusieurs phases présentées dans la Figure 16 :

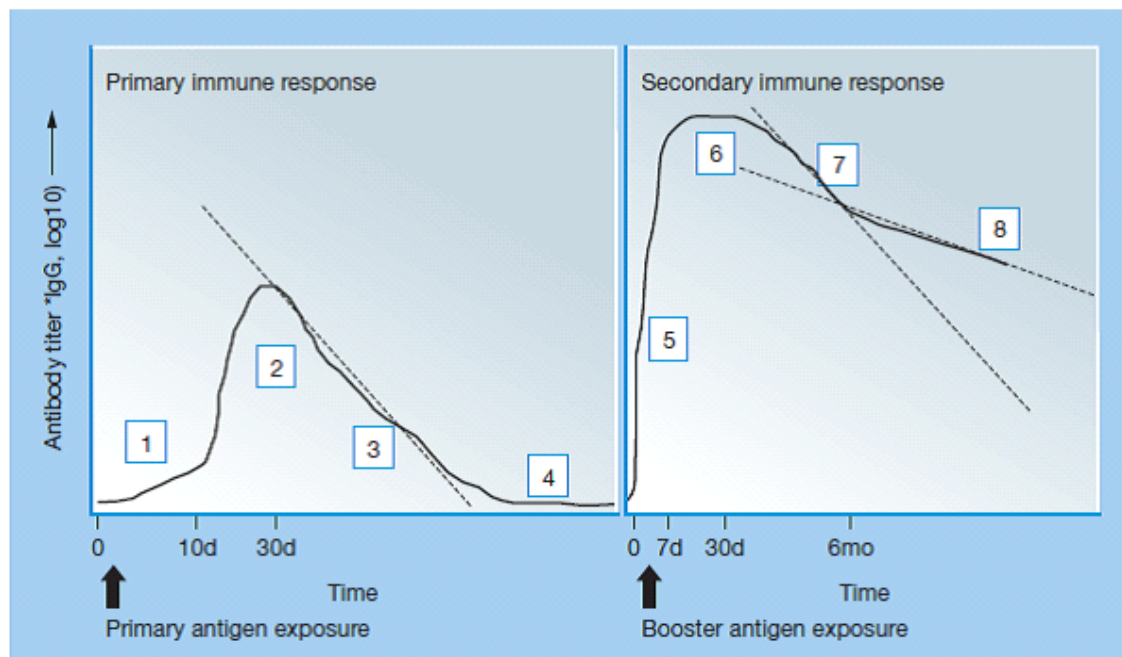


Figure 16 Les phases de la réponse anticorps vaccinale

L'exposition initiale à l'Ag génère une réponse extra-folliculaire (1) qui entraîne la rapide apparition de faibles titres en anticorps de type IgG. A mesure que les cellules B prolifèrent dans les centres germinatifs (CG) et se différencient en plasmocytes, les titres en anticorps augmentent jusqu'à atteindre un maximum (2), en général 4 semaines après l'immunisation. La courte durée de vie de ces plasmocytes entraîne une décroissance rapide des titres en

anticorps (3), qui peuvent retrouver leurs niveaux initiaux (4). Lors d'une réponse secondaire, la réexposition à l'Ag réactive la mémoire immunitaire et entraîne une augmentation rapide (< 7 jours) des titres en anticorps (5). Les plasmocytes à courte durée de vie maintiennent les titres en anticorps à un niveau maximum pendant quelques semaines, puis ceux-ci diminuent avec la même cinétique qu'après la réponse primaire. Les plasmocytes à longue durée de vie ayant atteint les niches de la moelle osseuse continuent de produire des anticorps spécifiques de l'Ag, qui ensuite diminuent avec une cinétique plus lente. (Plotkin et al., 2008).

2.1.1. La réponse anticorps primaire

a) Les réponses T dépendantes contre les Ag protéiques

(1) La réaction extra-folliculaire

Les différentes étapes de la réaction extra-folliculaire sont schématisées dans la Figure 17. Comme les cellules T naïves, les cellules B naïves circulent en permanence, sondent les ganglions lymphatiques, et se concentrent dans les follicules à la recherche de leur Ag spécifique (Goodnow, 1997). Suite à la rencontre avec l'Ag, les cellules B migrent vers la frontière entre le follicule et la zone T, où elles sont exposées à des DC et à des cellules T récemment activées. Elles présentent des peptides antigéniques dans le contexte CMH II aux cellules T CD4⁺ auxiliaires spécifiques de l'Ag et reçoivent en retour des signaux d'activation qui déclenchent leur prolifération, la commutation de classe des Ig de l'isotype IgM vers les isotypes IgG, IgA ou IgE et leur différenciation en plasmocytes extra-folliculaires sécréteurs d'anticorps (Pape et al., 2007). Les cellules CD4⁺ Th1 et Th2 exercent des fonctions auxiliaires essentielles au cours de la voie de différenciation extra-folliculaire, et l'engagement de la molécule CD40 sur les cellules B par leur ligand CD40L peut moduler la commutation isotypique vers des classes et sous classes particulières. Chez les rongeurs, les cellules T CD4⁺ de type Th1 productrices d'IFN γ favorisent la commutation des Ig vers l'isotype IgG2a, alors que les cellules Th2 favorisent essentiellement la génération d'IgG1 et d'IgE (via la production d'IL-4) et d'IgG2b et d'IgG3 (via la production de TGF- β) (Deenick et al., 2005). La situation est moins tranchée chez l'homme, où les IgG1 prédominent fréquemment quelle que soit la polarisation des cellules T (Plotkin et al., 2008). La réaction extra-folliculaire est rapide, des IgM et de faibles niveaux d'IgG apparaissant dans le sang quelques jours seulement après l'immunisation primaire. Ces anticorps ont une faible affinité car il n'y a pas de processus d'hypermutation/sélection au cours de la réaction extra-folliculaire. Cette réaction a une durée de vie courte, et la plupart des cellules meurent par

apoptose au bout de quelques jours. Par conséquent, elle joue probablement un rôle mineur dans l'efficacité vaccinale.

(2) *La réaction du centre germinatif (CG)*

Au cours de la réaction extra-folliculaire, certaines cellules B activées augmentent l'expression de CXCR5 et quittent la zone T où a débuté leur activation pour rejoindre un follicule lymphoïde, où se trouvent les DC folliculaires (FDC) qui expriment CXCL13 (Figure 17). Elles y présentent les Ag vaccinaux aux cellules ThF, qui leur apportent, conjointement avec les FDC, des signaux supplémentaires d'activation et de survie, tels que les molécules de costimulation CD40L, ICOS, et la sécrétion de cytokines particulières, telles l'IL-10, qui est un facteur de croissance des cellules B, et l'IL-21, qui participe à la différenciation des cellules B naïves en plasmocytes (Vinuesa et al., 2005). Les lymphocytes B spécifiques d'un Ag subissent une expansion clonale massive qui conduit à l'établissement d'un centre germinatif (CG) A l'intérieur d'un CG, les lymphocytes B subissent deux événements majeurs : la commutation isotypique d'IgM vers les classes IgG, IgA ou IgE, et la maturation de l'affinité de leur BCR pour l'Ag. Ces événements reposent sur l'induction d'altérations génétiques au niveau des locus réarrangés des chaînes lourdes ou légères des gènes d'Ig et sont sous la dépendance de l'enzyme AID (activation induced deaminase) (Plotkin et al., 2008). La maturation d'affinité des cellules B est le résultat d'un processus stochastique d'hypermutation somatique au sein des régions variables des gènes des Ig qui modifie l'affinité des anticorps pour l'Ag. Les cellules B exprimant un BCR de forte affinité sont sélectionnées grâce à des signaux de survie et de prolifération qu'elles reçoivent des FDC qui exposent les Ag vaccinaux à leur surface, et auxquelles elles se lient plus efficacement (Plotkin et al., 2008). Des travaux conduits chez l'homme montrent que la réalisation de ces différentes étapes d'activation, de sélection et de différenciation nécessite, en plus de l'activation du BCR et de l'action des cellules T auxiliaires, un troisième signal qui peut être délivré par des agonistes des TLR ou par des cytokines produites par des DC activées (Lanzavecchia et Sallusto, 2007). Poursuivie jusqu'à son terme, la réaction folliculaire aboutit à la différenciation terminale des lymphocytes B folliculaires en lymphocytes B mémoire ou en plasmocytes (Shapiro-Shelef et Calame 2005).

Le développement de la réaction folliculaire nécessite environ deux semaines, et les IgG hypermutées contre les Ag protéiques vaccinaux apparaissent environ 10 à 14 jours après l'injection. Un grand nombre de plasmocytes spécifiques de l'Ag sont générés, et le pic d'IgG

vaccinales est atteint 4 à 6 semaines après l'immunisation primaire (Flehmig et al., 1997). Des mécanismes de rétroaction mettent fin à la réaction folliculaire en 3 à 6 semaines. Le processus de maturation d'affinité qui est initié au sein des CGs dure plusieurs mois. En conséquence, les anticorps vaccinaux avec une avidité pour l'Ag plus élevée que la référence (définie par la somme des affinités spécifiques pour les épitopes) sont induits uniquement après qu'un temps suffisant se soit écoulé après l'immunisation (Ekström et al., 2005). Sur cette base, les calendriers d'immunisation comportant une injection de rappel devraient donc espacer celle-ci d'au moins quatre mois de la ou des dose(s) initiale(s).

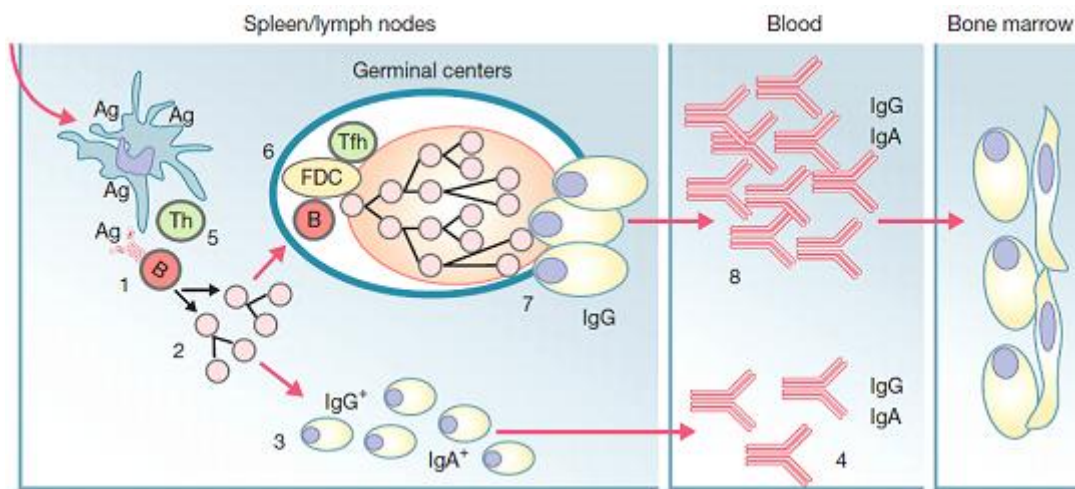


Figure 17 Réponses extra folliculaire et de centre germinatif aux Ag protéiques

En réponse aux Ag protéiques qui atteignent les ganglions lymphatiques ou la rate, les cellules B spécifiques de l'Ag sont activées (1). Au cours d'une réaction extrafolliculaire (2), les cellules B se différencient rapidement en plasmocytes (3) producteurs d'anticorps d'isotype $IgM^+/- IgG/IgA$ de faible affinité qui apparaissent à faible niveau dans le sérum quelques jours après l'immunisation (4). Les cellules T auxiliaires spécifiques de l'Ag (5) activées par les DC déclenchent la migration de quelques cellules B spécifiques de l'Ag vers les FDC (6), initiant la réaction de centre germinatif (CG). Dans les CG, les cellules B reçoivent des signaux supplémentaires par les cellules Thf, et subissent une prolifération clonale massive, la commutation isotypique d'IgM vers IgG, IgA ou IgE, et la maturation d'affinité (7) et se différencient en plasmocytes sécrétant de grandes quantités d'anticorps spécifiques de l'Ag (8). A la fin de la réaction de centre germinatif, quelques plasmocytes sortent du ganglion ou de la rate et migrent jusqu'aux niches de survie situées principalement dans la moelle osseuse, où elles survivent grâce à des signaux fournis par les cellules stromales (9) (Plotkin et al., 2008).

(3) Devenir des plasmocytes et des lymphocytes B mémoire

Les plasmocytes spécifiques de l'Ag produits dans la rate ou les ganglions après l'immunisation produisent des anticorps de forte affinité appartenant aux différentes classes d'Ig. Leur durée de vie est courte, et les taux d'anticorps vaccinaux diminuent rapidement au cours des premières semaines après l'immunisation. Cependant, certains plasmocytes induits

dans les CGs sont attirés vers les compartiments de la moelle osseuse par des cellules stromales qui fournissent les signaux requis pour leur survie à long terme (Minges Wols et al., 2002). Dans ces niches, la survie des plasmocytes et la production des anticorps peut persister pendant des années. Les modalités de la persistance des plasmocytes induits par les vaccins ne sont pas encore clairement définies. Elles pourraient refléter la persistance à long terme des plasmocytes générés initialement, ou le maintien d'un réservoir de plasmocytes dans la moelle osseuse via des mécanismes d'homéostasie. En dépit de ces zones d'ombre, on sait que la longévité des réponses anticorps est proportionnelle au nombre de plasmocytes à longue durée de vie générés par l'immunisation : en absence d'exposition ultérieure à l'Ag, la persistance des anticorps peut être prédite de façon fiable par les titres anticorps qui sont atteints 6 à 12 mois après l'immunisation, c'est-à-dire après la fin de la réponse des plasmocytes à courte durée de vie (Honorati et al. 1999 ; Van Herck et al. 2000). Les réponses anticorps vaccinales déclinent, éventuellement en dessous des seuils de protection, à moins qu'une réexposition à l'Ag réactive la mémoire immunitaire.

Les cellules B mémoire survivent pendant des périodes de temps prolongées (plusieurs décennies) même en absence de réexposition à l'Ag (Maruyama et al., 2000). Les modalités de la persistance du pool de cellules B mémoire, particulièrement en absence d'exposition à l'Ag, sont mal connues. Des études chez la souris indiquent que Bly est nécessaire pour le maintien des cellules B naïves et APRIL pour le maintien des plasmocytes, tandis que ces deux ligands ne semblent pas indispensables pour la survie des cellules B mémoire (Scholz et al. 2008). Il existe des preuves que les cellules B mémoire humaines se divisent lentement dans les conditions de repos, ce qui suggère que le pool de cellules B mémoire pourrait se maintenir grâce à la prolifération homéostatique comme cela a été décrit pour les cellules T mémoire (Bernasconi et al., 2002).

b) Les réponses T indépendantes contre les polysaccharides

Les polysaccharides (PS) bactériens injectés rejoignent essentiellement la zone marginale de la rate et des ganglions via le sang, où ils agrègent les BCR à la surface des cellules B, grâce à leurs structures répétitives. Ils activent les cellules B de la zone marginale de manière T-indépendante dans des foyers extra-folliculaires (MacLennan et al., 2003). Chez les rongeurs, au cours de la semaine qui suit l'immunisation, les cellules B se différencient en plasmocytes, subissent un certain niveau de commutation isotypique d'IgM vers IgG/A et produisent rapidement des anticorps non mutés de faible affinité. En effet, la production d'anticorps hypermutés n'est pas attendue au cours d'une réponse T-indépendante, car le

processus de mutation somatique a lieu principalement dans les CG. Chez l'homme, l'immunisation par les PS génère la production d'IgG d'affinité intermédiaire présentant des mutations somatiques dans leurs régions variables (Lucas et Reason, 1999;Zhou et al., 2004). Ce phénomène pourrait être le résultat de l'activation par réaction croisée de cellules B mémoire préalablement induites par des PS bactériens associés à des protéines (Vinuesa et al. 2003). Mais ces anticorps pourraient également être produits par des cellules B recirculantes provenant de la zone marginale splénique, qui diversifieraient leur répertoire d'Ig de manière T-indépendante (Weller et al. 2005). Cette hypothèse concorde avec le fait que les vaccins bactériens à base de PS sont faiblement immunogènes chez les jeunes enfants, dont la zone marginale de la rate est immature (Zandvoort et al, 2002;Timens et al., 1989). Après leur différenciation dans les voies extra-folliculaires, les plasmocytes spécifiques des PS migrent vers la pulpe rouge de la rate où ils persistent quelques temps, avant de mourir par apoptose, entraînant la disparition des réponses anticorps correspondantes au bout de quelques mois. Les PS n'induisant pas de cellules mémoire, une réexposition ultérieure avec les mêmes PS entrainera une nouvelle réponse primaire qui suivra la même cinétique chez les individus préalablement vaccinés que chez les individus naïfs (Southern et al. 2004). Le concept selon lequel les cellules B mémoire ne dérivent que de réponses T dépendantes a cependant été récemment remis en question par la découverte que des réponses T indépendantes de type II aux polysaccharides bactériens conduit à l'expansion de cellules B mémoire de phénotype CD21^{lo} CD23^{lo} chez la souris (Paul, 2008).

2.1.2. La réponse anticorps secondaire

Dans le cas des vaccins T dépendants, l'exposition secondaire à l'Ag entraine la réactivation des cellules B mémoire générées lors des réactions folliculaires primaires. Cette activation ne nécessite pas l'aide des réponses cellulaires T, et donne lieu à des niveaux de réponse anticorps significativement plus élevés, avec une cinétique plus rapide que lors de l'immunisation primaire, atteignant un pic plasmatique en seulement sept jours (Figure 16).

En règle générale, les facteurs favorisant la différenciation des cellules B en plasmocytes et le niveau atteint par les réponses anticorps primaires soutiennent l'induction des cellules B mémoire. En effet, des études sur le vaccin contre l'hépatite B montrent que les réponses de rappel les plus précoces et les plus fortes sont obtenues chez les individus présentant les titres les plus élevés en anticorps vaccinaux primaires. Par exemple, on observe des réponses anti-HBsAg plus élevées chez les individus présentant des niveaux de réponse post primaire anti-

HBsAg élevées (100 UI/l) que chez ceux qui présentent des niveaux intermédiaires (10–99 UI/l). (Zanetti et al. 2005). Cela reflète vraisemblablement l'induction d'un pool plus large de cellules B mémoire spécifiques de l'Ag. La présence résiduelle d'anticorps vaccinaux au moment de l'injection de rappel peut cependant limiter l'amplitude des réponses anticorps secondaires. Ce phénomène pourrait résulter d'une neutralisation du dépôt vaccinal par les anticorps préexistants, diminuant la quantité d'Ag disponible pour la liaison aux cellules B. Ce phénomène peut également activer des mécanismes de rétrocontrôle négatifs de l'activité des cellules B ou encore limiter la réplication *in vivo* des vaccins viraux vivants (Plotkin et al., 2008).

Chapitre 6 Les stratégies pour améliorer l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires

Deux stratégies peuvent potentiellement permettre d'augmenter l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires, tout en garantissant leur sécurité : la première consiste à administrer les Ag grâce à des micro-organismes vivants hétérologues aussi sûrs que les protéines recombinantes, et la seconde consiste à produire des protéines recombinantes aussi immunogènes que des agents pathogènes vivants (Bachmann et Jennings, 2010). Ce chapitre est consacré à la description de certains systèmes actuellement à l'étude dans ce contexte.

1. L'administration des Ag grâce à des micro-organismes vivants hétérologues : la vectorisation des Ag

Grâce au développement des techniques de biologie moléculaire, et de sélection des Ag, des stratégies de vectorisation de l'Ag utilisant des vecteurs vivants ont été développées. Il s'agit de sélectionner des Ag cibles et d'intégrer, par génie génétique, les gènes correspondants dans le génome d'un micro-organisme vecteur hétérologue. De nombreux vecteurs viraux et bactériens ont été proposés, mais les plus utilisés sont des poxvirus, des adénovirus et le bacille de Calmette-Guérin (BCG) (Plotkin, 2005). Tous sont caractérisés par une grande capacité stimulante et une grande sécurité d'emploi. Ils sont également faciles et peu coûteux à produire. Les virus comme les bactéries intracellulaires sont capables de délivrer les Ag à l'intérieur des cellules, leur ouvrant l'accès à la voie de présentation par les molécules du CMH de classe I, qui permet l'induction de réponses T cytotoxiques. En outre, certains de ces vecteurs peuvent être administrés par voie orale, qui représente la voie naturelle d'infection pour beaucoup de pathogènes (Leclerc, 2007). Plusieurs de ces vecteurs sont actuellement en développement clinique, notamment pour la mise au point de vaccins contre le VIH (Girard et al., 2006), la tuberculose (Kaufmann, 2006) ou le paludisme (Li et al., 2007).

Cette stratégie présente toutefois des limites. En effet, l'immunogénicité des vecteurs peut être réduite lorsqu'il existe une immunité contre ces derniers chez l'hôte, consécutivement à une infection naturelle ou une vaccination. Ce phénomène, souvent appelé « péché originel antigénique », peut limiter l'utilisation d'un même vecteur à une seule vaccination. Il est dû au fait que la présence d'anticorps spécifique d'un Ag empêche la stimulation des

cellules B naïves spécifiques. Cette limite est, en particulier, rencontrée avec certains vecteurs adénovirus pour lesquels une immunité préexiste chez la majorité de la population humaine. Pour limiter ce problème, l'utilisation d'adénovirus de sérotypes rares ou non humains, contre lesquels il n'existe pas d'exposition préalable dans la population à vacciner, est privilégiée (Bangari et Mittal, 2006). Des stratégies de manipulation génétique des vecteurs ont également été développées pour remplacer les cibles de la réponse spécifique inhibitrice par des déterminants issus d'autres virus (Roberts et al., 2006). Ces vecteurs induisent généralement de fortes réponses T, et cela peut représenter une limite à leur utilisation dans le cadre de la vaccination contre le VIH, où ces cellules représentent les cibles principales du virus (Chakupurakal et al., 2010). C'est ce qui ressort des résultats de la phase IIb de l'essai STEP-VIH. Dans cette étude, les auteurs ont noté un risque accru d'infection chez les personnes avec une immunité préexistante contre le vecteur Ad5 utilisé (Steinbrook, 2007).

Les constructions génétiques contenant les Ag peuvent être injectées de façon directe, en absence de vecteur. Dans ce cas, ce sont les cellules de l'hôte lui-même qui produisent l'Ag vaccinal. Ce procédé, appelé couramment « vaccination ADN ou génétique », permet d'induire simultanément des réponses humorales et des réponses T cytotoxiques. Des essais de vaccination utilisant ce type de vecteurs ont été menés chez le primate non humain et chez l'homme dans diverses infections (VIH, paludisme, hépatite B, papillomavirus) et cancers (prostate, mélanome, côlon, lymphomes) et ont montré une excellente tolérance, mais leur immunogénicité s'est avérée décevante (Leclerc, 2007). Cependant, l'utilisation de vaccins ADN dans le cadre de protocoles d'immunisation de type « prime-boost », dans lesquels l'administration de l'Ag est effectuée dans des contextes hétérologues lors des injections de rappel, grâce à l'utilisation de vecteurs de nature différente s'avère prometteuse.

Récemment, une étude de phase III s'appuyant sur l'utilisation d'Ag vectorisés associée à une stratégie de type « prime-boost » a montré pour la première fois le bénéfice de la vaccination pour la prophylaxie du VIH. La stratégie de prime-boost de cet essai impliquait un schéma d'administration d'Ag et de vecteurs différents (4 injections « prime » du vaccin constitué d'un vecteur canarypox recombinant vivant exprimant une glycoprotéine gp120 liée à la portion transmembranaire de gp41, gag et à la protéase (ALVAC-VIH [vCP1521]) et deux injections « boost » d'un vaccin sous unitaire contenant la glycoprotéine recombinante gp120 (AIDSVAX B/E)) (Rerks-Ngarm et al., 2009).

2. La production de protéines recombinantes aussi immunogènes que des agents pathogènes vivants

Outre les facteurs affectant la compétence du système immunitaire de l'hôte tels que son âge, son état de santé, ou encore des facteurs génétiques, les propriétés intrinsèques de l'Ag ou de la formulation vaccinale sont susceptibles de moduler l'immunogénicité des vaccins (Plotkin et al., 2008).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 5, l'induction de réponses vaccinales protectrices comporte plusieurs étapes clés, incluant notamment l'activation des cellules B et T CD8⁺, mais aussi la mobilisation des réponses cellulaires T auxiliaires, qui dépend de l'internalisation, de l'apprêtement et de la présentation des Ag par les CPA aux cellules T (Figure 18). Toute propriété de l'Ag ou de son environnement capable de favoriser l'une ou l'autre de ces étapes est susceptible d'affecter les réponses vaccinales et peut donc servir de base au développement de nouvelles stratégies pour améliorer l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires.

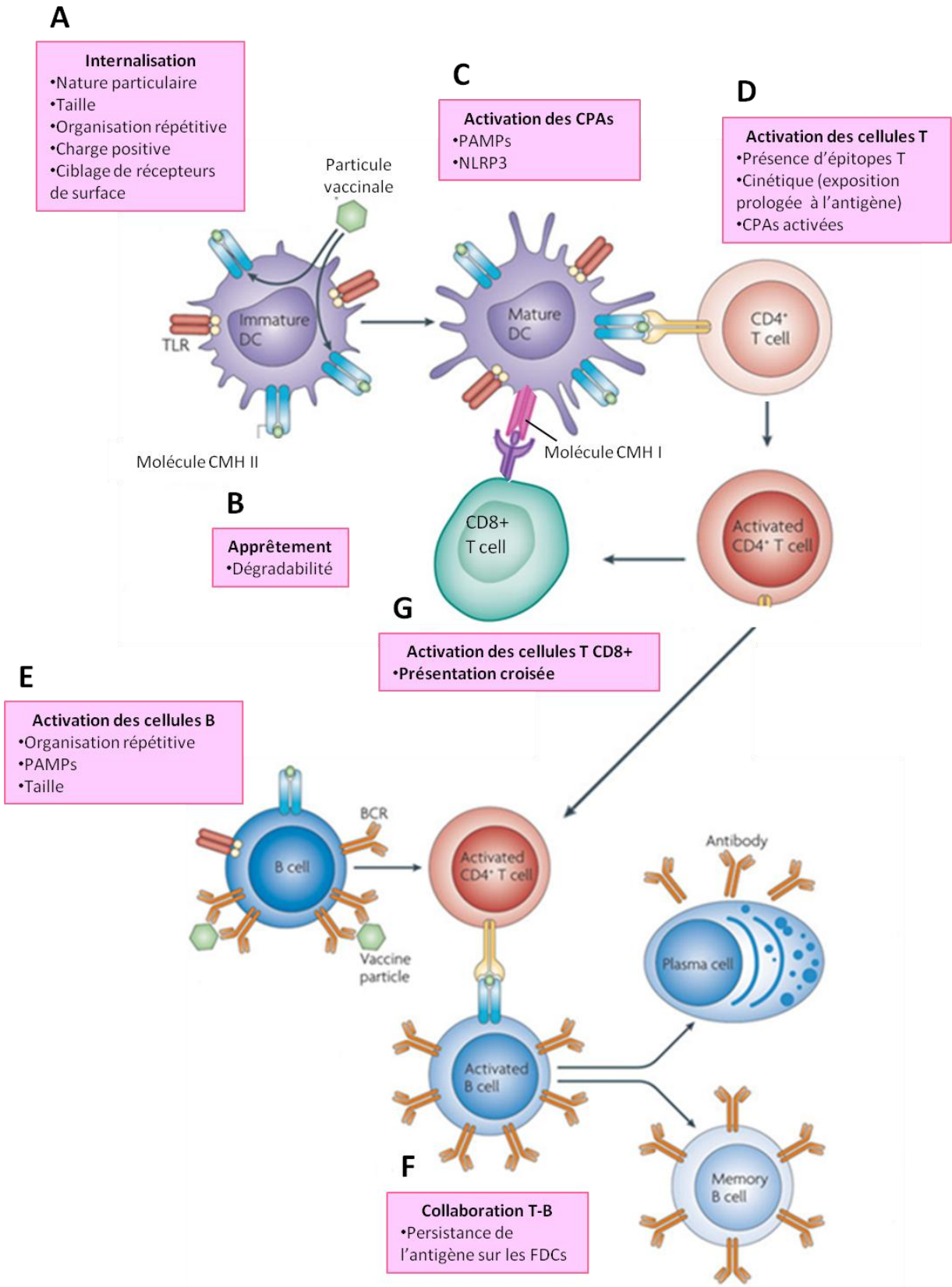


Figure 18 Les étapes clés de l'induction des réponses vaccinales et leur modulation par les propriétés des Ag et de leur environnement

D'après (Bachmann et Jennings, 2010)

Les étapes de l'induction d'une réponse vaccinale efficace sont les suivantes :

- a) En amont de l'activation des effecteurs du système immunitaire, les protéines doivent être reconnues et internalisées par les CPA. Cette étape est facilitée si les Ag sont **particulaires** (Bachmann et Jennings, 2010), présentent une **organisation répétitive** (Bachmann et Jennings, 2010), ou sont **capables de lier des récepteurs à la surface des CPA** (Lanzavecchia, 1990). En effet, ces propriétés favorisent l'internalisation de l'Ag par phagocytose, un mode d'internalisation reconnu comme étant plus efficace que la pinocytose en phase liquide (Lanzavecchia, 1990). Ainsi, les protéines capables de multimériser, ou qui ont tendance à s'agréger, sont significativement plus immunogènes que leurs homologues monomériques de faible poids moléculaire (Weldon et al., 2010). De même, les protéines ciblant des récepteurs de surface sont souvent de puissants immunogènes.
- b) La **dégradabilité** des protéines est liée à l'efficacité de leur apprêtement, et donc à leur immunogénicité. Les protéines très sensibles à la protéolyse sont très fortement dégradées dans les lysosomes des CPA, ce qui génère des fragments peptidiques trop petits pour être chargés sur les molécules CMH et présentés aux lymphocytes T, et sont peu immunogènes (Delamarre et al., 2006)(Delamarre et al., 2005b) A l'inverse, les protéines qui ne sont pas dégradées facilement sont de bons immunogènes.
- c) La présentation de l'Ag par les CPA aux cellules T naïves doit se faire dans un **contexte inflammatoire** pour permettre l'activation fonctionnelle des cellules T. La maturation des CPA est initiée par la reconnaissance de «signaux de danger», également appelés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) provenant de l'Ag lui-même ou de son environnement par des récepteurs appelés PRR (Pattern-recognition receptor). Parmi les PRR, on trouve les récepteurs Toll-like (TLR) et NOD-like (NLR). Les protéines possédant des propriétés inflammatoires intrinsèques sont donc très immunogènes. Par exemple, les protéines portant des lipides agonistes de TLR2 sont capables de déclencher des réponses anticorps en absence d'adjuvant (Zeng et al.).
- d) L'activation des cellules T nécessite que l'Ag contienne des épitopes T spécifiques. Aussi, l'immunogénicité d'une protéine est généralement liée à son degré d'éloignement avec l'hôte, et à son **contenu en épitopes T**. Le contenu en épitopes T est considéré comme un facteur prédictif de l'immunogénicité des protéines thérapeutiques (De Groot et al., 2008). D'autre part, l'activation des cellules T est facilitée par la **présence prolongée de l'Ag** soutenue par les adjuvants, qui peuvent permettre un effet de dépôt, ou encore par les

schémas de vaccination. L'administration des doses primaires de vaccin à de courts intervalles (1 ou 2 semaines) permet par exemple de monter rapidement des réponses, mais celles-ci persistent moins longtemps que lorsque le même nombre de doses est administré à des intervalles plus longs (1 à 2 mois) (Plotkin et al., 2008).

- e) L'activation et la différenciation des cellules B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps sont conditionnées par quatre types de signaux: l'agrégation du BCR (Signal 1). Elle est facilitée par l'action du complément. L'activation de CD40 via CD40L exprimé par les cellules T effectrices spécifiques de l'Ag (Signal 2). La stimulation des TLR (Signal 3). L'activation de récepteurs membranaires par des cytokines et d'autres produits exprimés ou induits par les cellules T, les DC ou les cellules épithéliales (Signal 4). (Lanzavecchia et Sallusto, 2007). L'activation des cellules B est donc facilitée par les Ag qui ont une **organisation répétitive** et sont ainsi capables d'agréger plusieurs BCR (Fluckiger et al., 1998). La **présence de PAMP** et la **taille des Ag** sont également des facteurs importants. Les Ag dont la taille est comprise entre 20 et 200 nm ont directement accès au système lymphatique et sont fortement immunogènes (Bachmann et Jennings, 2010).
- f) La collaboration T-B est essentielle pour la génération de plasmocytes sécréteurs d'Ig et de cellules B mémoire, mais les facteurs qui influencent cette interaction sont mal connus. Il est probable que la **persistance de l'Ag sur les DC folliculaires** soit bénéfique (Bachmann et Jennings, 2010).
- g) Enfin, l'activation des cellules T CD8⁺ nécessite que l'Ag soit capable d'être adressé vers la voie de **présentation croisée**.

Ainsi, pour pouvoir activer *in vivo* toutes les étapes requises pour l'activation du système immunitaire, les Ag devraient posséder certaines des propriétés qui viennent d'être exposées, ou une combinaison de ces propriétés. Dans la partie suivante de ce chapitre, certaines des approches visant à modifier les Ag et/ou leur formulation pour améliorer leur immunogénicité seront exposées.

2.1. Prolonger la persistance de l'Ag

Un des moyens pour prolonger l'exposition des Ag vaccinaux au système immunitaire est de créer un dépôt d'Ag à partir duquel celui-ci diffuse lentement. C'est l'un des modes d'action proposé pour les adjuvants traditionnels à base de sels d'aluminium. Cependant, cette "théorie du dépôt" dans l'adjuvantité de ces composés a été remise en cause par plusieurs études. Il semble par exemple que le retrait du dépôt d'Alun au site d'injection une semaine

après l'immunisation soit sans effet sur la réponse contre l'Ag co-injecté. De plus, l'adsorption stable de l'Ag sur l'Alun n'est pas absolument nécessaire pour l'effet adjuvant (McKee et al., 2007). D'autres adjuvants actuellement à l'étude, à base de phosphate (Adju-Phos), d'émulsions (Montanide, AS04, ISA-51 et ISA-720) ou de précipités protéiques (IC31) fonctionnent néanmoins en partie selon ce principe (Bachmann et Jennings, 2010).

2.2. Conférer à l'Ag une nature particulière, et/ou des structures répétitives

Il existe actuellement de nombreuses approches permettant de conférer à l'Ag une nature particulière:

- Certains adjuvants à base de sels d'aluminium ont la capacité de se lier aux protéines, ce qui a pour effet de les faire précipiter, les faisant passer d'un état soluble à un état particulaire. (Bachmann et Jennings, 2010).
- Des systèmes utilisant des nanoparticules ou des microparticules pour délivrer les Ag sont également en développement. Ils peuvent être préparés à partir de polylactide co-glycolide (PLG), de complexes immunostimulants (ISCOMs = immunostimulating complexes) composés d'un mélange de cholestérol, de phospholipides et de saponines Quillaja. Ils peuvent encore être préparés avec du chitosan (un polyaminosaccharide dérivé de la chitine), des polyanhydrides, de l'acide hyaluronique, de l'amidon, des protéines ou enfin des matériaux synthétiques comme le polyéthylène glycol et le polystyrène (Bachmann et Jennings 2010).
- Les virus-like particles (VLPs), sont des systèmes composés de protéines issues de l'enveloppe ou de la capsid de virus dotées d'une capacité d'auto-assemblage en structure particulaire dont la symétrie est proche de celle du virus correspondant. Ces particules ne renferment pas d'acides nucléiques, et ne sont donc pas répliquatives. Tous les VLPs présentent des structures extrêmement répétitives à leur surface, sont capables d'induire de fortes réponses anticorps, et représentent ainsi une plateforme potentielle pour induire des réponses anticorps contre des Ag hétérologues d'intérêt (Bachmann et Jennings, 2010). Deux vaccins contre le papillomavirus humain basés sur cette approche ont récemment été homologués (Joura et al., 2007).
- Les virosomes, qui sont des particules incorporant des protéines antigéniques dans des liposomes sont également employés, comme dans le cas du vaccin Inflexal (Crucell) utilisé contre la grippe (Bachmann et Jennings, 2010)

Certains vaccins possèdent à la fois les propriétés des VLPs et celles des virosomes, en incorporant des lipides au cours du processus d'auto-assemblage des protéines. C'est le cas du vaccin Engerix B utilisé contre l'hépatite B (GlaxoSmithKline Biologicals).

2.3. Délivrer l'Ag dans un contexte inflammatoire

L'Alun, le MF59 ou le MPL (cf. Chapitre 4) sont capables de créer un environnement pro-inflammatoire et cette capacité semble essentielle pour leur activité adjuvante. Le mécanisme pro-inflammatoire du MF59 n'est pas connu. L'Alun active l'inflammasome NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3). L'inflammasome promeut l'inflammation en causant principalement la sécrétion de cytokines IL-1 β et IL-18. Des études ont cependant montré que les signaux médiés par l'inflammasome ne sont pas toujours suffisants pour soutenir la différenciation des cellules T auxiliaires en absence d'activation des PRR. Aussi, l'impact de la propriété d'activation de l'inflammasome par les sels d'aluminium sur leur capacité adjuvante est controversé (Bachmann et Jennings, 2010). Dans ce contexte, les signaux médiés par les PRR sont préférés aux signaux médiés par l'inflammasome pour le développement d'adjuvants de nouvelle génération (Bachmann et Jennings, 2010). Ces signaux peuvent par exemple être délivrés par des ligands naturels ou synthétiques de TLR (Tableau 3). Ces systèmes permettent à la fois d'augmenter l'immunogénicité des Ag, mais également de moduler la polarisation des cellules T auxiliaires. Par exemple, les agonistes de TLR2 et TLR5 augmentent les réponses humorales et cellulaires contre les Ag sans altérer la balance Th1/Th2. A l'inverse, les agonistes de TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, et TLR9 polarisent les réponses cellulaires T vers la voie Th1 (Coffman et al., 2010).

Les différents ligands des TLR peuvent être intégrés à la préparation vaccinale sous forme libre, ou en association avec les Ag. Cette dernière stratégie permet de restreindre l'activation du système immunitaire inné aux cellules qui interagissent avec l'Ag, permettant de réduire les effets secondaires de la préparation vaccinale tout en conservant son immunogénicité. (Bachmann et Jennings, 2010).

	Type de ligand	TLR activé	Réponses immunitaires activées
Poly-IC	dérivé synthétique d'ARN double brin	TLR3	Ac, Th1, CTL
MPL (monophosphoryl lipid A)	dérivé détoxifié du LPS	TLR4	Ac, Th1
Flagelline	Flagelline	TLR5	Ac, Th1 + Th2
Imiquimods	Dérivés de l'imidazoquinoline)	TLR7 et/ou TLR8	Ac, Th1, CTL
CpG-ODN (CpG oligodéoxynucléotides)	oligodéoxynucléotides non méthylés synthétiques)	TLR9	Ac, Th1, CD8 ⁺ T cells

Tableau 3 Systèmes de stimulation des TLR actuellement en développement

D'après (Coffman et al., 2010)

Enfin, en raison de leur rôle central dans la modulation des réponses immunitaires, l'utilisation de cytokines en tant qu'adjuvants est également très étudiée, notamment pour améliorer l'immunogénicité des vaccins ADN. Parmi les cytokines qui ont été proposées on trouve le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, et le TNF α (tumor necrosis factor α) (Wassef et Plaeger, juillet).

2.4. Cibler l'Ag à la surface des CPA

Une des voies possibles pour cibler des Ag sur les CPA consiste à conjuguer ces derniers à des anticorps monoclonaux spécifiques de déterminants de la surface des CPA. Plusieurs études dans des modèles animaux, y compris chez les primates non humains ont montré que cette approche permet de déclencher des réponses anticorps élevées en absence d'adjuvant. (Carayanniotis et Barber, 1987; Snider et Segal, 1989; Mutsaers et Papadimitriou, 1988). La molécule CMH-II a été le premier déterminant ciblé de cette manière, et par la suite, d'autres marqueurs spécifiques des cellules dendritiques tels que DC-SIGN (Tacke et al., 2005), DEC205 (Bozzacco et al., 2007), LOX-1 (Delneste et al., 2002), le récepteur au mannose (Ramakrishna et al., 2004), CD40 (Schjetne et al., 2007), ainsi que Gb3 (un récepteur de la toxine Shiga) (Vingert et al., 2006) ont été ciblés avec succès.

Une grande variété de populations de DC présentant d'importantes différences sur le plan phénotypique et fonctionnel a été décrite *in vitro*, et *in vivo*. Les différents sous-types de DC humaines et leurs marqueurs sont répertoriés dans la Figure 19.





	Cellules de Langerhans de l'épiderme	DCs interstitielles du derme	DCs myéloïdes sanguines	DCS plasmacytoïdes sanguines
				
Lectine de type C	Langerine	DC-SIGN Récepteur au mannose	DC-SIGN Récepteur au mannose	BDCA-2
Molécules spécifiques	CD11c CD1a E-cadhérine	CD11c CD1a/CD14 CD11b CD36 Facteur XIIIa	CD11c	CD123 ILT7
TLRs	1,2,3,6(7),(10)	1,2,3,4,5,6,7,8	1,2,3,4,5,6,(7),8,10	1,6,7,9,10

Figure 19 Les populations de DC humaines et leurs marqueurs de surface

D'après (Ueno et al., 2007)

In vivo, on distingue deux types de DC chez l'homme comme chez la souris: les DC myéloïdes (mDC, également appelées DC conventionnelles ou classiques) et les DC plasmacytoïdes (pDC), mais il existe cependant de nombreuses différences entre les deux espèces. On trouve les pDC dans le sang, et les mDC dans les organes lymphoïdes secondaires, le sang, et les tissus périphériques, en particulier la peau où on distingue les cellules de Langerhans (LCs) de l'épiderme, et les DC interstitielles (intDC) du derme (Valladeau et Saeland, 2005).

Le rôle des différents sous type de DC dans l'induction des réponses immunitaires semble être bien spécifique (Palucka et al., 2010). Certaines populations sont impliquées dans l'induction de réponses humorales, d'autres dans l'induction de réponses cellulaires, d'autres encore dans la tolérance. Par exemple, les DC interstitielles du derme activent préférentiellement l'immunité humorale, tandis que les cellules de Langerhans induisent

préférentiellement l'immunité cellulaire (Figure 20) (Ueno et al., 2007). En outre, leurs capacités à médier la présentation croisée des Ag ne sont pas équivalentes. Les pDC, quant à elles, ont la particularité de sécréter de grandes quantités d'IFN de type I en réponse aux infections virales (Siegal et al., 1999).

Un choix éclairé de la population de DC à cibler peut donc potentiellement permettre d'orienter la réponse adaptative vers les voies les plus adaptées à la lutte contre le pathogène visé. D'autre part, comme présenté dans le paragraphe 1.2.3 du Chapitre 5, les DC en provenance d'un tissu particulier ont la capacité de conditionner l'adressage des cellules T vers ce même tissu. Le ciblage de populations spécifiques de DC, en conjonction avec le choix de la voie d'administration de l'Ag peut donc potentiellement permettre de contrôler la migration des cellules T vers les sites appropriés.

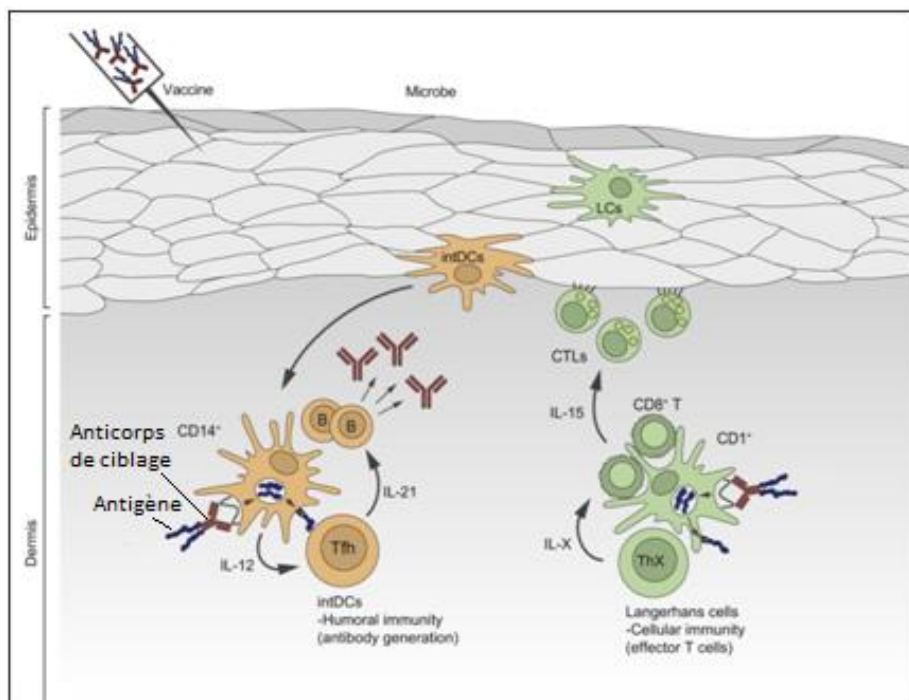


Figure 20 Principe de la modulation de l'induction des réponses vaccinales grâce au ciblage spécifique des DC

D'après (Palucka et al., 2010)

Les complexes Ag/Ac ciblant les intDC activent préférentiellement des réponses Ac qui sont amplifiées par l'action des cellules Tfh sécrétrices d'IL-21, tandis que les complexes ciblant les cellules de Langherans activent préférentiellement des réponses CTL. Le phénotype des cellules T CD4⁺ qui participent à cette voie (ThX) ainsi que la cytokine impliquée restent à définir.

D'autres systèmes peuvent également permettre d'adresser les Ag vers les DC *in vivo*. Ces systèmes peuvent être constitués de protéines de fusion comprenant des cytokines telles que le GM-CSF, des chimiokines, ou encore des toxines capables de lier les DC, comme l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*, la sous-unité B de la toxine de Shiga ou l'Ag protecteur (PA) produit par *Bacillus anthracis*. Des protéines de choc thermique, liant des récepteurs à la surface des DC, comme Hsp70 ou gp96 ont également été employées dans plusieurs modèles expérimentaux (Leclerc, 2007). Enfin, la portion Fc des Ig, qui se lie aux récepteurs Fc est également utilisée (Loureiro et al., 2010).

La stratégie de ciblage d'Ag sur les cellules dendritiques s'avère efficace pour déclencher des réponses immunitaires contre de nombreux Ag en présence de signaux d'activation (agonistes de CD40 et TLR-3) (Bonifaz et al., 2004; Hawiger et al., 2001). En revanche, en absence d'activation, pour certains marqueurs ciblés, le processus est tolérogène (Hawiger et al., 2001; Kretschmer et al., 2005). Cette stratégie nécessite donc dans certains cas d'être combinée à des systèmes pro-inflammatoires pour pouvoir être utilisable dans un contexte de vaccination.

De manière générale, bon nombre des systèmes adjuvants qui sont présentés dans ce chapitre sont plus efficaces s'ils sont combinés à d'autres approches. Certains adjuvants de nouvelle génération fonctionnent d'ores et déjà selon ce principe. Par exemple, les adjuvants AS04, AS02 et AS01, développés par GlaxoSmithKline combinent respectivement l'Alun au MPL, et le QS-21 à une émulsion huile eau ou à des liposomes. En outre, des stratégies associant outils de ciblage de l'Ag et ligands de TLR, peuvent potentiellement permettre d'engager « à la carte » les réponses immunitaires vaccinales, en tirant parti de la diversité et de la plasticité des DC (Coffman et al., 2010).

Chapitre 7 La protéine Tat du VIH-1 : un outil potentiel en vaccination

Comme indiqué précédemment, l'amélioration de l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires à base de protéines représente l'un des enjeux majeurs de la vaccinologie. De nombreuses approches sont d'ores et déjà explorées, alimentées par la connaissance de plus en plus précise des mécanismes d'induction des réponses immunitaires, mais également par l'étude des propriétés immunologiques de composés issus de microorganismes. Parmi ces composés, la protéine Tat du VIH-1 pourrait présenter un intérêt particulier du fait de ses nombreuses activités, dont certaines peuvent moduler différents mécanismes de la réponse immunitaire. Ce chapitre est consacré à la description de Tat et de certaines de ses propriétés.

1. Tat : transactivateur transcriptionnel du virus de l'immunodéficience humaine...

Le transactivateur transcriptionnel (Tat) est une protéine exprimée précocement après l'infection. Cette protéine de 86 à 101 résidus a été initialement impliquée dans la régulation des étapes précoces du cycle viral, médiée par son activité de transactivation de la transcription des gènes viraux (Dayton et al., 1986).

Tat fonctionne comme un adaptateur moléculaire : elle dirige les éléments de la machinerie de transcription cellulaire vers l'ARN viral en cours de synthèse. Ce processus stimule la processivité du complexe ARN polymérase II et l'élongation transcriptionnelle (Strebel, 2003), ce qui a pour conséquence d'augmenter l'efficacité de la transcription virale d'un facteur 100 (Weinberger et al., 2005). En effet, en absence de Tat, les ARN viraux produits sont majoritairement tronqués et non polyadénylés. En revanche, l'expression de Tat entraîne la production d'ARN fonctionnels, entiers et polyadénylés. Les étapes du processus de transactivation transcriptionnelle exercé par Tat sont résumées dans la Figure 21.

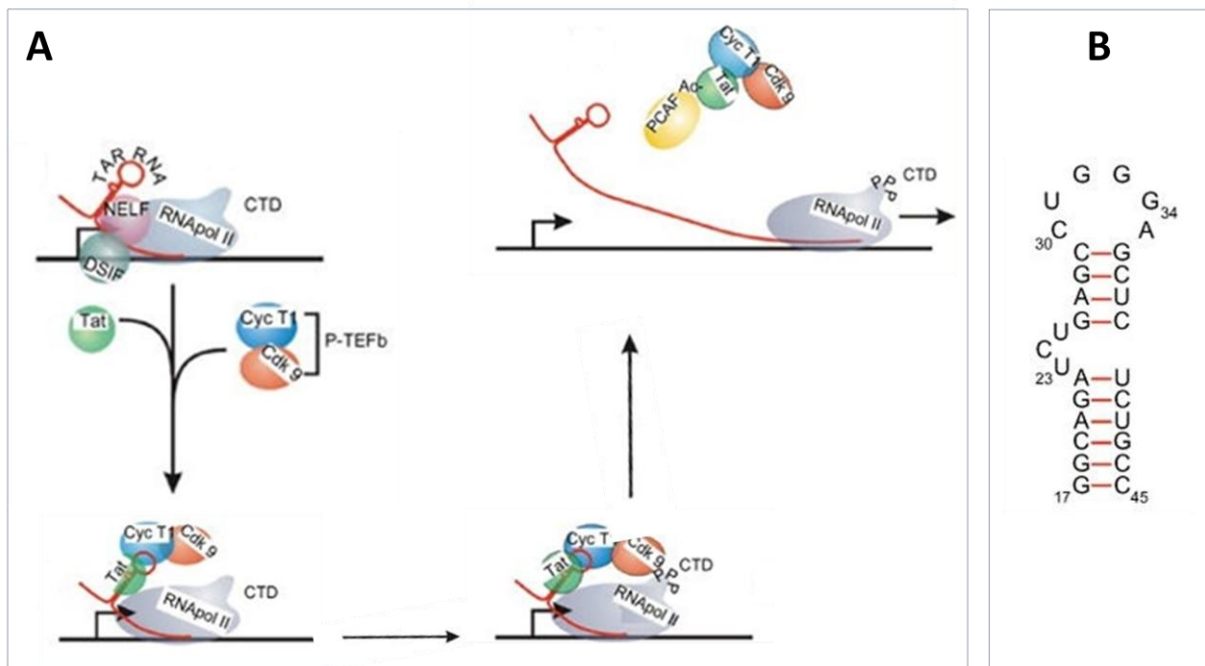


Figure 21 Mécanisme de la transactivation transcriptionnelle médiée par Tat

D'après (Strebel, 2003)

(A) La synthèse des ARNm par Pol II est étroitement contrôlée à l'étape d'élongation de la transcription par le facteur négatif d'élongation (NELF) et DSIF (DRB sensitivity-inducing factor). Le facteur positif de l'élongation de la transcription b (P-TEFb) est une kinase cycline-dépendante composée de Cdk9 et de la cycline T1 (CycT1). Il permet de restaurer l'élongation productive de la transcription en phosphorylant NELF, DSIF et le domaine C-terminal (CTD) de Pol II. (Johri et al., 2011) L'activité cellulaire de P-TEFb est contrôlée par le petit ARN nucléaire 7SK et la protéine HEXIM1 (hexamethylene bis-acetamide inducible protein 1), qui le séquestrent au sein d'un complexe 7SK/HEXIM/P-TEFb transcriptionnellement inactif. Tat est capable de lier 7SK, ce qui a pour conséquence de rompre le complexe régulateur et de libérer P-TEFb (Muniz et al., 2010). D'autre part, Tat recrute P-TEFb au niveau du promoteur du VIH-1. Pour capturer P-TEFb, Tat s'associe simultanément à CycT1 et à une structure en épingle à cheveux située à l'extrémité 5' du transcrit naissant appelée TAR (trans-activation responsive region) (Strebel, 2003), dont la structure est représentée en (B)

2. ... et tellement plus encore

En plus de son rôle dans la transactivation du VIH, Tat semble également impliquée dans la régulation de la transcription inverse qui précède l'intégration du génome viral via la liaison à la transcriptase inverse. Il semble qu'elle puisse stimuler ou inhiber son activité, en fonction de sa concentration. Des travaux montrent que Tat joue également un rôle en amont du processus de transcription, et aide au remodelage de la chromatine pour favoriser l'accès des facteurs de transcription aux LTR, en s'associant notamment à des histones acétyl

transférases. La protéine Tat intervient également dans le capping des ARNm viraux en se liant à l'enzyme cellulaire Mce1 qui catalyse ce processus.

Tat est relarguée activement par les cellules infectées (Ensoli et al., 1993; Chang et al., 1997). On la retrouve dans les surnageants de culture de cellules infectées ainsi que dans le sérum des patients à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Westendorp et al., 1995). Tat ne présente pas de séquence signal, et sa sécrétion s'effectue de manière non conventionnelle, c'est-à-dire indépendamment de l'activité du RE et de l'appareil de Golgi, et sans lyse des cellules infectées. (Rayne et al., 2010). La protéine Tat extracellulaire a tendance à s'attacher à la matrice extracellulaire et aux cellules avoisinantes, et à y pénétrer. Le processus d'internalisation de Tat a été très étudié mais reste toujours sujet à controverse. Cet aspect sera abordé plus en détail dans le paragraphe 4.2 de ce chapitre. Ce processus d'internalisation confère à la protéine Tat la capacité de pénétrer indifféremment dans de nombreux types de cellules, infectées ou non. Elle peut alors activer la transcription de virus latents s'ils sont présents, et exercer des perturbations de l'homéostasie des cellules. Ces perturbations peuvent être le résultat d'un effet direct de Tat sur la transcription des gènes cellulaires. En effet, pour exercer sa fonction de transactivateur, Tat détourne le complexe P-TEFb, induisant une compétition avec ses cofacteurs physiologiques qui peut conduire à une répression de gènes qui nécessitent P-TEFb pour leur expression. En particulier, Tat bloque l'expression des déterminants CMH II dans les cellules en inhibant l'activité de CIITA en se liant à la même surface de la cycline T1 (Kanazawa et al., 2000). Tat peut également interagir avec les facteurs généraux de la transcription TFIIB et TFIID (Veschambre et al., 1997), d'autres facteurs de transcription tels que NF- κ B, NFAT (nuclear factor of activated T cells), AP-1, mais également l'ADN cellulaire, et plus particulièrement les séquences de reconnaissance de certains facteurs de transcription (Dandekar et al., 2004). D'autre part, Tat peut être agoniste ou antagoniste de nombreuses protéines cellulaires, ce qui lui confère la capacité de déréguler de nombreux processus cellulaires, de manière directe ou indirecte. Selon une étude récente, répertoriant toutes les interactions publiées dans la littérature entre les protéines du VIH-1 et des protéines humaines (Ptak et al., 2008), Tat interfère avec 775 protéines différentes, de manière directe (dérégulations faisant intervenir une interaction physique) ou indirecte (dérégulations via l'activation de voies de signalisation). Ce chiffre représente 30% du total des interactions répertoriées pour l'ensemble des protéines du VIH-1 (Tableau 4).

	Interférences directes	Interférences indirectes	Total
Tat	219	556	775
Rev	45	21	66
Gp120	86	446	532
Total protéines			
VIH-1	834	1755	2589

Tableau 4 Nombre d'interférences décrites dans la littérature pour les protéines du VIH-1

D'après (Ptak et al., 2008)

Près des 2/3 des partenaires d'interaction de Tat sont des protéines nucléaires dont près de 15% sont des facteurs et des régulateurs de transcription, mais un grand nombre de partenaires identifiés sont extracellulaires, membranaires, ou cytoplasmiques (Ptak et al., 2008). Afin d'établir un panel des activités potentielles de Tat, j'ai cherché à répertorier les processus biologiques dans lesquels les partenaires de Tat identifiés dans cette étude sont impliqués. Cela a été réalisé à partir des séquences des différents partenaires, grâce au projet bio-informatique "Gene Ontology" (Anon. 2008.; Yves Terrat, communication personnelle). Le nombre extrêmement important d'activités biologiques décrites pour l'ensemble des partenaires de Tat, m'a conduit à ne pas réaliser une présentation exhaustive et détaillée de ces activités mais plutôt à orienter la présentation vers les activités reliées à l'activité du système immunitaire. Il ressort de cette méta-analyse bibliographique que Tat interfère avec au moins 96 protéines présentant des activités liées à l'immunité, soit 12,4 % de l'ensemble des partenaires de Tat. Le tableau qui suit répertorie les différents processus immunologiques dans lesquels ces protéines qui interfèrent avec Tat sont impliquées. Ces données soulignent la diversité des activités potentielles des protéines avec lesquelles Tat interfère, et donc indirectement la diversité des processus immunitaires que la protéine Tat est susceptible de déréguler, ouvrant de nouvelles pistes de recherche.

Chimiotactisme

CCL 1
CCL 1-like
CCL 2
CCL 3
CCL 4-like 1
CCL 5
CCR2 transcript variant 2
CCR5 receptor
CX3CL1
CXCL 10
CXCL 9
IL-10
IL-6
IL-6 receptor
SDF 1
TGF β 2
thrombospondin 1
VEGF

Sécrétion et signalisation des cytokines et chimiokines

CCL 2
CCR2 transcript variant 2
CD4
CD40
CD83
CX3CL1
IL-1 type i
IL-10
IL-12b
IL-6
IL-6 receptor
SMAD 3
STAT 6
TGF β 1
thrombospondin 1
TNF (tnf member 2)

Réponse innée

POLR3 155kda
POLR3 39 kda
POLR3 b
POLR3 g
beta fibroblast
CD180 antigen
IL-1 type i
inducible nitric oxide synthase
NCF 1
RNA polymerase III subunit C10
RNA polymerase III subunit C4
RNA polymerase III subunit C5
RNA polymerase III subunit C8

Apprêtement et présentation des Ag

MHC class i antigen
MHC class ib antigen
MHC class ii antigen
MHC class ii drb antigen
MHC dm alpha
MHC dm beta
MHC do alpha
MHC dp alpha 1
MHC dq alpha 2
MHC dq beta 1
MHC dq beta 2
MHC dr beta 3
thrombospondin 1

Différenciation des cellules immunitaires

BCL 2
BCL 6
CD83 antigen
GM-CSF

IL-10
IL-12b
IL-6
IL-7
MHC dm alpha
MHC do alpha
p53 transformation suppressor
TGF β 1

Prolifération des cellules B et T

BCL 2
BCL 6
beta fibroblast
CD40
IL-10
IL-12b
IL-6
IL-7
p53 transformation suppressor
stromal cell-derived factor 1
TGF β 1

Réponse humorale

BCL 2
CCL 2
CCR2 transcript variant 2
CD83 antigen
IL-6
IL-7
IRF7
LT α (tnf member 1)
MHC dm alpha
proteasome (macropain) beta 10
TNF (tnf member 2)

Réponse inflammatoire

BCL 6
CCL 5
CCR2 transcript variant 2
CX3CL1
IL-10
IL-20
IL-6
thrombospondin 1
TNF (tnf member 2)
TNF receptor member 1b

Activation leukocytaire

beta fibroblast
CD4
CX3CL1
IL-10
IL-12b
IL-6
SMAD 3
thrombospondin 1

Régulation de la croissance cellulaire

BCL 2
BCL 6
IL-7
p53 transformation suppressor
SMAD 3
TGF β 1
TGF β 2

Réponse cellulaire

CCL 5
CCR2 transcript variant 2
CCR5 receptor
CXCL 9
MHC class ib antigen
NCF 1

Commutation isotypique

BCL 6
CD40
IL-10
STAT 6
TGF β 1

Développement du système immunitaire

BCL 2
LT α (tnf member 1)
SMAD 3
TGF β 1

« lineage commitment » cellules T et B

BCL 2
IL-7
p53 transformation suppressor

Activité des neutrophiles

IL-6
IL-6 receptor
NCF 1

Réponse de phase aigue

C/EBP beta
IL-6
IL-6 receptor

Régulation de la sécrétion des Ig

CD40
IL-6
TNF (tnf member 2)

Réponse T-helper 2

BCL 6
IL-10
STAT 6

Réponse T-helper 1

IL-12b
VEGF

Homéostasie des cellules B et T

BCL 2
TGF β 1

Phagocytose/endocytose

TGF β 1
vitronectin

Cytotoxicité leukocytaire

IL-12b
iNOS

Tolérance

CCR 4
TGF β 1

Adhésion et “rolling” leukocytaire

TNF (tnf member 2)

Régulation de la fièvre

CCL 5

Sélection positive thymique

MHC dm alpha

Régulation de la formation des CG

BCL

3. Structure et Organisation de la protéine Tat

Des études de RMN ont montré que, sous forme libre, la protéine Tat ne présente pas d'éléments de structure secondaire et tertiaire bien définis, et que son repliement peut changer de façon drastique selon que l'environnement est aqueux ou hydrophobe (Campbell et Loret, 2009). Ces données indiquent que Tat est une protéine de nature flexible, intrinsèquement non structurée. En revanche, la résolution récente de la structure du complexe Tat-P-TEFb a permis de montrer que suite à son interaction avec P-TEFb et deux ions Zn, le domaine d'activation de Tat acquiert une structure bien ordonnée (Tahirov et al., 2010). Tat tolère jusqu'à 40% de variation dans sa séquence sans perte d'activité transcriptionnelle. Les résidus conservés sont impliqués dans des liaisons hydrogène intra- ou intermoléculaires, la coordination du Zn, et enfin l'interaction avec Cdk9 et la cycline T1 (Tahirov et al., 2010). Tat est codée par deux exons. Le premier exon code pour une séquence de 72 acides aminés contenant le domaine d'activation minimal. Le second exon code pour une séquence C-terminale de 14 acides aminés qui n'est pas requise pour la transactivation mais contient un motif RGD, qui est une séquence de liaison aux intégrines. Tat contient six domaines fonctionnels, schématisés sur la Figure 22.

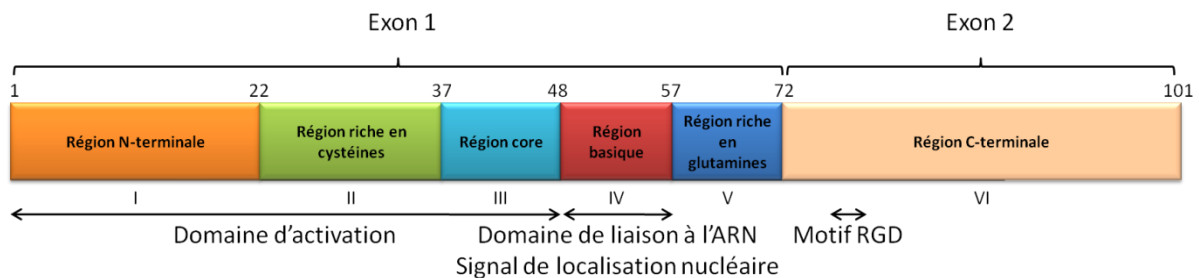


Figure 22 Organisation de la protéine Tat

La région I (résidus 1 à 21) est riche en prolines et présente également un résidu tryptophane conservé en position 11 qui est essentiel pour le relargage de Tat par les cellules infectées et sa translocation dans le cytosol des cellules avoisinantes (Johri et al., 2011).

La région II (résidus 22 à 37) est riche en cystéines, et comporte 7 cystéines bien conservées en position 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37. La mutation de chacune de ces cystéines à l'exception de la cystéine en position 31 entraîne une perte de la capacité de transactivation de Tat. La structure cristalline du complexe Tat-PTEFb montre que les cystéines conservées en position 22, 25, 27, 30, 34, 37 et l'histidine en position 33 sont impliquées dans la liaison

d'ions Zn (Tahirov et al., 2010). La région II est essentielle pour l'activité de transactivation de Tat (Johri et al., 2011).

La région III (résidus 38 à 48) est riche en résidus hydrophobes. Elle présente une phénylalanine conservée en position 38 et la séquence conservée ⁴¹KGLGISYG⁴⁸ entre les résidus 41 et 48 (Johri et al., 2011)

La région IV (résidus 49 à 57) est riche en acides aminés basiques et comprend une région ⁴⁹RKKRRQRR⁵⁶ bien conservée, essentielle pour la liaison de Tat à TAR. Ce domaine basique est requis pour la liaison et l'internalisation de Tat dans les cellules (Johri et al., 2011), et il contient une séquence de localisation nucléaire permettant la translocation de Tat vers le noyau (Rana et Jeang, 1999).

La région V (résidus 58 à 72) est riche en résidus glutamine et a été impliquée dans la polymérisation des microtubules et l'apoptose des cellules T médiée par Tat. Elle présente une variabilité élevée (Johri et al., 2011).

La région VI (résidus 73 à 101) est codée par le second exon. Cette région est facultative pour la transactivation « *in vitro* » mais nécessaire « *in vivo* ». (Campbell et Loret, 2009). Cette région est relativement variable, et certains isolats présentent une mutation ponctuelle qui crée un codon stop dans la séquence codante, donnant lieu à une protéine tronquée de 86 acides aminés. C'est la forme de Tat la plus utilisée en recherche (Campbell et Loret, 2009). Cette région présente un motif ⁷⁸RGD⁸⁰ conservé impliqué dans la liaison des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_1\beta_5$ (Zocchi et al., 1997). Le motif ⁸⁶ESKKKVE⁹², présent également dans cette région, est impliqué dans la transcription des gènes du VIH médiée par NF- κ B. Cette région est également impliquée dans des modifications de la structure du cytosquelette ainsi que dans la signalisation et l'activation des cellules T (Johri et al., 2011), et dans la stimulation du capping co-transcriptionnel de l'ARNm du VIH-1 via une interaction directe avec l'enzyme de capping MceI. (Chiu et al., 2002).

4. Tat : outil potentiel pour la vaccination

4.1. Nouvel adjuvant ?

De nombreuses données de la littérature indiquent que Tat présente des activités pro-inflammatoires, comme peuvent l'être certaines propriétés des adjuvants. On notera par

exemple sa capacité à induire la sécrétion de chimioattractants (Izmailova et al., 2003) et de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α (Buonaguro et al., 1992), ou encore favoriser la maturation des DC (Fanales-Belasio et al., 2002a). Ces éléments ont soulevé la question de savoir si la protéine Tat pourrait être dotée d'une propriété adjuvante intrinsèque. Pour répondre à cette question, la capacité d'une protéine Tat de 101 acides aminés à déclencher des réponses immunitaires en absence d'adjuvant chez la souris a été examinée au laboratoire. Cette étude a permis de montrer que la protéine Tat est capable de déclencher des réponses anticorps et des réponses T en absence d'adjuvant, de manière spécifique et dose-dépendante (Kittiworakarn et al., 2006). Ces travaux ont permis de montrer que l'effet n'est pas dépendant d'un fond génétique particulier puisque l'effet est aussi observé chez des souris non consanguines SWISS.

Afin d'identifier les régions importantes pour l'effet, l'immunogénicité d'une série de dérivés polysubstitués a été étudiée. Il a ainsi pu être montré que l'effet n'est pas relié à la capacité transactivatrice de Tat. D'autre part, les substitutions introduites dans la région basique et le motif RGD se sont avérées sans effet sur la capacité de la molécule à déclencher des réponses Ac en absence d'adjuvant, indiquant qu'ils ne sont probablement pas impliqués dans l'effet. A l'inverse, les remplacements introduits dans les régions N-terminale, riche en cystéines et core inhibaient la capacité de Tat à déclencher la réponse Ac en absence d'adjuvants. La mutation des 7 cystéines affecte également la capacité T stimulante de la molécule. Cet élément pourrait expliquer la perte de l'effet autoadjuvant sur la réponse anticorps si tant est que celle-ci soit dépendante de la réponse T. A l'inverse, le mutant de la région core a toujours une capacité T stimulante. L'ensemble de ces éléments suggère que cette capacité T stimulante pourrait être nécessaire mais qu'elle n'est pas suffisante pour expliquer l'effet autoadjuvant.

De plus, cette étude a permis de montrer que l'oligomérisation est requise pour l'effet autoadjuvant. En solution, la protéine Tat 101 a tendance à évoluer vers des formes oligomériques médiées par des ponts disulfures. Des expériences de substitutions de cystéines en sérine ont permis de montrer que les dérivés incapables d'oligomériser étaient également incapables de déclencher des réponses Ac en absence d'adjuvant. Ainsi, la forme complètement réduite de Tat s'est avérée dépourvue de l'effet, tandis que les dimères médiés par la présence d'une seule cystéine (la cystéine en position 34) présentent une capacité autoadjuvante comparable à celle de la molécule sauvage.

Ces éléments soulèvent des questions concernant le mécanisme de cette propriété adjuvante, et notamment le rôle de la réponse T dans l'effet. L'un des objectifs de cette thèse a donc été de caractériser de façon plus approfondie les mécanismes moléculaires et cellulaires qui gouvernent l'effet autoadjuvant, et en particulier d'évaluer le rôle de la réponse T dans l'effet. Le second objectif de cette partie du travail de thèse a été d'évaluer la transférabilité de la propriété à des Ag hétérologues, afin d'estimer le potentiel de la molécule Tat comme nouvel adjuvant pour la vaccination. Ces aspects sont développés dans le premier chapitre des résultats.

4.2. Outil de ciblage cellulaire

La protéine Tat est dotée de la capacité de lier un grand nombre de cellules et d'y être internalisée. Les études initiales indiquaient que celle-ci est capable de rejoindre le cytosol et le noyau des cellules (Frankel et Pabo, 1988). Cette propriété, dite de « transduction » a été très étudiée, car elle pourrait inspirer de nouveaux systèmes de vectorisation moléculaires dont les applications sont multiples.

Le domaine minimal de Tat responsable de l'activité de translocation correspond à la séquence ⁴⁷RKKRRQRR⁵⁷, et constitue la région basique de la protéine. D'autres protéines possèdent des domaines présentant cette propriété. C'est par exemple le cas de l'homéoprotéine Antennapedia de drosophile. Ces domaines sont appelés PTD, pour *protein transduction domain*. Ils ont la caractéristique d'être cationiques, riches en résidus lysine et/ou arginine ou sont amphipathiques par nature (Brooks et al., 2010). Les PTD ont inspiré la conception de nombreux peptides synthétiques dotés d'une capacité de transduction appelés CPP (cell penetrating peptide).

Le mode d'internalisation de Tat et des CPP est mal caractérisé, et est toujours intensément débattu. Trois mécanismes potentiels ont été envisagés : pénétration directe à travers la membrane (Herce et al., 2009), endocytose (Johnson et al., 2011), et translocation grâce à la formation de micelles inversées (Plénat et al., 2004).

La majorité des travaux ont dans un premier temps établi que la translocation pouvait fonctionner à 4°C, suggérant que les CPP transloquent à travers la membrane selon un mécanisme non endosomal indépendant de l'énergie. Ce phénomène a été attribué à des interactions électrostatiques directes avec les phospholipides membranaires chargés négativement. Plus tard, de nouvelles données ont établi que ce mode de transport pouvait

correspondre à un artéfact méthodologique dû à la fixation des cellules. Ces éléments ont entraîné la remise en question de ce modèle de translocation directe, et de nouveaux mécanismes ont été proposés pour expliquer l'internalisation cellulaire des CPP. L'endocytose a été rapidement envisagée, et les trois principaux types d'endocytose (médiée par la clathrine, médiée par la cavéoline et la macropinocytose) ont été impliqués dans le phénomène (Johnson et al., 2011). Aucun récepteur spécifique permettant la liaison de Tat aux cellules n'a été identifié. Il semble que les charges de son domaine basique lui permettent de lier des molécules chargées négativement à la surface des cellules, qui peuvent être des protéoglycanes, en particulier les héparanes sulfate. Des études montrent l'existence d'un mécanisme dépendant de l'énergie initié par l'interaction des CPP avec les héparanes sulfate à la surface des cellules qui résulte en leur endocytose et à leur accumulation dans les endosomes (Tyagi et al., 2001). Le caractère ubiquitaire de la distribution des HS explique que Tat comme tous les CPP puissent cibler un grand nombre de types cellulaires.

Etant donné que les CPP ont des effets directs sur les propriétés biophysiques de membranes purifiées, les travaux visant à élucider le mécanisme biophysique sous jacent au phénomène indépendant de l'énergie se sont poursuivis. Des simulations de la dynamique moléculaire (Herce et AE Garcia 2007), validées expérimentalement par une étude récente (Herce et al., 2009), ont permis de montrer que les CPP établissent des interactions fortes avec les groupements phosphate de la bicouche lipidique, et contribuent à déstabiliser cette dernière et en y induisant des pores transitoires à travers lesquels ils diffusent. Un troisième mécanisme a été décrit, basé sur la formation de micelles inversées. Ces micelles correspondent à des agrégats de surfactants colloïdaux dans lesquels les groupements polaires se concentrent, les groupes lipophiles étant tournés vers l'extérieur dans le solvant. D'après ce modèle, un dimère de CPP se combine avec des phospholipides chargés négativement, générant une micelle inversée à l'intérieur de la bicouche lipidique qui permet au peptide de rester dans un environnement hydrophile (Plénat et al., 2004). Il semble que la distribution des CPP entre la membrane interne et externe de la membrane soit asymétrique, et que ce phénomène produise un champ électrique capable de générer un événement comparable à une électroporation lorsque le niveau de peptide sur le feuillet externe atteint un seuil critique (Cahill, 2010).

Malgré les zones d'ombres qui subsistent concernant le mode d'internalisation et le devenir intracellulaire des CPP, plusieurs études tendent à montrer que différents mécanismes peuvent s'exercer simultanément (Johnson et al., 2011). Ces voies endosomales et non

endosomales pourraient donc ne pas être mutuellement exclusives. L'ensemble de ces voies d'internalisation semble conduire au transfert des CPP et de leur éventuel cargo vers le cytoplasme, de manière directe ou par échappement endosomal lorsque le mécanisme d'internalisation fait intervenir les voies d'endocytose (Johnson et al., 2011).

Il est très vite apparu que la propriété de translocation des CPP pouvait être transférée à toute sortes de molécules (acides nucléiques, protéines ou encore agents de contraste) par couplage covalent ou non covalent. Ces travaux ont permis d'envisager l'utilisation des CPP comme vecteur de transport de molécules cargo, afin de moduler leur biodistribution, et/ou permettre leur délivrance intracellulaire, pour des applications en imagerie, en thérapeutique ou en vaccination. Cette propriété de transduction vers le cytosol laissait en effet penser que les CPP pouvaient accéder aux voies de présentation CMH I de manière directe et permettre l'induction de réponses T CD8⁺ (Kim et al., 1997). Plus tard, il est apparu que le ciblage spécifique d'Ag vers les CPA, en augmentant l'efficacité de l'internalisation médiée par l'endocytose, éventuellement suivie d'une fuite des Ag du compartiment endosomal vers le compartiment cytoplasmique, pouvait également concourir à la présentation croisée des Ag dans la voie CMH I. Les CPP se sont avérés efficaces pour améliorer la présentation d'Ag exogènes par les molécules CMH I (Kim et al., 1997) et induire des réponses T cytotoxiques (Schutze-Redelmeier et al., 1996)(Mitsui et al., 2006). L'effet des CPP sur la présentation restreinte au CMH de classe II et l'induction de réponse la T auxiliaire était, quant à lui, peu clair au commencement de ma thèse. En effet, une seule étude avait des effets d'augmentation de la présentation antigénique restreinte au CMH de classe II et ceux-ci avaient été obtenus avec un CPP présentant une séquence de translocation fortement optimisée (Mitsui et al., 2006)

Compte tenu de la capacité de la région basique de Tat à lier les héparanes sulfates et à se comporter comme un CPP, nous avons dans un premier temps abordé au laboratoire la question du rôle de régions basiques et des héparanes sulfate dans la présentation antigénique par endocytose ou via le récepteur Fcγ. Dans un second temps, nous avons posé la question du rôle des régions basiques et des héparanes sulfate dans la présentation antigénique croisée médiée via le récepteur Fcγ. Les résultats de ces deux études sont présentés dans le second chapitre de la partie du manuscrit consacrée aux résultats.

Résultats

Chapitre 1 Caractérisation et transfert de la propriété autoadjuvante de la protéine Tat à des antigènes hétérologues

1. Introduction

Pour induire une réponse anticorps, les Ag doivent être capables d'activer des lymphocytes B spécifiques. Cette activation est sous la dépendance d'un signal spécifique de l'Ag délivré par le BCR, et de signaux complémentaires fournis par les cellules T spécifiques de l'Ag. La plupart des Ag activent les lymphocytes B selon ce mécanisme T-dépendant, mais certains Ag, dits thymo-indépendants, ont la capacité d'induire des réponses humorales de type IgM, et parfois de type IgG, en absence d'aide des cellules T (Dintzis et al., 1983). Ces Ag peuvent être distingués en deux classes: les Ag T-indépendants de type 1 (TI-1) qui activent les lymphocytes B de manière polyclonale, comme le LPS, et les Ag T-indépendants de type 2 (TI-2), qui activent les lymphocytes de manière spécifique, via l'agrégation du BCR et un second signal d'origine inflammatoire (Mond et al., 1995). Les Ag TI-2 sont généralement des polymères portant des motifs répétés d'épitopes identiques, capables de lier et d'agréger très efficacement le BCR. Des travaux antérieurs conduits au laboratoire n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation de la quantité d'Ig totale dans le sérum des souris immunisées avec Tat, ce qui rend peu probable que la protéine appartienne au groupe d'Ag T-indépendants de type 1. En revanche, la capacité de Tat à oligomériser grâce à la formation spontanée de ponts disulfure pourrait créer des motifs antigéniques répétés qui pourraient permettre à la protéine Tat d'induire efficacement l'agrégation du BCR. Cet événement pourrait faciliter l'activation de lymphocytes B spécifiques et même permettre que cette activation se fasse en absence de l'aide des lymphocytes T, comme le font les Ag de T-indépendants de type 2.

2. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude a été dans un premier temps de rechercher la présence d'épitopes répétés dans la molécule Tat sous forme oligomérique. Puis de déterminer le caractère T dépendant ou indépendant de la réponse contre la protéine Tat. Enfin, nous avons évalué si la propriété adjuvante de Tat peut être transférée à des Ag hétérologues.

3. Résultats

Nos travaux ont permis de mettre en évidence la présence d'un épitope répété au sein de la forme oligomérique de Tat, et d'établir la nature T-dépendante de la réponse anticorps anti-Tat en absence d'adjuvant. Nous observé que la protéine Tat induit des réponses T de type Th2. Nous avons déterminé le déterminant minimal responsable de la propriété adjuvante et montré que celui-ci est capable de conférer à des Ag modèles hétérologues de nature peptidique ou hapténique la capacité à déclencher des réponses anticorps en absence d'adjuvant.

L'ensemble de ces résultats sont présentés dans l'article qui suit et qui est actuellement soumis pour publication à Journal of Immunology.

Oligomerization of HIV-1 Tat allows a mechanism of Th2-B collaboration to raise a humoral immune response in the absence of adjuvant

Adeline Gadzinski, Delphine Matz and Michel Léonetti

From the CEA, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Institut de Biologie et Technologies de Saclay, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé, Gif-Sur-Yvette, F-91191 France.

Address correspondence to Dr. Michel Léonetti, Batiment 152, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) C.E.A SACLAY, 91191 GIF-SUR-YVETTE CEDEX, France.
Phone: 33169086456; Fax: 33169085907; E-mail: michel.leonetti@cea.fr

Running title: Th2-B collaboration and adjuvant-free antibody response

ABSTRACT

Few proteins are able to raise an immune response in the absence of adjuvant and here we attempted to decipher the molecular and cellular mechanisms controlling the ability of the human immunodeficiency virus Tat protein to raise an adjuvant-free antibody response. We showed that Tat oligomerization, which we previously showed to be absolutely required for adjuvanticity, leads to the formation of at least one repetitive B-cell epitope. Furthermore, we found that the adjuvant property is not related to bystander effects and that it is a T-cell dependent phenomenon in which a Th2 profile of immune response predominates. These results indicate that the T-B collaboration supporting an anti-protein antibody response, which usually requires adjuvants, can work in their absence with Tat since this monomeric protein is endowed with a capacity to oligomerize and thus to express repetitive B-cell epitopes. Also, we showed that two unrelated model antigens become adjuvant-free immunogenic in the presence of fragment Tat1-57, indicating that the property is transferable to other antigens and might thereby bypass the use of conventional adjuvants or potentiate their effects, opening new perspectives in the field of vaccination

INTRODUCTION

Few proteins are capable of raising an antibody response in the absence of adjuvant (1;2;3;4;5) and therefore possess characteristics that allow to reach the threshold required to induce activation and differentiation of B-lymphocytes. The signals involved in B-cell stimulation can be mediated by i) the B-cell receptor (BCR), ii) helper T-cells, iii) TLRs, iv) cytokines and membrane receptors expressed or induced by T-cells, DCs and epithelial cells (6). One might ask at what level proteins endowed with an adjuvant property act and if the characteristics of activation are similar to those used by adjuvants. The answer to this basic question might have consequences in the field of vaccination. Indeed, adjuvants may present side effects (7), and their use is sometimes hardly accepted by human populations (8). Furthermore, although adjuvanted, the proteins must be injected repeatedly to vaccinate, indicating that the current adjuvants cannot fully overcome the low immunogenicity of the protein-based vaccines. Therefore, the identification of the molecular determinant controlling an adjuvant-free immune response might pave the way to vaccinating approaches bypassing the use of adjuvants or potentiating their effects. For these reasons, we are interested in the deciphering of the cellular and molecular mechanisms controlling the ability of the transcriptional transactivator (Tat) of human immunodeficiency virus (HIV) to raise a humoral immune response in the absence of adjuvant (5).

Tat is a protein with numerous biological activities some of which resemble those raised during the initiation of an immune response and are reminiscent of some triggered by adjuvant. Thus, Tat was suggested to induce chemotaxis of monocytes and macrophages (9), secretion of proinflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6 and TNF- α (10) and angiogenesis (11;12;13). Also, Tat was proposed to target monocyte-derived dendritic cells and enhance their maturation, function, and antigen-specific T-cell responses (14). Furthermore, Tat can reprogram dendritic cells to express chemoattractants for activated T-cell and macrophages (15). It is difficult to determine if some of the above biological activities are indeed involved in the ability of Tat to raise a humoral immune response in the absence of adjuvant. In previous work, we focused on identification of the Tat determinant and the molecular events associated with this property. We showed, using a series of chemically synthesized Tat derivatives, that the adjuvant property is controlled by the core-region of Tat and that cysteine-mediated oligomerization is a key molecular event in the phenomenon (5).

In the present study, we further document the cellular and molecular mechanisms controlling the ability of Tat to raise an adjuvant-free humoral immune response. We first showed that Tat oligomerization leads to the formation of at least one repetitive B-cell epitope, which suggested that Tat oligomers might cross-link BCRs on B-lymphocytes making them able to secrete antibodies in the absence of T-cell help. However, we subsequently observed that the adjuvant-free antibody response is a T-cell dependent phenomenon in which a Th2 response predominates. Then, using a series of truncated Tat fragments, we found that the determinant controlling the adjuvant property is located in the region 1-57 of the protein. Furthermore, we observed that fragment Tat1-57, which contains the core and cysteine-rich areas previously shown to be required for the disulfide-mediated oligomerization of Tat (16) and for the adjuvant-free antibody response (5), contains all the T-cell epitopes of the protein in BALB/c mice of the H-2d haplotype, suggesting that adjuvanticity depends on the T-cell epitope content. Finally, we showed that the phenomenon is not related to bystander effects. Altogether, these observations indicate that the T-B collaboration supporting an anti-protein antibody response, which usually requires adjuvants, can work in their absence due the ability of Tat to oligomerize and thus to express a repetitive B-cell epitope.

In the second part of our work, we examined whether the adjuvant-free immunogenic property can be provided to other antigens. We showed that two unrelated model antigens become capable of raising an antibody response in the absence of adjuvant only when they are covalently coupled to fragment Tat1-57. We also observed that the unrelated antigen containing a T-cell epitope becomes able to raise a Th2 response in the presence of Tat1-57. However, in contrast with what was found for the humoral immune response, coupling is not an absolute requirement for the phenomenon, suggesting that the adjuvant-free T-cell response depends on bystander effects. Therefore, the determinant of adjuvanticity might be used to bypass the use of conventional adjuvants or potentiate their effects, opening new perspectives in the field of vaccination.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of Tat proteins and peptides, biotinylation. The peptides used in this study were chemically synthesized using the Fmoc/tert-butyl strategy on an Applied Biosystems 433A synthesizer. The chemical procedure used 0.1 mmol of Fmoc-Asp(OtBu)-PAL-PEG-PS resin, a 10-fold excess of each amino acid, dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole and diisopropylethylamine/N-methyl pyrrolidone. Tat Phe³⁸ and Thr³⁹ were replaced by the pseudoproline residue Fmoc-Phe-Thr, and cys-trityl residues were used. When necessary, N-terminus biotinylation was performed using 50 μ mol of resin, a 5-fold excess of d-biotin (Sigma), dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole, and O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate and a 20-fold excess of diisopropylethylamine, and N-methyl-pyrrolidone. Cleavage and deprotection were then achieved using a mixture of trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/water (9.5/0.25/0.25, v/v/v). The crude material was precipitated twice with cold tert-butyl methyl ether and subsequently dissolved in 15% aqueous acid. The peptides were then purified by HPLC on a C18 Supelco column. The synthesized peptides and proteins were characterized by mass spectrometry and purity was then assessed by HPLC. They were kept freeze-dried at -20°C.

A series of fifteen 15-mer overlapping Tat peptides encompassing the full-length Tat1-86 sequence prepared previously (5) was used. Due to oxidation, which impairs its storage, peptide 7 was not used during the experiments. The sequence of Tat1-86 and of its truncated moieties was derived from a consensus sequence described in Kittiworakarn et al. 2006.

Analysis of the expression of a repetitive B-cell epitope after Tat-oligomerization. Tat oligomers were prepared using the procedure previously described by Kittiworakarn et al. (5). Monomeric Tat and Tat oligomers were then incubated overnight at 4°C in microtitration ELISA plates previously coated either with bovine serum albumin or with a monoclonal antibody specific to the N-terminal Tat part of the molecule. Then, plates were washed and a rabbit polyclonal antibody specific to the same epitope was added. After 30-minute incubation, plates were washed and antibody binding was assessed using a goat anti-rabbit antibody covalently coupled to peroxidase and ABTS as substrate. Specific binding was determined by subtracting the absorbance in plates coated with serum albumin to that measured in plates coated with the monoclonal anti-Tat antibody.

Immunization of mice. For the assessment of the humoral immune response, groups of six female BALB/c mice (Charles River, France) were immunized twice, two weeks apart, by subcutaneous injection at the tail base with 100 μ l of a PBS solution containing either 0.51 or 2.54 nmol of antigen. Blood samples were collected at different times after the second injection. For the assessment of the T-cell response, groups of six female BALB/c mice were immunized twice at two-week intervals with the full-length Tat1-86 protein and received a third immunization eight weeks later. Spleens were collected two weeks later for the T-cell analysis by ELISPOT.

To assess the role of the T-cell response in the adjuvant effect, 4 male C57BL/6 mice from the CD3 ϵ knock-out Ly5.1 lineage, (CDTA-CNRS, Orléans, France) and 4 male wild-type C57Bl/6 mice (Charles River, France) were immunized twice with 50 μ g of full-length Tat1-86, as described above.

Antibody titration by enzyme immunoassay. Microtiter plates (Nunc) were coated overnight at 4 °C with a 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4 containing Tat1-86 (1 μ g/ml), different Tat peptides (10 μ g/ml), peptide DT90-106 from diphtheria toxin, biotin covalently coupled to bovine serum-albumin, respectively. Proteins were coated at a 1 μ g/ml concentration while peptides were used at 10 μ g/ml. The plates were then saturated with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.3% bovine serum albumin. Individual antisera were serially diluted in the same buffer containing 0.1% bovine serum albumin and incubated in the wells. After overnight incubation at 4 °C, antibody binding was assessed using a goat anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (Interchim) and 2,2'-azinobis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma) as substrate. Titers were defined as the serum dilution giving an absorbance value of 0.6UDO after 30 minutes of incubation. For statistical evaluation, a Mann-Whitney test was used. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

For the evaluation of the anti-Tat IgG1/IgG2a balance, sera from five Tat1-86 immunized BALB/c mice were serially diluted and incubated overnight at 4°C in microtitration ELISA plates previously coated with Tat. Then, plates were washed and either a polyclonal goat anti-mouse IgG1 antibody conjugated to peroxidase or a polyclonal goat anti-mouse IgG2a conjugated to peroxidase was added. After 30 minutes incubation, plates were washed and antibody binding was assessed using ABTS as substrate. Titer were defined as the serum dilution giving an absorbance value of 0.3UDO after 30 minutes of incubation.

Analysis of the T-cell response by ELISPOT. Spleens from immunized mice were harvested and cell suspensions prepared. RBCs were lysed with a Gey buffer. Cells were washed twice, counted, and diluted in a RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, streptomycin/penicillin and 100 μ M 2-mercaptoethanol. 96-well plates containing nitrocellulose filters (Millipore) were previously coated overnight at 4°C with the anti-IL-4 monoclonal antibody BVD4-1D11 (BD Pharmingen) diluted to 0.5 mg/ml in a carbonate buffer 0.1 M pH 9.6. The antibody-coated plates were washed three times with RPMI 1640 medium and saturated with RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum for 2 h at 37 °C. Splenocytes (0.9×10^6 cells/well) were seeded in the antibody-coated plates and challenged with the antigens. For Tat1-86 T-cell epitope mapping, either a pool containing the fourteen 15-mer overlapping Tat1-86 peptides or the fourteen individual peptides (final concentration: 1.25 μ M) were used. For the assessment of the transfer of the self-adjuvant effect, splenocytes were challenged with peptide DT92-106. Concanavalin A (5 μ g/ml) was used as a positive control, while an irrelevant peptide and culture medium were used as negative control. After an overnight incubation at 37 °C in 7% CO₂, plates were washed six times with a PBS solution containing 0.05% Tween 20, and incubated for 1.5 h with biotinylated anti-IL-4 antibody BVD6-24G2 or anti-IFN- γ antibody (BD Pharmingen). After extensive washings, plates were incubated for 1 h at room temperature with 50 μ l/well of alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Roche Molecular Biochemicals). Spots were visualized using BCIP (5-bromo-4,3-indolyl phosphate), and NBT (nitroblue tetrazolium) (Promega) as substrates. Spot-forming cells (SFCs) were counted using an ELISPOT reader (Aid Diagnostika). The results were expressed as the number of SFCs/ 10^6 splenocytes. For statistical evaluation, a t test was used. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Tat oligomerization leads to the formation of a N-terminal repetitive B-cell epitope motif.

Oligomerization can lead to the formation of repetitive B-cell epitope motifs. Therefore, as we previously observed that Tat can make cysteine-mediated oligomers when it is dissolved in a PBS buffer and that the adjuvant-free anti-Tat antibody response is mainly directed against the N-terminal area of the protein (5), we investigated whether Tat oligomerization leads to the formation of a repetitive B-cell epitope motif located in the N-terminal portion of the molecule. For this we used a Tat protein of 86 residues (Figure 1A), called Tat1-86. We first incubated the monomeric and oligomeric Tat proteins on microtitration plates coated with a mouse monoclonal antibody specific to the N-terminal part of the molecule. Then, we washed the plates and added a rabbit polyclonal antibody specific to the same epitope. We detected antibody binding using a goat anti-rabbit antibody covalently coupled to peroxidase and ABTS as substrate. As shown in Figure 1B, binding was poor with monomeric Tat. In contrast, a twenty-one fold higher binding was observed when the same amount of oligomeric Tat was incubated on the plates. Therefore, we concluded that Tat oligomerization leads to the formation of an N-terminal repetitive B-cell epitope motif.

The adjuvant effect of Tat depends on the T-cell response, and triggers a predominant Th2 response with T-cell epitopes located in the region 1-57 of the molecule.

As it is well known that repetitive B-cell epitope motifs can bridge several B-cell receptors (BCRs) on a B-lymphocyte, thus making it able to secrete Ig via a T-independent mechanism (17), we investigated whether the adjuvant effect depends on the T-cell response. To this aim, we compared the ability of Tat1-86 to raise an antibody response in wild-type C57BL/6 mice and CD3 ϵ knock-out C57BL/6 mice, lacking T cells (18). As we previously observed (not shown) that the anti-Tat antibody response in the absence of adjuvant is lower in these Th1 biased mice than in Th2 biased BALB/c mice (19;20) which were previously used when the adjuvant property was found (5), we injected these animals twice with 50 μ g of antigen per injection. Then, we bled the animals and measured the anti-Tat antibody response

by ELISA. As shown in Figure 2, wild-type C57BL/6 mice produced significant amounts of anti-Tat antibodies, which are significantly ($p=0.03$) higher than those found in CD3-deficient mice. Therefore, the ability to raise a humoral immune response in the absence of adjuvant is a T-cell-dependent phenomenon. Then, we investigated the Th1/Th2 balance of the adjuvant-free antibody response using BALB/c mice. For this purpose, we collected spleens from Tat1-86 immunized mice, and challenged splenocytes with a control peptide, or Tat1-86 or a pool of fourteen overlapping peptides encompassing the Tat sequence. IL-4 and IFN- γ producing cells were counted by direct visualization in an ELISPOT assay and the results expressed as spot-forming cells (SFCs) per 10^6 splenocytes. With Tat1-86 or the pool of Tat peptides, we found a significant number of IL-4 SFCs (Figure 3A) but no IFN- γ SFCs (Figure 3B). Furthermore, investigation of the anti-Tat IgG1/IgG2a balance in these mice (Figure 3D) showed that, in the absence of adjuvant, the IgG1 isotype predominates. Therefore, we concluded that the adjuvant-free anti-Tat immune response is biased towards a Th2 phenotype.

In order to map the Tat T-cell epitopes, we challenged splenocytes from Tat1-86 immunized mice with fourteen 15-mer overlapping Tat peptides, individually, and investigated the presence of IL-4- and IFN- γ -secreting-cells by ELISPOT. In agreement with what was observed in the experiments done with the pool of Tat peptides, no IFN- γ SFCs were detected, whatever the peptide used (not shown), while significant IL-4 SFCs were measured for eight Tat peptides (Figure 3C). More precisely, we detected a significant number of IL-4 SFCs in the presence of peptides 1, 2, 4, 6, 8, 9, and 10, whereas the number of spots was not significant with peptides 3, 5, 11, 12, 13, 14 and 15. As the sequences of peptides 1 to 10 correspond to the N-terminal, cysteine-rich, core and basic residue-rich region of Tat that spreads from residue 1 to 57 (see Figure 1), we concluded that the T-cell epitopes are located in the region 1-57 of Tat1-86.

The determinant controlling the adjuvant property is located in the region 1-57 of the protein.

As the adjuvant property was previously characterized using a Tat protein of 101 residues (5), and the present study was performed using a Tat protein of 86 residues, which could contain different B-cell epitopes, we decided to map the Tat1-86 B-cell epitopes. For

this purpose, we examined the ability of anti-Tat1-86 mouse sera to bind a series of fourteen 15-mer overlapping peptides encompassing the whole polypeptide chain. The fourteen 15-mer Tat-peptides were respectively coated on microtiter ELISA plates, and series of anti-Tat1-86 serum dilutions were incubated overnight at 4°C. Antibody binding was then assessed using a polyclonal anti-mouse IgG conjugated to peroxidase and ABTS as substrate. As shown in Figure 4, antibodies found in sera from Tat1-86 immunized mice bound mainly peptides 1 and 2, corresponding to region 1-20, and to a lesser extent peptide 15, corresponding to region 71-85.

Next, we used this information on the B-cell epitope location to determine whether the adjuvant property depends on a restricted part of the protein. As the anti-Tat1-86 antibody response is mainly directed against two epitopic regions respectively located in the N- and C-termini of the protein, we selected two series of truncated Tat sequences containing either the N- or the C-terminus of Tat (Figure 5 A). The first series corresponds to four Tat sequences containing the N-terminal epitope, respectively called Tat1-72, Tat1-57, Tat1-48 and Tat1-37. The second series corresponds to three Tat sequences containing the C-terminal epitope, respectively called Tat22-86, Tat37-86 and Tat48-86. Each peptide was chemically synthesized, purified to homogeneity by HPLC and characterized by mass spectrometry. Next, we injected respectively the seven peptides and Tat1-86 into eight groups of six BALB/c mice, in the absence of adjuvant. We bled the mice nine days after the second immunization and examined the anti-Tat humoral immune response by ELISA. First, we examined sera from mice immunized with the series of peptides containing the N-terminal part of Tat for their ability to bind the 15-mer Tat-peptide 2 (Figure 5B). We found similar anti-peptide 2 antibody titers for the sera from Tat1-86, Tat1-72, and Tat1-57 immunized mice, indicating that the 58-86 region of the protein is not required to elicit the anti-N-terminal antibody response. In contrast, the 49-57 moiety, which corresponds to the Tat basic residue-rich region, is absolutely required for the adjuvant effect since a significantly ($p=0.0263$) 16-fold lower titer was found for the sera from Tat1-48 immunized mice. Then, we examined sera from mice immunized with the series of peptides containing the C-terminal part of Tat for their ability to bind the 15-mer Tat-peptide 15 (Figure 5C). We measured an anti-peptide 15 antibody titer for the sera from Tat1-86 immunized mice, very low titers for the anti-Tat22-86 sera and an absence of binding for the anti-Tat38-86 and anti-Tat49-86 sera. The difference between the anti-Tat1-86 and anti-Tat22-86 antibody titers was not statistically

significant, but suggested that the lack of the 1-21 moiety might also affect the adjuvant effect. Therefore, we concluded that the determinant controlling the adjuvant property is contained in the Tat1-57 fragment, which encompasses the N-terminal, the cysteine-rich, the core and the basic regions of the protein.

The ability to raise an adjuvant-free antibody response can be conferred on other antigens and is not related to bystander effects.

To assess whether the adjuvant property of Tat can be transferred to unrelated antigens, we first selected a model antigen consisting of a fragment containing both a T-cell epitope and potential B-cell epitopes. We chose a peptide, called DT92-106, corresponding to the 92-106 sequence of diphtheria toxin, since we previously observed that it contains a T-cell epitope when the parent protein is injected in BALB/c mice of the H-2d haplotype (not shown). We chemically synthesized DT92-106 in a free form or associated with Tat1-57 (DT92-106-Tat1-57). Then, we injected, in the absence of adjuvant, three groups of BALB/c mice with DT92-106-Tat1-57, DT92-106 in a free form, and DT92-106 mixed with Tat1-57, respectively. Eighteen days after the second injection, we bled the mice and examined the anti-DT92-106 antibody response by ELISA, using plates coated with DT92-106. We observed an absence of anti-peptide antibody in sera from mice injected with DT92-106 only, but significant amounts ($p < 0.02$) of antibody in sera from mice injected with DT92-106-Tat1-57 (Figure 6), indicating that DT92-106 is able to raise an adjuvant-free antibody response when it is coupled covalently to Tat1-57. Furthermore and importantly, the poor and barely significant antibody response observed with sera from mice coinjected with DT92-106 and Tat1-57 demonstrates that the adjuvant property is not related to a bystander effect.

The ability to raise an adjuvant-free antibody response can be transferred to a hapten.

To assess whether the transfer of the adjuvant property is related to the presence of the T-cell epitope in peptide DT92-106, we examined the humoral immune response raised against a hapten molecule covalently coupled to Tat1-57. For this purpose, we coupled a biotin molecule to the N-terminal residue of Tat1-57 and named the product biot-Tat1-57. Then, we injected, in the absence of adjuvant, two groups of BALB/c mice with either biot-

Tat1-57 or biotin mixed with Tat1-57. Nine days after the second injection, we bled the mice and examined the anti-biotin antibody response by ELISA, using plates coated with biotin-BSA. We observed an absence of anti-biotin antibody in sera from mice coinjected with biotin and Tat1-57, but significant amounts of antibody in sera from mice injected with biot-Tat1-57 (Figure 7). Therefore, covalent coupling of Tat1-57 can make antigens devoid of T-cell epitopes able to raise a humoral immune response in the absence of adjuvant.

The Tat fragment endowed with the ability to raise an adjuvant-free antibody response makes an unrelated antigen able to raise an adjuvant-free T-helper cell response.

To examine whether Tat1-57 also influences the ability of an unrelated antigen to raise a T-cell response in the absence of adjuvant, we investigated the anti-DT92-106 IL-4 response of three groups of BALB/c mice immunized with DT92-106 covalently coupled to an unrelated T-cell epitope (21), DT92-106 coinjected with Tat1-57, and DT92-106-Tat1-57, respectively. In these experiments, spleens were collected two weeks after the third immunization, splenocytes were challenged with peptide DT92-106, and the presence of IL-4 SFCs was assessed using an ELISPOT assay. We found a low and barely significant number of spots with splenocytes from DT92-106 immunized mice (Figure 8). In contrast, we measured a significantly ($p < 0.03$) higher number of SFCs with splenocytes from mice injected with DT92-106-Tat1-57. The increase is not related to the covalent coupling of Tat1-57 since a similar behavior was observed with splenocytes from mice coinjected with DT92-106 and Tat1-57. Therefore, Tat1-57 can make an unrelated antigen able to raise a T-helper response in the absence of adjuvant. However, in contrast to the humoral immune response, the phenomenon proceeds via a bystander effect.

DISCUSSION

The first aim of this study was to understand the molecular and cellular events controlling the ability of Tat to raise a humoral immune response in the absence of adjuvant. B-cell activation and differentiation results from four different stimuli - i) BCR cross-linking via repetitive epitopes, ii) T-cell help, iii) TLRs stimulation, iv) cytokines and/or membrane receptors – each of which may contribute more or less to the phenomenon depending on the nature of the Ag (6). As in our previous study we observed that the ability of Tat to form disulfide-mediated oligomers controls the adjuvant property (5), we investigated this more thoroughly and observed that Tat oligomerization leads to the formation of at least one repetitive B-cell epitope indicating that this form of the protein might cross-link several BCRs. Then, since it is known that BCR cross-linking can make a B-lymphocyte able to secrete Ig in the absence of T-cell help (17), we investigated whether the adjuvant property obeys to such a mechanism. We observed that T-cell help is absolutely required for the adjuvant-free anti-Tat antibody response. Furthermore, we found that the Tat-specific T-cells secrete IL-4 but are unable to make IFN- γ and that the anti-Tat antibodies are predominantly of the IgG1 isotype. Therefore, we concluded that the anti-Tat humoral immune response depends on a mechanism of T-B collaboration in which a Th2 response predominates. These results suggest a scenario of adjuvant-free antibody response in which the disulfide-mediated oligomerization of Tat, which is controlled by the cysteine-rich and core-region, represents the initial event. The oligomerization generates at least one repetitive B cell epitope motif, located in the N-terminal region of the molecule. This repetitive motif cross-links several BCRs on a specific B-lymphocyte, thus activating the cell and making it able to present antigen more effectively to T-cells of the Th2 subset which, in turn, would contribute to the differentiation of IgG1-secreting B-lymphocytes. Whether some of the numerous reported biological activities of Tat which resemble those raised during the initiation of an immune response (9;10;11;12;13;15) might contribute to the phenomenon by providing additional stimuli remains to be investigated. Thus, a usual mechanism of cooperation between B-cells and Th2 cells would be made able to reach the threshold required for the triggering of an antibody response in absence of adjuvant, due to the Tat ability to oligomerize. Two additional observations support this scenario. Firstly, the determinant responsible for the adjuvant property is located in the region 1-57, which contains all Tat T-cell epitopes and the

cysteine-rich region involved in the cysteine-mediated oligomerization. Secondly, two model antigens can raise an antibody response in the absence of adjuvant when they are coupled to fragment Tat1-57 but not when they are coinjected with Tat1-57, which indicates that the phenomenon is not related to “bystander” activation effects.

In contrast to what is observed with fragment 1-57, we found an absence of antibody response with fragment 1-48, which suggests that the T-cell epitope overlapping region 49-57 might play a crucial role in the phenomenon. However, the region 49-57, which is rich in basic residues, is also able to bind heparan sulfate (22;23) and we previously observed that an antigen is internalized with a greater efficacy by APCs and thus becomes able to stimulate T-cells more efficiently when it is endowed with the capacity to bind heparan sulfate (24). Therefore, we can also speculate that the region 49-57 provides an increased uptake of Tat in B-cells and thus contributes to the enhancement of the anti-Tat Th2 response which, in turn, would contribute to the triggering of the adjuvant-free antibody response.

The second aim of the study was to assess whether the adjuvant property can be conferred on other antigens. Using the fragment Tat1-57, we showed that the adjuvant property of Tat can be transferred to two model antigens. Thus, the adjuvant-free humoral immune response raised against a hapten, such as biotin, when it is coupled to Tat1-57, supports the hypothesis that the determinant might be of value for antigens devoid of T cell epitopes, such as carbohydrates. The antibody response raised against peptide DT92-106, which contains both a T-cell epitope and a B-cell epitope, suggests that the determinant of adjuvanticity might be of value for antigens having these characteristics. Interestingly, while the antibody response requires covalent coupling between antigens and Tat1-57, coupling is not an absolute requirement for the T-cell response, suggesting that the adjuvant-free T-cell response depends on bystander effects. Altogether, these data indicate that the determinant of Tat controlling the adjuvant property might be of value for immunization. Antigens attractive for vaccination must now be examined in order to assess whether self-adjuvant property of Tat can bypass the use of adjuvants or potentiate their effects.

BIBLIOGRAPHY

1. Barrios, C., C. Georgopoulos, P. H. Lambert, et G. Del Giudice. 1994. Heat shock proteins as carrier molecules: in vivo helper effect mediated by *Escherichia coli* GroEL and DnaK proteins requires cross-linking with antigen. *Clin. Exp. Immunol* 98: 229-233.
2. Chu, C. T., T. D. Oury, J. J. Enghild, et S. V. Pizzo. 1994. Adjuvant-free in vivo targeting. Antigen delivery by alpha 2-macroglobulin enhances antibody formation. *J. Immunol* 152: 1538-1545.
3. Echeverria, P., G. Dran, G. Pereda, A. I. Rico, J. M. Requena, C. Alonso, E. Guarnera, et S. O. Angel. 2001. Analysis of the adjuvant effect of recombinant *Leishmania infantum* Hsp83 protein as a tool for vaccination. *Immunology Letters* 76: 107-110.
4. Elson, C. O. 1989. Cholera toxin and its subunits as potential oral adjuvants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 146: 29-33.
5. Kittiworakarn, J., A. Lecoq, G. Moine, R. Thai, E. Lajeunesse, P. Drevet, C. Vidaud, A. Ménez, et M. Léonetti. 2006. HIV-1 Tat raises an adjuvant-free humoral immune response controlled by its core region and its ability to form cysteine-mediated oligomers. *J. Biol. Chem* 281: 3105-3115.
6. Lanzavecchia, A., et F. Sallusto. 2007. Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Current Opinion in Immunology* 19: 268-274.
7. Batista-Duharte, A., E. B. Lindblad, et E. Oviedo-Orta. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicology Letters* In Press, Uncorrected Proof.
8. Ahmed, G. Y., H. H. Balkhy, S. Bafaqeer, B. Al-Jasir, et A. Althaqafi. 2011. Acceptance and Adverse Effects of H1N1 Vaccinations Among a Cohort of National Guard Health Care Workers during the 2009 Hajj Season. *BMC Res Notes* 4: 61.
9. Albin, A., R. Benelli, D. Giunciuglio, T. Cai, G. Mariani, S. Ferrini, et D. M. Noonan. 1998. Identification of a Novel Domain of HIV Tat Involved in Monocyte Chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry* 273: 15895 -15900.
10. Buonaguro, L., G. Barillari, H. K. Chang, C. A. Bohan, V. Kao, R. Morgan, R. C. Gallo, et B. Ensoli. 1992. Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J. Virol.* 66: 7159-7167.
11. Ensoli, B., R. Gendelman, P. Markham, V. Fiorelli, S. Colombini, M. Raffeld, A. Cafaro, H. K. Chang, J. N. Brady, et R. C. Gallo. 1994. Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature* 371: 674-680.
12. Albin, A., R. Benelli, M. Presta, M. Rusnati, M. Ziche, A. Rubartelli, G. Paglialunga, F. Bussolino, et D. Noonan. 1996. HIV-tat protein is a heparin-binding angiogenic growth factor. *Oncogene* 12: 289-297.
13. Albin, A., R. Soldi, D. Giunciuglio, E. Giraudo, R. Benelli, L. Primo, D. Noonan, M. Salio, G. Camussi, W. Rockl, et F. Bussolino. 1996. The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat. Med* 2: 1371-1375.

14. Fanales-Belasio, E., S. Moretti, F. Nappi, G. Barillari, F. Micheletti, A. Cafaro, et B. Ensoli. 2002. Native HIV-1 Tat Protein Targets Monocyte-Derived Dendritic Cells and Enhances Their Maturation, Function, and Antigen-Specific T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 168: 197-206.
15. Izmailova, E., F. M. N. Bertley, Q. Huang, N. Makori, C. J. Miller, R. A. Young, et A. Aldovini. 2003. HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat. Med* 9: 191-197.
16. Battaglia, P. A., F. Longo, C. Ciotta, M. F. Del Grosso, E. Ambrosini, et F. Gigliani. 1994. Genetic tests to reveal TAT homodimer formation and select TAT homodimer inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 201: 701-708.
17. Dintzis, R. Z., M. H. Middleton, et H. M. Dintzis. 1983. Studies on the immunogenicity and tolerogenicity of T-independent antigens. *J. Immunol* 131: 2196-2203.
18. Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, et B. Malissen. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J* 14: 4641-4653.
19. Heinzl, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman, et R. M. Locksley. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med* 169: 59-72.
20. Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, et A. M. Hill. 2000. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology* 164: 6166-6173.
21. Maillère, B., J. Cotton, G. Mourier, M. Léonetti, S. Leroy, et A. Ménez. 1993. Role of thiols in the presentation of a snake toxin to murine T cells. *J. Immunol* 150: 5270-5280.
22. Rusnati, M., D. Coltrini, P. Oreste, G. Zoppetti, A. Albini, D. Noonan, F. d'Adda di Fagagna, M. Giacca, et M. Presta. 1997. Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J. Biol. Chem* 272: 11313-11320.
23. Rusnati, M., G. Tulipano, C. Urbinati, E. Tanghetti, R. Giuliani, M. Giacca, M. Ciomei, A. Corallini, et M. Presta. 1998. The basic domain in HIV-1 Tat protein as a target for polysulfonated heparin-mimicking extracellular Tat antagonists. *J. Biol. Chem* 273: 16027-16037.
24. Léonetti, M., A. Gadzinski, et G. Moine. 2010. Cell surface heparan sulfate proteoglycans influence MHC class II-restricted antigen presentation. *J. Immunol* 185: 3847-3856.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Tat1-86 oligomerization leads to the formation of a repetitive B-cell epitope motif. **A:** Sequence of Tat1-86. **B:** The monomeric and oligomeric Tat proteins were incubated on microtitration plates coated with a monoclonal antibody specific to the N-terminal Tat part of the molecule. Plates were washed and incubated with a rabbit polyclonal antibody specific to the same epitope. Antibody binding was assessed using a goat anti-rabbit antibody coupled to peroxidase and ABTS as substrate.

FIGURE 2: The adjuvant property of Tat depends on the T-cell response. Wild-type C57BL/6 mice and C57BL/6 CD3 ϵ knock-out mice were immunized twice subcutaneously at two-week intervals with a PBS solution containing Tat1-86 (5.1 nmoles/mouse). Nine days later the mice were bled and the presence of anti-Tat1-86 antigens in the individual sera was assessed using an enzyme immunoassay. The results are expressed as mean values \pm SD. * $p < 0.05$.

FIGURE 3: Tat triggers a predominant Th2 response and its T-cell epitopes are located in the region 1-57. BALB/c mice were immunized subcutaneously with a PBS solution containing Tat1-86 (2.54 nmoles/mouse), at weeks 0, 2 and 10. Two weeks later, spleens were collected and splenocytes (0.9×10^6 cells/well) were challenged with full-length Tat1-86, a pool of fifteen 15-mer overlapping Tat1-86 peptides, an irrelevant control peptide, or medium alone, respectively. The presence of IL-4- (**A**) and IFN- γ - (**B**) secreting T-cells was assessed using an IL-4- and IFN- γ -specific ELISPOT assay. Splenocytes were also challenged with fifteen individual 15-mer overlapping Tat1-86 peptides in order to identify the Tat-specific T-cell epitopes able to trigger an IL-4 response (**C**). The results are expressed as the mean values \pm SD. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$. The presence of anti-Tat IgG1 and IgG2a was examined in the sera from BALB/c immunized mice using an enzyme immunoassay in which antibody binding was revealed either with a polyclonal goat anti-mouse IgG1 antibody conjugated to peroxidase or a polyclonal goat anti-mouse IgG2a conjugated to peroxidase (**D**).

FIGURE 4: Identification of the Tat1-86 B-cell epitopes. BALB/c mice were immunized subcutaneously at two-week intervals with a PBS solution containing Tat1-86 (2.54 nmoles/mouse). Nine days after the last immunization the mice were bled and individual sera were examined for their ability to bind a series of overlapping 15-mer peptides representing the sequence of Tat 1-86. The results are expressed as mean values \pm SD.

FIGURE 5: The determinant controlling the adjuvant effect is contained in fragment Tat1-57. N-terminal and C-terminal truncation constructs of Tat1-86 used for immunization are shown in **A**. For the identification of the determinant of adjuvanticity, eight groups of BALB/c mice were immunized subcutaneously at two-week intervals with 2.54 nmoles of Tat1-86, Tat1-72, Tat1-57, Tat1-48, Tat1-37, Tat22-86, Tat38-86 and Tat49-86 in PBS, respectively. Nine days after the second immunization, the mice were bled and the presence of anti-peptide 2 (**B**) or anti-peptide 15 (**C**) IgG was assessed in each individual serum using an enzyme immunoassay. The results are expressed as mean values \pm SD. *, $p < 0.05$.

FIGURE 6: The ability to raise an adjuvant-free antibody response can be transferred to a peptide antigen and is not related to bystander effects. Three groups of BALB/c mice were immunized subcutaneously at two-week intervals with a PBS solution containing either a 15-mer diphtheria toxin peptide (DT92-106), or DT92-106 covalently coupled to Tat1-57 (DT92-106-Tat1-57), or DT92-106 coinjected with Tat1-57 (DT92-106+Tat1-57). Nine days later, the mice were bled and each individual serum was assessed for the presence of anti-DT92-106 IgG using an enzyme immunoassay. The results are expressed as the mean values \pm SD. *, $p < 0.05$.

FIGURE 7: The ability to raise an adjuvant-free antibody response can be transferred to a hapten. Two groups of BALB/c mice were immunized subcutaneously at two-week intervals with 2.54 nmoles of either biotinylated-Tat1-57 or an equimolar mixture of biotin and Tat1-57, in PBS. Nine days later, the mice were bled and the presence of anti-biotin IgG was assessed in each individual serum using an enzyme immunoassay. The results are expressed as mean values \pm SD. **, $p < 0.01$.

FIGURE 8: The fragment Tat1-57 which contains the determinant of adjuvanticity makes an unrelated antigen able to raise a T-helper cell response. Three groups of BALB/c mice were immunized subcutaneously with DT92-106 covalently coupled to an unrelated T-cell epitope, DT92-106 coinjected with Tat1-57, and DT92-106-Tat1-57, respectively. Two weeks later, spleens were collected and splenocytes were challenged with peptide DT92-106. The presence of IL-4-secreting T-cells was assessed using an ELISPOT assay. The results are expressed as mean values \pm SD. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

A



B

	Detection of a repetitive N-terminal motif Optical density(mUDO) at 30min
Monomer	17 ± 13
Oligomer	368 ± 6

Figure 1

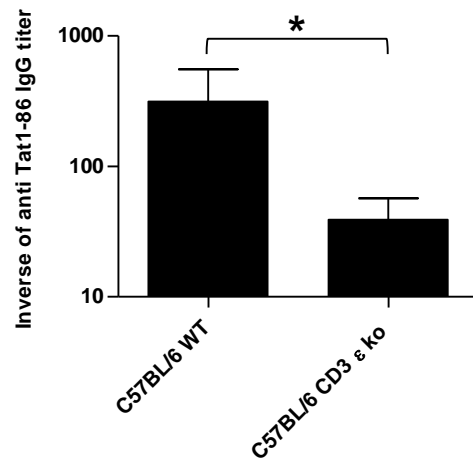


Figure 2

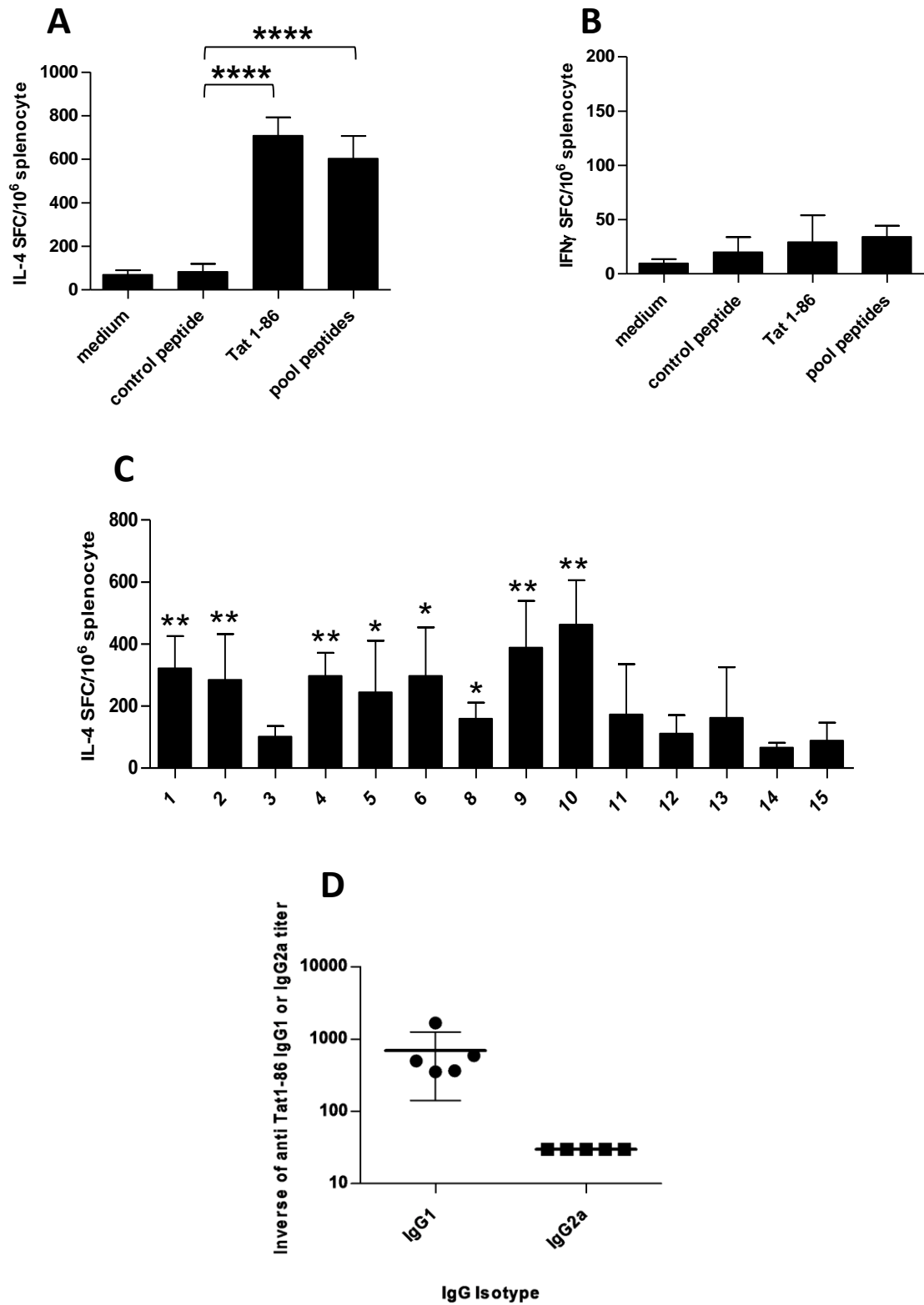


Figure 3

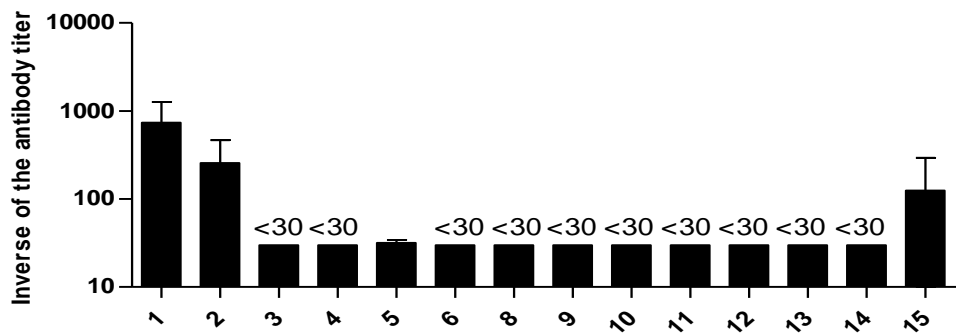


Figure 4

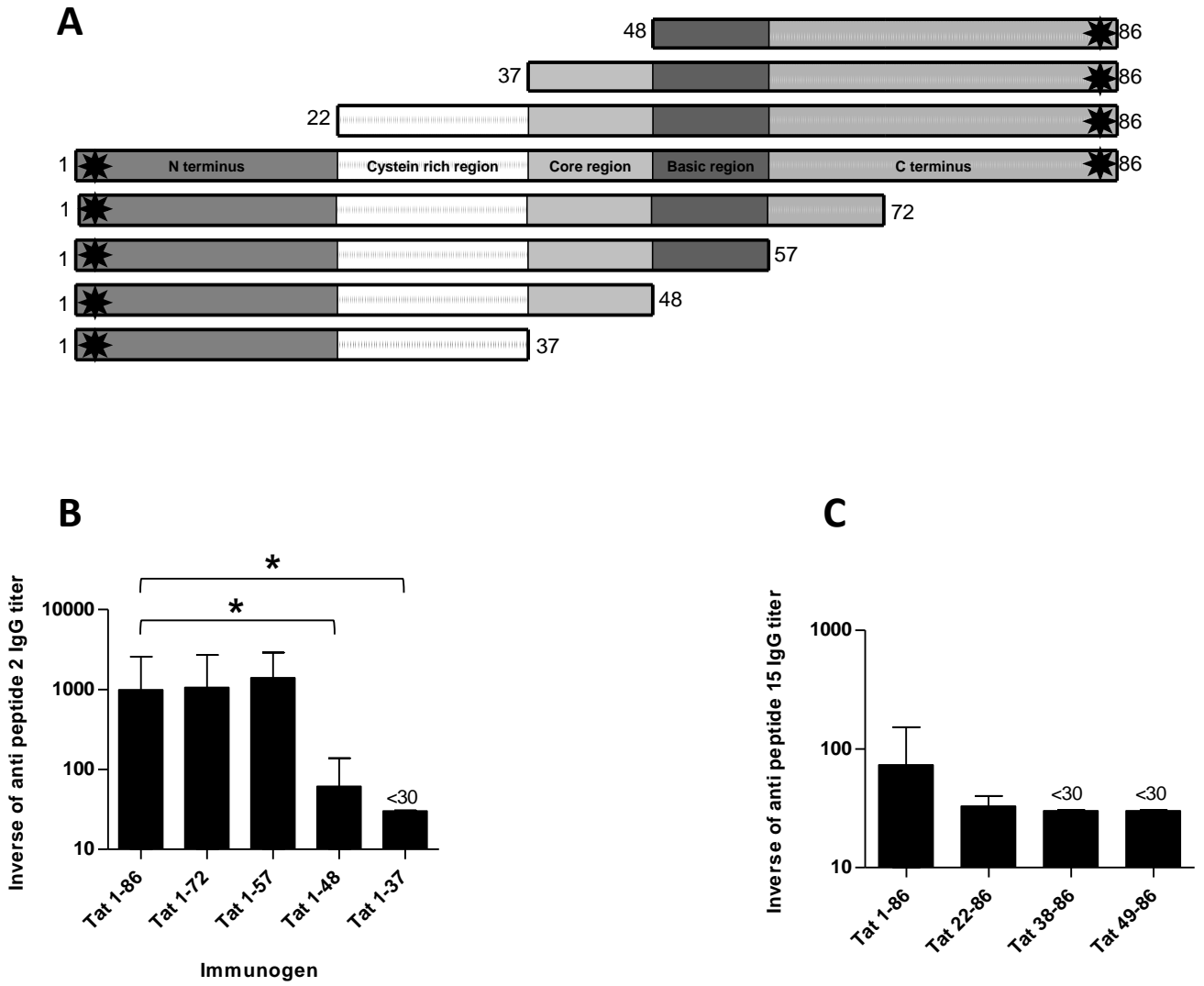


Figure 5

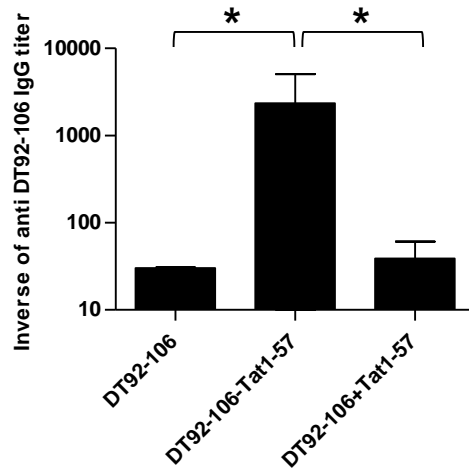


Figure 6

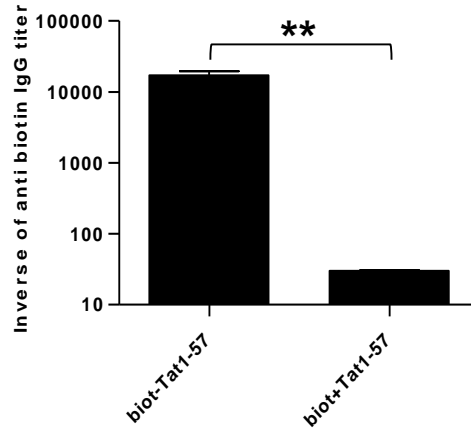


Figure 7

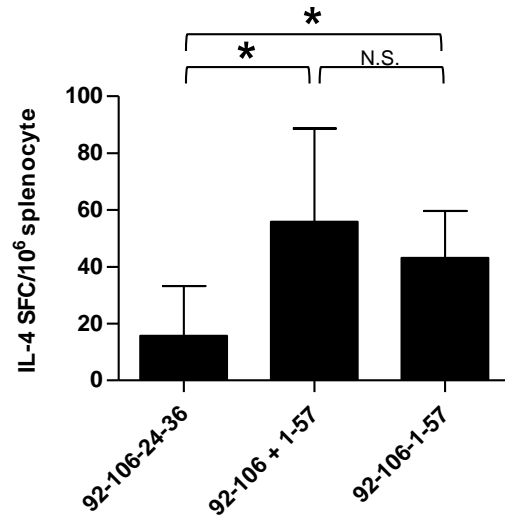


Figure 8

4. Discussion et perspectives

Les caractéristiques propres à une protéine antigénique, telles que la présence d'épitopes T et B, sont nécessaires pour la mise en place d'une réponse immunitaire humorale mais ne s'avèrent généralement pas suffisantes pour déclencher chacun des signaux nécessaires à l'activation et à la différenciation de cellules B spécifiques. C'est pourquoi le décryptage des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la propriété autoadjuvante de Tat nous paraissait particulièrement fondé pour comprendre, à partir d'une démarche « *in vivo* », ce qui différencie Tat des protéines qui requièrent la présence d'un adjuvant pour être immunogènes.

Pour progresser dans notre compréhension des mécanismes responsables de l'effet, nous nous sommes appuyés sur le schéma d'activation et de différenciation des cellules B couramment admis (Lanzavecchia et Sallusto, 2007). D'après ce modèle, quatre types de signaux sont nécessaires pour permettre l'activation et la différenciation des cellules B: Signal 1: Agrégation du BCR qui est dépendante de la présence d'épitopes multiples au sein de l'Ag et est facilitée par le complément. Signal 2: Activation de CD40 via CD40L exprimé par les cellules T effectrices spécifiques de l'Ag ou via C4BP (ligand de C3b et C4b) de façon indépendante des lymphocytes T. Signal 3: Stimulation des TLR dans le compartiment endosomal ou à la membrane plasmique. Signal 4: Activation de récepteurs membranaires par des cytokines et d'autres produits exprimés ou induits par les cellules T, les DC ou les cellules épithéliales.

D'après ce modèle, la contribution de chacun de ces signaux dans l'activation des cellules B est modulable. Ainsi, le niveau de T-dépendance des réponses B est inversement proportionnel à l'intensité de l'agrégation du BCR, et celle-ci est liée à la répétitivité de l'Ag. (Dintzis et al., 1983). De même, l'engagement des TLR est exigé lorsque la stimulation du BCR ou l'aide des cellules T sont limitées (Lanzavecchia et Sallusto, 2007). Dans ce contexte, nous avons souhaité évaluer la capacité de la protéine Tat à induire ces différents signaux afin de déterminer si certains d'entre eux sont facultatifs, et de dégager un schéma de compréhension du phénomène autoadjuvant de Tat.

Nous avons tout d'abord évalué si Tat pourrait potentiellement activer le signal 1. Comme l'agrégation du BCR dépend de la présence d'épitopes répétés, nous avons évalué si Tat présente de tels motifs. Nous avons ainsi pu observer que la forme monomérique de la protéine en est dépourvue alors que la forme oligomérique qui est responsable de l'effet adjuvant (Kittiworakarn et al., 2006) contient au moins un épitope répété localisé dans la

région N-terminale de la molécule. Les études précédentes avaient permis de déterminer que la capacité de Tat à former des oligomères contrôle la propriété adjuvant (Kittiworakarn et al. 2006). Ensemble, ces données suggèrent que la(les) forme(s) oligomérique(s) de Tat pourrait(ent) agréger les BCR et ainsi déclencher le signal 1, participant ainsi au déclenchement de la réponse immunitaire en absence d'adjuvant. Plusieurs protéines ou systèmes autoadjuvants décrits dans la littérature possèdent la capacité d'oligomériser. En particulier, il a été montré que l'Ag HA du virus influenza est plus immunogène sous forme multimérique que sous forme monomérique (Weldon et al., 2010), et des systèmes appelés dendrimères, utilisant des nanoparticules permettant de créer des plateformes peptidiques multimériques sont immunogènes en absence d'adjuvant chez la souris (Zaman et al., 2010). Il est donc possible que la propriété d'oligomérisation de Tat favorise la liaison et l'agrégation du BCR, et permette de diminuer le seuil d'activation de la cellule en absence de signaux d'activation complémentaires provenant d'adjuvants.

Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer l'implication du signal 2 dans l'effet autoadjuvant. Comme nous venons de le voir, la propriété d'oligomérisation de Tat est indispensable pour l'effet autoadjuvant. Cette propriété d'oligomérisation est une caractéristique des Ag T-indépendants de type 2 (TI-2). Ces Ag sont capables d'activer les lymphocytes B de manière spécifique, via l'agrégation du BCR et un second signal d'origine inflammatoire, sans aide des cellules T. Nous avons donc envisagé que Tat, grâce à sa capacité à oligomériser qui lui confère la capacité potentielle d'induire le signal 1 d'agrégation du BCR et à ses propriétés inflammatoires intrinsèques (Albini et al., 1998;Buonaguro et al., 1992;Fanales-Belasio et al., 2002;Izmailova et al., 2003) pourrait se comporter comme un Ag T indépendant de type 2. Pour évaluer cet aspect, nous avons testé l'immunogénicité de la protéine Tat dans des souris transgéniques CD3 ϵ ko dépourvues de cellules T. Nos résultats montrent que Tat est incapable de déclencher des réponses anticorps chez ces souris, ce qui permet d'établir le caractère T-dépendant du phénomène autoadjuvant et la nécessité du signal 2 pour l'effet.

Dans le cadre d'une réponse en anticorps T-dépendante, l'immunogénicité d'un Ag est corrélée à sa capacité à mobiliser les réponses T CD4⁺ auxiliaires qui soutiennent l'activation et la différenciation des lymphocytes B spécifiques. La présence d'épitopes T est un prérequis indispensable pour permettre l'activation de ces réponses par une protéine. Ce paramètre est d'ailleurs considéré comme un facteur prédictif de l'immunogénicité des protéines thérapeutiques (De Groot et al., 2008). Nous avons analysé le contenu en épitopes T de Tat

chez la souris BALB/c, et avons découvert que les épitopes T sont tous localisés dans la région 1-60 de la protéine. Nous avons de plus observé que les fragments de Tat dépourvus de la région 1-20 ou de la région 49-57, qui renferment toutes deux des épitopes T, sont incapables de déclencher une réponse en anticorps en absence d'adjuvant. Ces données suggèrent que la capacité autoadjuvante de Tat pourrait dépendre de son contenu en épitopes T. Toutefois, ces régions sont porteuses d'autres propriétés qui pourraient également être cruciales pour l'effet autoadjuvant, en particulier la capacité de lier les héparanes sulfate (HS) médiée par la région basique située dans la région 49-57. Un moyen de tester l'influence des épitopes T dans le phénomène serait d'évaluer l'immunogénicité de Tat dans une souche de souris congénique, présentant le même fond génétique mais un haplotype de CMH différent pour lequel la protéine Tat présenterait un nombre réduit ou nul d'épitopes T.

L'activation des réponses T auxiliaires qui contribuent aux réponses anticorps requiert la reconnaissance, l'internalisation et l'apprêtement de l'Ag par les CPAg dans un contexte inflammatoire (MacLennan, 1994). Toute propriété intrinsèque de l'Ag favorisant ces différentes étapes pourrait contribuer à accroître son immunogénicité. En particulier, de nombreuses études montrent que les Ag capables de cibler efficacement les cellules, et plus particulièrement les CPA, sont mieux présentées aux cellules T (Lanzavecchia, 1990) et sont souvent plus immunogènes (Wang et al., 2000). Tat présente la particularité de lier des intégrines, grâce au motif RGD présent dans sa région C-terminale. Nos résultats excluent cependant un rôle de ce motif dans l'effet autoadjuvant. En effet, le fragment 1-57 qui est dépourvu du motif RGD de liaison aux intégrines est capable d'induire une réponse en anticorps en absence d'adjuvant de niveau équivalent à celle induite contre Tat sauvage. Tat est aussi capable de lier les HS par l'intermédiaire de sa région basique. Or, les HS sont des polysaccharides linéaires ubiquitaires exprimés à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire (Kreuger et al., 2006). Il en résulte que Tat est capable de lier un grand nombre de types cellulaires et en particulier l'ensemble des cellules impliquées dans l'initiation d'une réponse immunitaire, qu'il s'agisse des CPA, des lymphocytes T ou des lymphocytes B, ainsi que d'autres cellules capables de moduler secondairement la réponse immunitaire, comme les cellules endothéliales. Nos résultats qui montrent que la région basique joue un rôle crucial dans l'effet autoadjuvant, suggèrent que le ciblage des cellules médié par la liaison des HS pourrait participer à l'effet. Il est difficile de vérifier cette hypothèse *in vivo*, car il n'existe pas de lignée de souris transgéniques déficientes pour les héparanes sulfate. Il est de plus possible que l'interaction avec les HS ne contribue pas à augmenter directement la liaison aux

cellules. En effet, Tat peut aussi lier des HS solubles ou de l'héparine ce qui conduirait à la formation de complexes multimériques très stables et/ou facilement internalisés par les CPA. Cette dernière hypothèse est supportée par des travaux réalisés précédemment au laboratoire (Kittiworakarn) et celle d'une autre équipe (Chudasama et al., 2010) qui montrent qu'*in vivo*, la co-injection d'HS ou d'héparine permet d'accroître l'immunogénicité.

Nous n'avons pas évalué *in vivo* la capacité de Tat à induire le signal 3. Cependant, au cours de discussions avec la société Transgene, nous avons appris que Tat n'est pas capable d'activer les cellules via les TLR (Rooke, Transgene, communication personnelle). Ces observations indiquent donc que l'effet autoadjuvant n'est pas lié à un effet de Tat via le signal 3, comme cela a été observé pour certaines protéines bactériennes immunogènes en absence d'adjuvant et capables de cibler des TLR grâce à la présence de motifs lipidiques (Zeng et al.). De plus, la protéine Tat utilisée dans cette étude a été préparée par synthèse peptidique et est donc dépourvue d'endotoxine contaminante qui pourrait activer les lymphocytes B de manière polyclonale. Cette hypothèse devrait néanmoins être confirmée en immunisant par exemple des souris transgéniques déficientes pour l'expression ou la signalisation des TLR, comme les souris MyD88^{-/-}.

Nous n'avons pas évalué la capacité de Tat à induire le signal 4 dans cette étude, et il est possible que l'effet adjuvant soit aussi lié à la capacité de cette protéine à induire différents événements reliés à ce signal. Il a par exemple été montré que Tat est capable d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α (Buonaguro et al., 1992). De plus, Tat augmente la maturation et la fonction des DC (Fanales-Belasio et al., 2002a) et induit l'expression par ces cellules de chimioattractants pour les cellules T activées et les macrophages (Izmailova et al., 2003). De plus, quelques résultats issus de nos expériences de transfert de l'effet autoadjuvant permettent d'apporter des premiers éléments sur la capacité de Tat à influencer le signal 4. Nous avons réalisé des immunisations avec des Ag modèles hétérologues couplés de façon covalente au déterminant autoadjuvant Tat1-57 ou co-injectés avec celui-ci. Nous avons observé que la co-injection comme le couplage covalent permettent d'augmenter significativement et de manière spécifique la réponse T contre un peptide contenant un épitope T. Ces données indiquent que des activités « bystander » de Tat sont suffisantes pour permettre l'activation de la réponse T en absence d'adjuvant. Parmi ces activités « bystander », on peut envisager que les activités pro-inflammatoires de la molécule jouent un rôle important. Une voie pour étudier l'effet de Tat sur le signal 4 serait donc

d'évaluer les propriétés pro-inflammatoires de Tat dans l'effet autoadjuvant en immunisant des souris transgéniques, déficientes pour différentes cytokines.

Sur la base de nos observations nous postulons que le schéma de réponse en anticorps en absence d'adjuvant est constitué de plusieurs étapes qui sont présentées dans la Figure 23. La première étape consiste en l'oligomérisation de Tat qui permet la formation de motifs épitopiques répétés. Ces motifs pourraient permettre l'agrégation des BCR et la mise en place du signal 1. Le signal n'est pas suffisamment fort pour induire la différenciation des B. Une étape d'aide est procurée par des lymphocytes T de type TH-2 qui sécrètent en particulier de l'IL-4 et orientent la réponse en anticorps vers l'isotype IgG1. Les autres étapes qui peuvent rendre compte de l'activation sont plus spéculatives. L'activation des cellules T pourrait être favorisée par la capture améliorée de Tat par les CPA. Ce phénomène pourrait être lié à la capacité de Tat à lier des HS et/ou à son caractère oligomérique. Tat pourrait de plus déclencher la sécrétion de cytokines inflammatoires capables de jouer un rôle dans le processus d'activation des lymphocytes T et B.

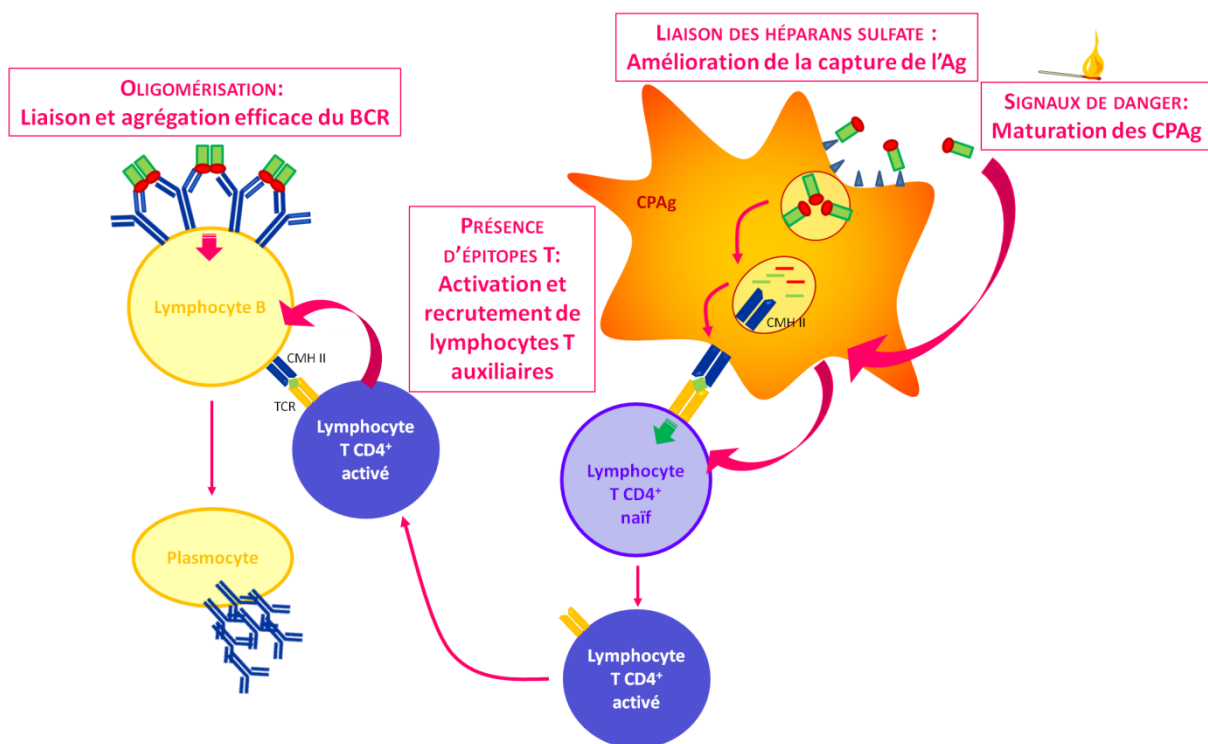


Figure 23 Mécanisme hypothétique de l'effet autoadjuvant de Tat

La protéine Tat (■), pourrait permettre l'induction de réponses immunitaires contre un Ag hétérologue en absence d'adjuvant (●) grâce à sa capacité à oligomériser, susceptible de promouvoir l'agrégation du BCR, sa capacité à activer des cellules T auxiliaires spécifiques grâce à ses nombreux épitopes T, ses propriétés inflammatoires, mais également sa capacité à lier les héparanes sulfates à la surface des cellules, qui pourrait favoriser la présentation de l'Ag aux cellules T.

Parallèlement à ces expériences sur la réponse T, nous avons étudié si la capacité de Tat à déclencher des réponses humorales en absence d'adjuvant peut être transférée à d'autres protéines. Nous avons observé que l'effet peut être transféré à un peptide contenant un épitope T ou à un haptène, par couplage covalent, mais pas par co-injection de Tat1-57. Or, comme nous venons de le voir, la simple co-injection de cette molécule est suffisante pour augmenter les réponses T. Le fait que l'augmentation des réponses T ne se répercute pas sur les réponses anticorps dans le cadre de la co-injection semble indiquer que l'effet autoadjuvant n'est pas uniquement le reflet d'une plus forte activation de la réponse T, médiée par les effets « bystander » de Tat. Cependant, nous avons établi que la contribution des réponses T est indispensable dans le phénomène. L'activation des réponses T est donc une composante nécessaire à l'établissement du phénomène, mais pas suffisante.

Ces résultats indiquent que les modalités d'activation de la réponse T et de la réponse B sont différentes : les activités « bystander » de Tat, si elles jouent un rôle dans l'effet autoadjuvant, ne sont pas suffisantes pour induire l'effet, tandis que les activités qui sont apportées à l'Ag par le couplage covalent mais pas par la co-injection, telles que le ciblage des cellules, ou l'oligomérisation, s'avèrent indispensables pour l'induction de la réponse B, alors qu'elles semblent secondaires dans le cadre de la réponse T. L'oligomérisation de l'Ag médiée par la région riche en cystéines de Tat pourrait favoriser l'activation des cellules B de deux manières : (1) en augmentant la capacité de l'Ag à agréger le BCR (2) en augmentant l'avidité de l'Ag pour le BCR, favorisant son apprêtement et sa présentation aux cellules Th. D'autre part, le couplage covalent de Tat1-57 à l'Ag lui permet de mobiliser efficacement les cellules T, grâce aux nombreux épitopes T qu'il renferme.

Pour essayer de démêler les modalités de ce phénomène, nous pourrions réaliser de nouvelles constructions possédant chacune des propriétés de la région Tat 1-57, ou différentes combinaisons de ces propriétés et tester *in vivo* leur capacité à conférer la propriété autoadjuvante à des Ag hétérologues. Nous pourrions par exemple coupler un Ag à une construction contenant le même nombre d'épitopes T que Tat 1-57, ou à un peptide possédant un cluster de cystéines et doté de la capacité d'oligomériser, ou encore à un peptide basique possédant une activité de liaison aux HS, ou des peptides possédant différentes combinaisons de ces propriétés. En décomposant ainsi les propriétés de la protéine Tat, nous pourrions caractériser de manière plus précise son mode d'action. Ces informations pourraient également permettre de créer de nouveaux immunogènes, moins toxiques que la protéine Tat, utilisables en vaccination humaine. En effet, Tat possède de nombreuses activités biologiques

qui peuvent être sources d'effets indésirables. On lui connaît notamment des activités de dérégulation variées dans de nombreux types cellulaires et des activités neurotoxiques, apoptotiques ou encore angiogéniques *in vivo* (Ensoli et al., 1994)(Albini et al., 1996a)(Albini et al., 1996b), dont la plupart sont portées par le fragment 1-57 que nous avons sélectionné. Aussi la sélection des seules régions responsables de l'effet pourrait représenter une alternative à l'utilisation de la protéine Tat entière. Une solution alternative pourrait consister à détoxifier le déterminant, par substitution d'acides aminés, comme certains travaux visant à utiliser Tat comme cible vaccinale contre le VIH le suggèrent (Mayol et al., 2007).

L'ensemble de ces travaux a donc permis d'apporter des éléments de compréhension sur le mode d'action d'une protéine de nature autoadjuvante, et de définir une approche innovante qui pourrait permettre de potentialiser l'action des adjuvants, ou même de s'en passer. De nombreux travaux restent à mener, afin de caractériser plus avant le phénomène. Quant aux applications vaccinales de la protéine Tat, elles restent encore à évaluer. En particulier, il faudra confronter son pouvoir adjuvant à celui des adjuvants traditionnels, et estimer sa toxicité éventuelle.

Enfin, puisque nous avons pu mettre en évidence un effet de Tat dans le cadre d'une réponse T CD4, des travaux pourraient évaluer la capacité de la molécule à induire des réponses CD8, qui sont des effecteurs importants pour lutter contre de nombreuses maladies persistantes pour lesquelles il n'existe pas encore de vaccin. Des données de la littérature permettent d'envisager la faisabilité de cette approche. En particulier, des résultats de l'équipe de B. Ensoli montrent que Tat favorise la génération de peptides via une modulation de l'activité du protéasome, et augmente la présentation classe I d'un Ag hétérologue *in vitro* (Fanales-Belasio et al., 2002b). Dans une autre étude, les auteurs montrent que la co-injection de Tat en présence d'adjuvant permet d'élargir le spectre des épitopes de protéines du VIH-1 reconnus *in vivo* par les cellules Th1 (Gavioli et al., 2008). Enfin, une étude montre que la co-administration de la protéine Tat, sous forme d'un adénovirus recombinant, augmente les réponses cellulaires de type Th1 contre un Ag hétérologue chez la souris (Zhao et al., 2005). Nos résultats préliminaires, qui ne sont pas présentés ici, montrent des effets mitigés. Cependant, nous avons montré que la protéine Tat polarise les réponses T auxiliaires vers le phénotype Th2, une voie qui favorise les réponses humorales, mais pas les réponses cytotoxiques. En effet, nous avons montré que les cellules T induites par Tat sécrètent de l'IL-4, mais sont incapables de sécréter de l'IFN- γ et de d'autre part que les anticorps dirigés contre Tat sont principalement de type IgG1. Or les réponses de type Th2 ne sont pas

favorables à l'induction de réponses T CD8⁺, il faut donc envisager d'associer à nos préparations vaccinales des éléments supplémentaires permettant de réorienter la polarisation des réponses T vers la voie Th1, plus favorable aux réponses T CD8⁺, comme des CpG.

Chapitre 2 Utilisation de la protéine Tat comme outil pour étudier l'influence des héparanes sulfate sur la présentation antigénique

1. Objectifs de l'étude et rappels sur les héparanes sulfates (HS).

Comme indiqué au chapitre 7 de la partie introductive de ce manuscrit, les CPP sont des peptides de nature cationique capables d'être internalisés par la plupart des cellules selon un processus appelé transduction. Ils s'avèrent particulièrement adaptés pour transférer des molécules variées dans le cytoplasme ou le noyau cellulaire. Cette propriété a conduit à envisager leur utilisation comme vecteur d'Ag et ils se sont notamment avérés capables d'améliorer significativement la présentation croisée de peptides ou de protéines (Kim et al. 1997; Shibagaki et Udey, 2002; Batchu et al., 2005)

Les études sur les CPP se sont principalement focalisées sur le mécanisme de transduction et se sont assez peu intéressées aux caractéristiques de liaison à des cibles cellulaires. Il a cependant été montré que les héparanes sulfate (HS) exprimés à la surface des cellules représentent les cibles principalement impliquées dans le phénomène d'internalisation des CPP, et ces éléments soulèvent la question du rôle des HS dans la présentation antigénique.

L'objectif de cette étude a donc été d'examiner si une région basique de protéine capable de lier les HS peut influencer la présentation antigénique restreinte au CMH II dans un contexte récepteur médié et non récepteur médié. Nous avons ensuite analysé l'influence des HS dans la présentation croisée récepteur médié. Pour réaliser cette étude, nous avons choisi d'utiliser le déterminant CPP de Tat, car il a été observé que ce dernier lie les HS et améliore la présentation croisée d'Ag dans différents modèles.

Les HS sont des polysaccharides constitués d'unités d'acide hexuronique (acide d-glucuronique (GlcA) et acide l-iduronique (IdoA)) et de d-glucosamine alternées et substitués avec des groupements sulfate à différentes positions (Figure 24) (Kreuger et al., 2006). Ils sont synthétisés par pratiquement tous les types de cellules animales, et sont exprimés à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire en combinaison avec des protéines, sous la forme d'héparanes sulfate-protéoglycans (HSPG) (Figure 25). Les HSPG possèdent de nombreux ligands protéiques tels que des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des

enzymes, des inhibiteurs d'enzymes, des molécules d'adhérence cellulaire, des chimiokines, des protéines de la matrice extracellulaire, ou encore des protéines microbiennes. L'interaction des HSPG avec leurs ligands peut déclencher l'internalisation de ces derniers ou activer des cascades de signalisation dans les cellules (Figure 26). Les HSPG sont impliqués dans de nombreux processus biologiques normaux et pathologiques, comme le développement embryonnaire, l'adhérence, la prolifération et la différenciation cellulaire, la coagulation ou encore l'endocytose médiée par des récepteurs (Kreuger et al., 2006 ; Bishop et al., 2007)

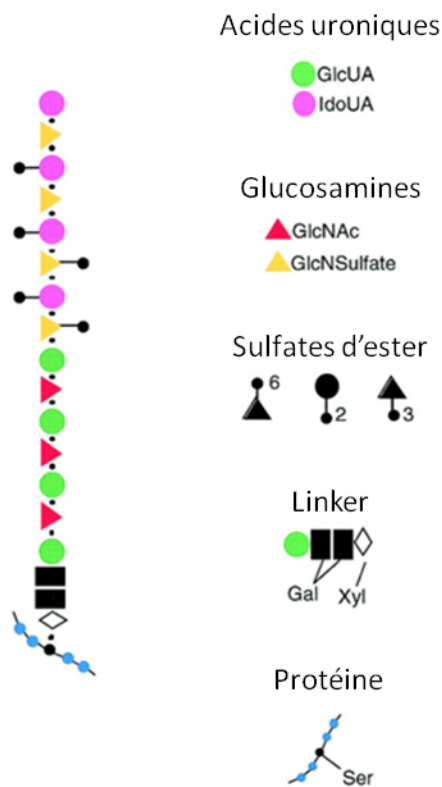


Figure 24 Structure des héparanes sulfate

D'après (Bernfield et al., 1999)

La distribution des résidus ainsi que celle des substituants sulfatés le long de la chaîne est variable et confère une extrême diversité aux HS.

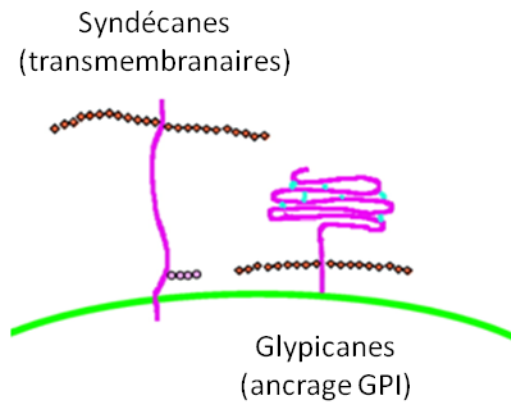


Figure 25 Les HSPG membranaires

D'après (Bernfield et al. 1999)

(GPI : glycosylphosphatidyl inositol)

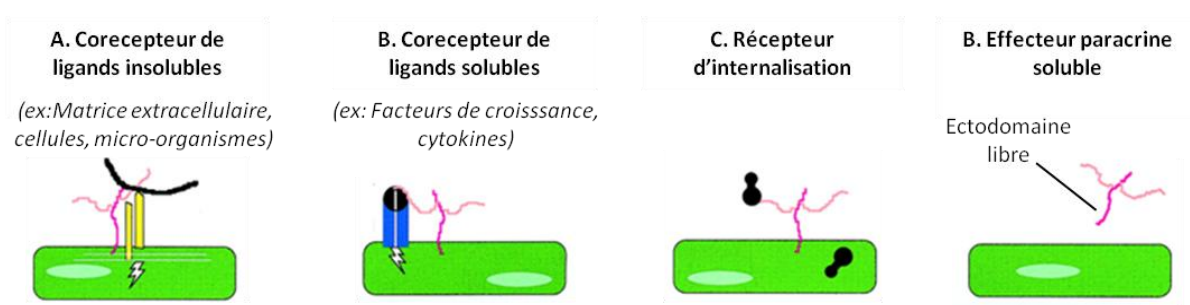


Figure 26 Fonctions des HSPG cellulaires

D'après (Bernfield et al., 1999)

Remarque : les glypicanes n'exercent pas la fonction (A).

2. Résultats

2.1. Modulation de la présentation de l'Ag restreinte au CMH II grâce au ciblage des HS

Pour évaluer l'effet d'une région basique de protéine capable de lier les HS sur la présentation antigénique restreinte au CMH II, nous avons dans un premier temps choisi de préparer une construction comprenant un Ag modèle couplé ou non à un peptide doté de la capacité de lier les HS. Nous avons utilisé la toxine α de *Naja nigricollis* comme Ag modèle. Pour le ciblage des HS, nous avons sélectionné la région 37-57 de la protéine Tat du VIH-1 comprenant la région basique impliquée dans la liaison aux HS (Brooks et al., 2010).

Comme on peut le voir dans la publication insérée dans ce mémoire, nos expériences indiquent en premier lieu que le couplage induit une liaison de l'Ag sur l'ensemble des cellules testées qui correspond bien au caractère ubiquitaire de l'expression des HS. Elles montrent de plus que l'on obtient une amélioration significative de la présentation de l'Ag lorsque celui-ci est doté de la capacité de lier les HS. Cet effet est inhibé spécifiquement par l'héparine et est relié à une augmentation de la liaison et de l'internalisation cellulaire de l'Ag.

Dans un second temps, nous avons évalué l'influence des HS sur la capacité T stimulante de ces mêmes Ag engagés dans des complexes immuns. Nos expériences nous ont permis de mettre également en évidence une amélioration significative de la présentation des complexes immuns lorsque ceux-ci sont dotés de la capacité de lier les HS.

Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Influence MHC Class II-Restricted Antigen Presentation

Michel Léonetti, Adeline Gadzinski, and Gervaise Moine

Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) are glycoproteins ubiquitously distributed on the cell surface and in the extracellular matrix. Their heparan sulfate moieties often represent alternative attachment points for extracellular proteins that target specific receptors. Thus, HSPGs modulate ligand–receptor encounters and participate in numerous biological processes. In this study, we examined whether HSPGs can also influence MHC class II-restricted Ag presentation. We selected a heparan sulfate ligand derived from the HIV-1 Tat protein and coupled it to a model protein Ag. We showed that coupling of the Tat fragment makes the Ag capable of binding cells, including APCs, and increases its ability to stimulate specific T cells up to 180-fold. The boosting effect depends on Ag processing; it vanished in the presence of an excess of heparin or free Tat fragment, indicating that HSPGs can behave as receptors involved in MHC class II processing and presentation. Furthermore, with Fc γ RII-bearing APCs, immune complexes containing the coupled Ag stimulated T cells up to 700-fold more efficiently than Ag-containing immune complexes. This effect vanished in the presence of heparin and is not found with Fc γ RII⁻ APCs, indicating that HSPGs can also behave as coreceptors during Fc γ RII-mediated Ag presentation. These results indicate that ubiquitous receptors, such as HSPGs, can influence MHC class II-restricted Ag presentation and suggest that proteins will be supported more efficiently by the immune system if they have the inherent capacity to bind heparan sulfate. *The Journal of Immunology*, 2010, 185: 3847–3856.

T cell stimulation depends on the efficiency of Ag capture by APCs. To take up Ag efficiently, APCs can use phagocytosis, macropinocytosis, or receptor-mediated endocytosis (1–5). This latter mechanism is particularly efficient because the amount of Ag required to stimulate Th cells can be up to 10⁵-fold lower than that required by nonspecific endocytosis (6). The proteins involved in receptor-mediated Ag presentation are generally expressed selectively on the surface of specialized APCs; it is anticipated that ubiquitous receptors do not play a major role in this phenomenon because their ligands may be distributed on a wide variety of nonimmune cells.

Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) are glycoproteins ubiquitously distributed on the cell surface or in the extracellular matrix (7); therefore, it is anticipated that they are inadequate receptors for Ag presentation. However, HSPGs can behave as receptors for numerous microorganisms (8, 9) that invade cells and, thus, disseminate more efficiently, in particular some with a natural tropism for immune cells, including HIV-1 (10, 11), CMV (12), *Leishmania donovani* (13), and *L. amazonensis* (14); this indicates that some HSPG ligands might be distributed locally and close to APCs. Moreover, the intracellular routing of an HSPG ligand, such as fibroblast growth factor, has been characterized. The fibroblast growth factor–HSPG complex is removed from the cell surface and degraded in the lysosomes (15–17), suggesting that this endocytic

pathway might be used by Ag–HSPG complexes in APCs. Therefore, we can ask whether HSPGs expressed on the surface of APCs act as receptors for Ags and, thus, increase their MHC class II-restricted presentation. In addition, because HSPGs often act as coreceptors that modulate the encounter of extracellular proteins with their receptors by forming heparan sulfate (HS)/protein (7, 18), we can also ask whether HSPGs play a role in receptor-mediated Ag presentation.

To investigate these questions, we examined whether MHC class II-restricted presentation of a model protein Ag varies when it is covalently coupled to a heparan sulfate ligand. We used toxin α from *Naja nigricollis* (19) as a model Ag, because endocytosis and processing are obligatory for T cell presentation of this small and highly stable protein (20, 21). To select a heparan sulfate ligand, we focused our work on HIV-1 Tat because it is a heparin and heparan sulfate-binding protein (22–24) that is internalized in cells through a mechanism that requires cell surface HSPGs (25). Our results show that MHC class II-restricted presentation is boosted when an Ag is able to bind cell-surface HSPGs, suggesting that Th cells are stimulated with greater efficiency by protein Ags inherently able to bind cell-surface HSPGs (17, 26). Furthermore, our results indicate that HSPGs can act as coreceptors during Fc γ RII-mediated presentation of immune complexes (ICs) containing heparan sulfate ligands.

Materials and Methods

Synthesis of Tat peptides, biotinylation, and coupling to toxin α

Synthesis of the Tat peptides was performed using the Fmoc/*tert*-butyl strategy on an Applied Biosystems 433A synthesizer. The chemical procedure used 0.1 mmol Fmoc-Asp(OtBu)-PAL-PEG-PS resin, a 10-fold excess of each amino acid, dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole, and diisopropylethylamine/*N*-methyl pyrrolidone. Cleavage and deprotection were then achieved using a mixture of trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/water (9.5/0.25/0.25, v/v/v). The crude material was precipitated twice with cold *tert*-butyl methyl ether and subsequently dissolved in 15% aqueous acid. The peptides were purified by HPLC on a Vydac C18 reverse-phase column (Hesperia, CA). The synthesized peptides and proteins were characterized by mass spectrometry and amino acid analysis. They were kept freeze-dried at –20°C.

Institut de Biologie et Technologies de Saclay, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, and Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Gif-sur-Yvette, France

Received for publication August 18, 2009. Accepted for publication July 20, 2010.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Michel Léonetti, Batiment 152, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France. E-mail address: michel.leonetti@cea.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this paper: CTLL, cytotoxic T cell line; DC, dendritic cell; HS, heparan sulfate; HSPG, heparan sulfate proteoglycan; IC, immune complex.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

Coupling of peptide Tat₃₇₋₅₇ to toxin α from *N. nigricollis*. Toxin α was previously monothiolated on its N-terminal residue using succinimidyl-pyridyl-dithiopyronate as a heterobifunctional reagent (27). The extra disulfide bond was reduced using an acetate buffer (pH 4.5) containing 0.1 M NaCl and 25 mM dithiothreitol. The mixture was stirred at room temperature for 20 min, and the solution was filtered through a PD10 column equilibrated in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.1) containing 0.1 M NaCl. The monothiolated toxin eluted from the void volume was incubated for 1 h at room temperature in the presence of a 3-fold excess of peptide 37-57 in PBS. The mixture was filtered through a PD10 column equilibrated in 0.1 M phosphate buffer (pH 7), and the purity was assessed by HPLC.

Binding to cells

Binding of Tat101 and Tat peptides with different C-terminal extensions. Serial dilutions of each Ag were incubated in the presence of different cell types (2×10^5 splenocytes per well or 10^5 A20 or T1B2 per well) for 30 min at 4°C in PBS/0.5% BSA. Cells were washed three times and incubated in the presence of a fluorescein-labeled murine mAb (1 μ g/well) specific to the N-terminal region of Tat. After 30 min at 4°C, cells were washed and analyzed by FACS.

Binding to cells of toxin α in its free form or covalently coupled to Tat₃₇₋₅₇ (alpha37-57). Toxin α and alpha37-57 were serially diluted and incubated for 30 min at 4°C in the presence of 2×10^5 splenocytes, 10^5 A20 cells, or 10^5 dendritic cells (DCs) in PBS/0.5% BSA. Cells were then washed and incubated in the presence of a rabbit antitoxin α Ab (1 μ g/well for each). After 30 min at 4°C, cells were washed, and a goat anti-rabbit Ab labeled with PE was added. After 30 min at 4°C, cells were washed and analyzed by FACS.

Binding of ICs to cells. Serial dilutions of toxin α or α -Tat₃₇₋₅₇ were incubated overnight at 4°C in the presence of a rabbit antitoxin α Ab. Cells were then added (10^5 per well) and incubated for 30 min at 4°C in PBS/0.5% BSA. After 30 min at 4°C, cells were washed, and a goat anti-rabbit Ab labeled with fluorescein was added. After 30 min at 4°C, cells were washed and analyzed by FACS.

Ag uptake in APCs

A20 cells (1.5×10^5 /well) were incubated in PBS for 30 min at 37°C with serial dilutions of free toxin α or alpha37-57. Plates were centrifuged and washed with PBS, and a trypsin/EDTA solution was added to the wells (100 μ l/well) and incubated for 10 min at 37°C. Then, plates were washed with a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and incubated with 4% PFA. After 30 min at 4°C, plates were washed and incubated for 20 min at 4°C with PBS containing 0.5% BSA or with a fixation/permeabilization solution (Cytotfix/Cytoperm, BD Biosciences, San Jose, CA). Plates were washed, and a rabbit antitoxin polyclonal Ab was added to the wells (1 μ g/well).

After 15 min at 4°C, plates were washed and a goat anti-rabbit IgG labeled with fluorescein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added. After 15 min at 4°C, plates were washed and analyzed by FACS to determine the amount of toxin α bound to permeabilized and nonpermeabilized cells. Ag uptake was calculated by subtracting binding to nonpermeabilized cells (\times geo mean) from binding to permeabilized cell (\times geo mean).

Isolation of B lymphocytes and DCs from splenocytes

B lymphocytes and DCs were isolated from mouse splenocytes using MACS microbeads, following the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Briefly, spleens were incubated in the presence of collagenase D (2 mg/ml) for 30 min at 37°C in the presence of an excess of nonspecific mouse IgGs. Cells were then incubated at 4°C. Fifteen minutes later, anti-CD19 or anti-CD11c microbeads were added and incubated for 15 min at 6-8°C. The splenocytes were rinsed, centrifuged, and passed through magnetic columns. Enrichment was assessed by FACS analysis using four anti-CD Abs (anti-CD4-FITC, anti-CD19-PE, anti-CD11c-FITC, and anti-I-A/I-E-PE; BD Biosciences). Purity was >95%.

T cell-stimulating assays

Experiments were performed using DCCM1 (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) as a synthetic culture medium. Serial dilutions of the different Ags were incubated in microculture wells (Nunc, Roskilde, Denmark) for 3 h at 37°C in the presence of A20 (5×10^4 /well), splenocytes (5×10^5 /well), B lymphocytes (2.5×10^5 /well), or DCs (3×10^4 /well). The two T cell hybridomas specific for toxin α (T1C9 and T1B2) were added (5×10^4 /well for each) to the wells, and cells were cultured for 24 h at 37°C. The presence of IL-2 in the culture supernatants was evaluated by determining the proliferation of an IL-2-dependent cytotoxic T cell line (CTLL) using [³H]methyl thymidine (5 Ci/mmol). The data are expressed as cpm.

For inhibition experiments, APCs were incubated for 3 h at 37°C with the different Ags in the presence or absence of an excess (3 μ M) of sulfatide polysaccharides (heparin, chondroitin A, chondroitin B). Then, T1B2 was added, and T cell stimulation was assessed, as described above.

Results

Selection of a Tat fragment able to bind cells and couple to toxin α

Because Tat is a heparin-binding protein (22, 23) internalized in cells through a mechanism that requires cell surface HSPGs (25), we

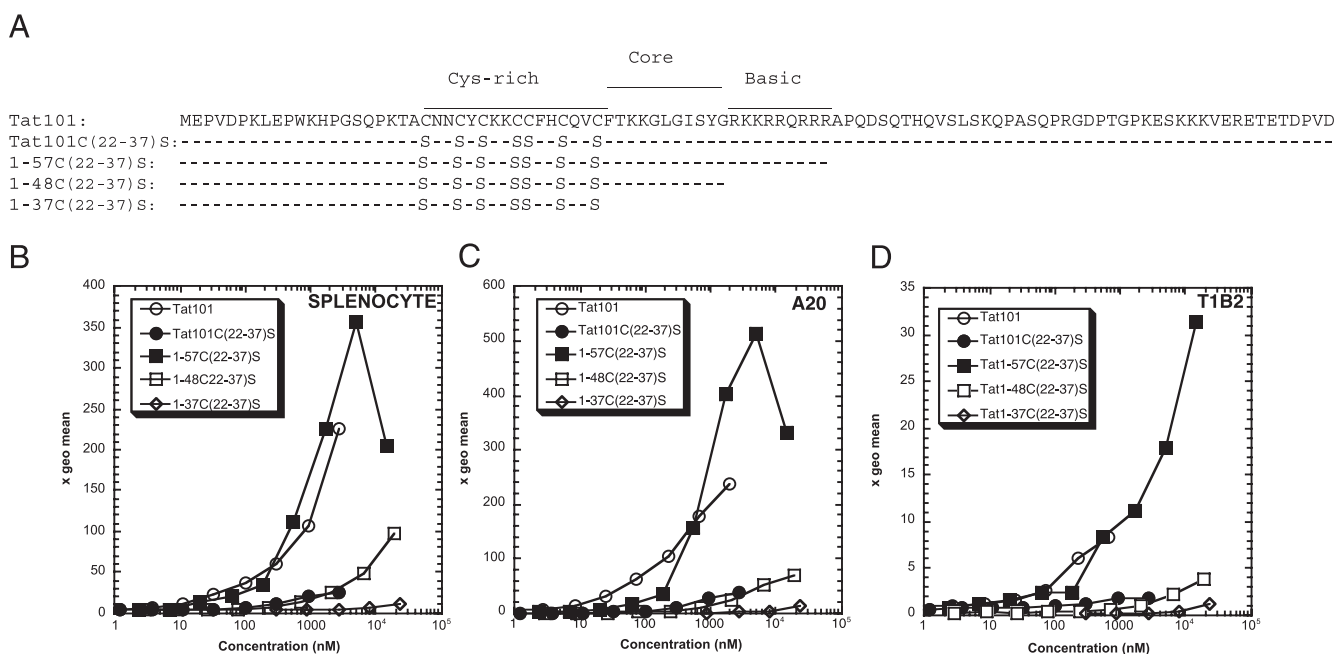


FIGURE 1. Binding to cells of Tat101 and four Tat derivatives. **A**, Sequence of Tat101, Tat101C(22-37)S, and three overlapping Tat peptides. The cysteine-rich (22-37), core (38-48), and basic (49-57) regions are underlined. **B-D**, Binding to cells of Tat101 and four Tat derivatives. The five Ags were serially diluted and incubated in the presence of splenocytes (**B**), A20 (**C**), or T1B2 (**D**). After 30 min at 4°C, a monoclonal anti-Tat Ab covalently coupled to fluorescein was added, and binding to cells was assessed by FACS analysis. Similar results were observed in two separate experiments.

decided to prepare a series of Tat derivatives to select a monomeric Tat fragment able to bind cells. We chemically synthesized a wild-type Tat molecule of 101 residues (Tat101) and four Tat derivatives (Fig. 1A). In these derivatives, the seven Tat cysteine residues located in the cysteine-rich region of the molecule (aa 22–37) were replaced by seven serines, because Tat has a natural propensity to make a large variety of disulfide-mediated oligomers (28). The first derivative was a full-length molecule called Tat101C(22–37)S (28). The three other polypeptides were C-terminally truncated Tat fragments [1–57C(22–37)S, 1–48C(22–37)S, and 1–37C(22–37)S]. After assessment of the purity of the five polypeptides, we compared their ability to bind different types of cells. In these experiments, cell binding was revealed using a mAb specific to the N-terminal region of Tat and FACS analysis. As shown in Fig. 1B, Tat101 bound to splenocytes, whereas Tat101C(22–37)S interacted poorly, indicating that the cysteine-rich region plays a role in the interaction of Tat101 with the cells. In contrast to Tat101C(22–37)S, peptide 1–57C(22–37)S bound to splenocytes like wild-type Tat101, indicating that the loss of binding due to the lack of the cysteine residues was counterbalanced by the absence of region 58–101. To achieve binding similar to 1–57C(22–37)S, ~50 times more 1–48C(22–37)S was required, indicating

that the lack of residues 49–57, corresponding to the basic region of Tat, strongly impaired the binding capacity. Finally, no binding was observed with peptide 1–37C(22–37)S, showing that the interaction was abolished in the absence of residues 38–48, corresponding to the core region of Tat. Similar results were found using the A20 B cell lymphoma (Fig. 1C) or a T cell hybridoma called T1B2 (Fig. 1D), indicating that Tat and its fragments can bind to a variety of cells, in agreement with the ubiquitous distribution of HSPGs. These results, which show the involvement of the cysteine-rich (residues 22–37), core (residues 38–47), and basic-rich (residues 49–57) region in cell binding, as well as our previous observation that Tat has a spontaneous propensity to make a large variety of disulfide-mediated oligomers (28), prompted us to select only the basic-rich and core region to prepare a homogeneous monomeric fragment able to bind cells. In this fragment, we incorporated the cysteine residue 37 of Tat for coupling to toxin α from *N. nigricollis* (21). The new synthesized peptide, called 37–57, was coupled to toxin α via a disulfide bridge between cysteine 37 and a thiol moiety previously incorporated on leucine 1 of toxin α (29), because this residue is distant from the toxin T cell epitopes recognized in the H-2^d haplotype (19, 20). The derivative was called alpha37–57.

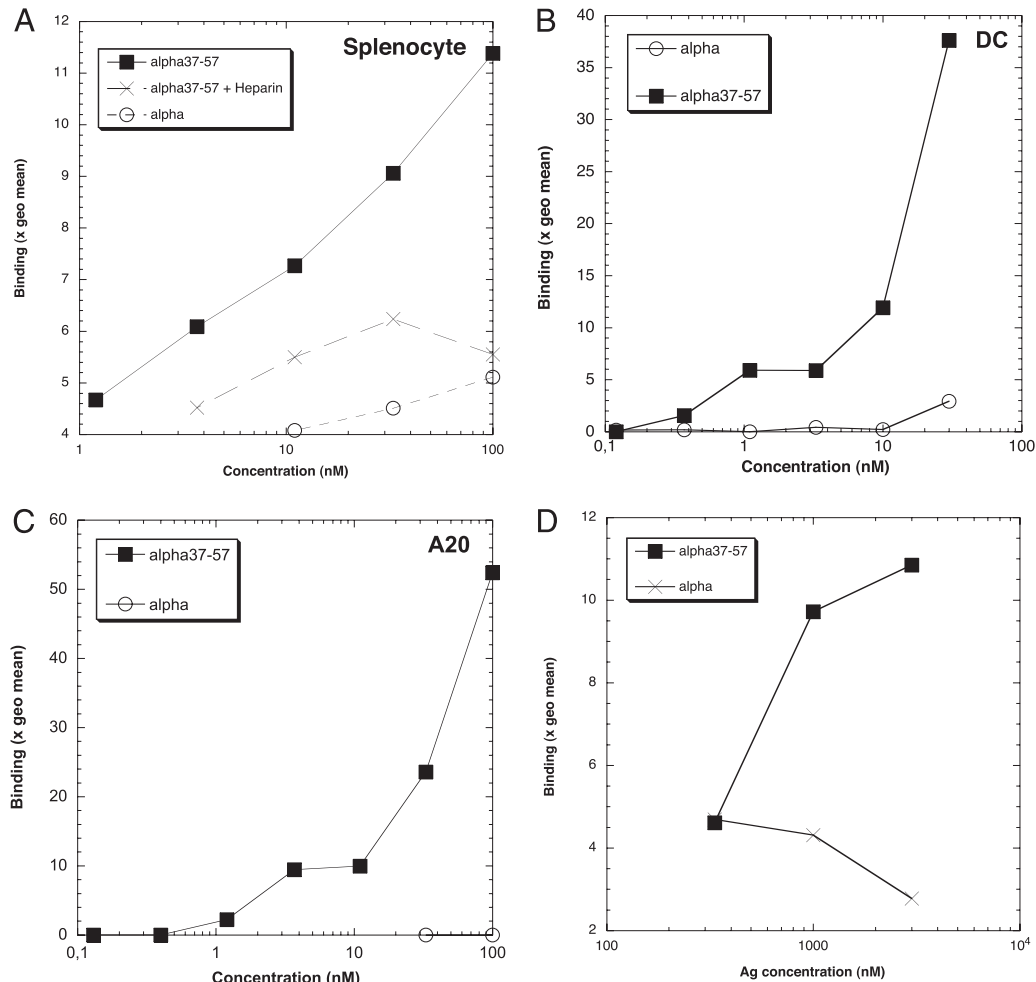


FIGURE 2. Coupling of the Tat peptide 37–57 to toxin α makes the protein Ag capable of binding APCs and increases its uptake. *A*, Cell-binding was assessed using splenocytes incubated with serial dilutions of toxin α (alpha) or alpha37–57 in the presence or absence of an excess of heparin (3 μ M). After 30 min at 4°C, a rabbit polyclonal antitoxin Ab was added. Then, a goat F(ab)₂ polyclonal anti-rabbit IgG labeled with fluorescein was added for 30 min, and binding to cells was assessed by FACS analysis. *B*, Binding to DCs using the same protocol. *C* and *D*, Binding to A20 cells. Similar results were observed in three separate experiments. *D*, Ag uptake was assessed using A20 cells incubated with toxin α or alpha37–57. After 30 min at 37°C, cells were treated with trypsin, washed, fixed, and incubated in the presence or absence of a permeabilizing solution. The amount of toxin α bound to the cells was assessed as described in *A*.

Coupling of peptide 37–57 to toxin α enables the protein Ag to bind cells and facilitates its uptake

To examine whether peptide 37–57 confers on toxin α the ability to bind different types of cells, we incubated serial dilutions of toxin α or alpha37–57 in the presence of splenocytes, A20 cells, or DCs. After 30 min of incubation at 4°C, we added a polyclonal antitoxin Ab and a goat anti-rabbit IgG coupled to fluorescein and proceeded to FACS analysis. As shown in Fig. 2A–C, alpha37–57 increased the fluorescence intensity of the different types of cells, whereas free toxin α was not efficient at doing so, strongly suggesting that peptide 37–57 confers on toxin α the ability to bind cells. To substantiate the role of the 37–57 moiety in cell binding, we examined whether the phenomenon is also observed in the presence of heparin, which is a soluble sulfated polysaccharide representative of the heparan sulfates that is able to bind Tat (22). We found that fluorescence intensity decreased when splenocytes were preincubated in the presence of alpha35–57 and an excess of heparin (Fig. 2A), demonstrating that toxin binding is mediated by the Tat moiety. To examine whether cell binding facilitates Ag internalization, we incubated A20 cells with free toxin α or alpha37–57 for 30 min at 37°C. Then, we treated cells with trypsin to remove the Ag bound to the cell surface. Finally, we permeabilized cells and measured the amount of intracellular toxin α using a protocol similar to cell-binding experiments. We found a greater amount of toxin α when

this protein Ag is coupled to 37–57, showing that cell binding increases Ag uptake (Fig. 2D).

Toxin α is presented to two toxin α -specific T cell hybridomas with greater efficiency when covalently coupled to peptide 37–57

Using splenocytes as APCs, we assessed presentation of alpha37–57 and free toxin α to two toxin-specific T cell hybridomas, called T1B2 and T1C9, which recognize a thiol-dependent (20) and -independent (30) epitope, respectively. As shown in Fig. 3A, the amount of free toxin α required to stimulate T1B2 was similar in the presence and absence of equimolar amounts of free peptide 37–57, indicating that this free Tat fragment does not influence Ag presentation. In contrast, 5-fold lower amounts of alpha37–57 sufficed to stimulate the T cell hybridoma as efficiently as free toxin α , indicating that the enhancement of the T cell-stimulating capacity is due to the covalent coupling of the Tat peptide.

Two observations indicated that the boosting effect was due to the targeting of the hybrid protein on HSPGs expressed on the APC surface. The first observation was made using three soluble sulfated polysaccharides incubated in excess (3 μ M) with serial dilutions of toxin α and alpha37–57. We observed that neither chondroitin A nor chondroitin B, which are representatives of chondroitin sulfates and are poor Tat binders (23), was able to inhibit the boosting effect (Fig. 3A). In contrast, heparin, which is representative of heparan

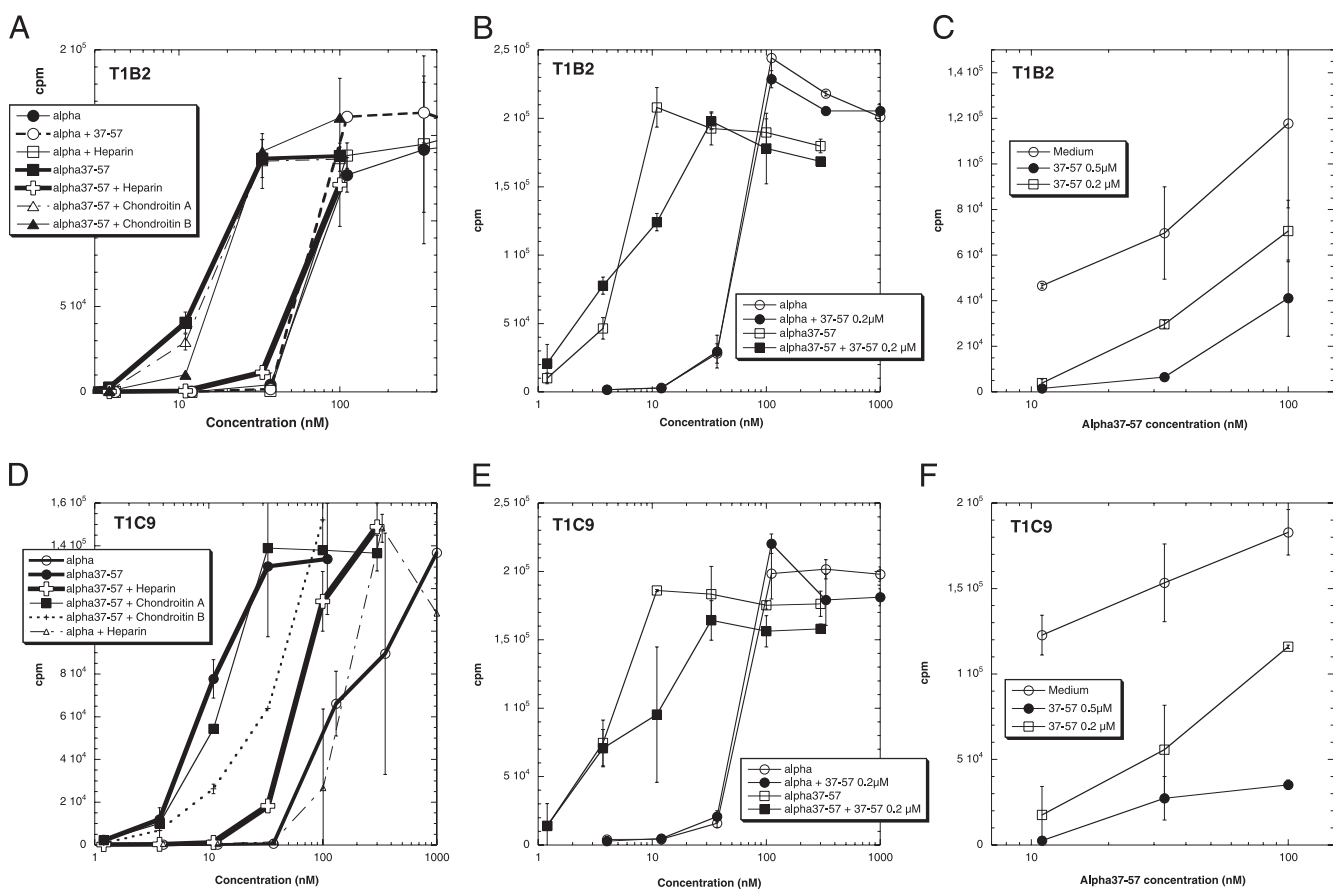


FIGURE 3. T cell-stimulating capacity of toxin α is increased when it is coupled to the Tat fragment 37–57, and the boosting effect is altered in the presence of an excess of heparin or 37–57. *A* and *D*, Splenocytes (5×10^5 /well) were incubated with serial dilutions of toxin α , α plus peptide 37–57, or alpha37–57 in the presence or absence of an excess (3 μ M) of sulfated polysaccharides (heparin, chondroitin A, and chondroitin B). After 3 h, T1B2 (*A*) or T1C9 (*D*) was added, and the mixtures were incubated for 24 h. IL-2 secretion was assessed using a CTLL–IL-2–dependent assay. *B* and *E*, A similar protocol was used to examine Ag presentation in the presence or absence of a fixed amount (0.2 μ M) of free peptide 37–57. *C* and *F*, A further examination of the inhibition provided by peptide 37–57. In these experiments, splenocytes (10^5 /well) were preincubated at 4°C for 30 min in the presence or absence of peptide 37–57. Alpha37–57 was then added to the wells for 1 h at 4°C. Plates were subsequently washed, and T1B2 (*C*) or T1C9 (*F*) was added for 24 h at 37°C. IL-2 secretion was assessed using a CTLL–IL-2–dependent assay. Similar results were observed in at least two separate experiments.

sulfates and is able to inhibit hybrid binding to splenocytes (Fig. 2A), was able to decrease the T cell-stimulating capacity of alpha37-57 to the level provided by free toxin α . The second observation was made using excess amounts of the free peptide 37-57. In a first series of experiments done with a protocol similar to that used for the sulfated polysaccharides, we observed that the free peptide 37-57 did not affect presentation of free toxin α , indicating that it is not toxic at the concentration used (0.2 μ M) and that it inhibits presentation of alpha37-57 poorly, if at all (Fig. 3B). However, this poor inhibition was related to the protocol used, because a significant alteration in the T cell-stimulating capacity was observed when the phase of cell binding was separated from that of processing and presentation (Fig. 3C). Thus, T cell hybridoma stimulation decreased when splenocytes were incubated at 4°C with peptide 37-57 and alpha37-57 and subsequently washed to remove the unbound protein before the addition of T1B2.

The above observations were also made when Ag presentation was investigated using T1C9 (Fig. 3D-F). Thus, the hybrid protein is 13-fold more potent than toxin α at stimulating T1C9, and this phenomenon is affected in the presence of an excess of heparin (Fig. 3D) or free peptide 37-57 (Fig. 3F). Therefore, we concluded that the boosting effect is not related to one particular epitope. Because toxin α is a highly stable protein (21) that absolutely requires processing to stimulate T cells (20), we subsequently examined whether the boosting effect depends on Ag

processing. We used fixed splenocytes as APCs. In their presence, the two T cell hybridomas were not stimulated by toxin α or alpha37-57 (Fig. 4A, 4B). This absence of stimulation was not due to an alteration in the presenting capacities of the fixed splenocytes, because they were still able to present peptide 32-49 and peptide Ac24-36 to T1B2 (Fig. 4A) and T1C9 (Fig. 4B), respectively. Therefore, these results indicated that the increased T cell stimulating capacity depends on toxin processing. Next, we assessed whether the Tat fragment 37-57 can also increase Ag presentation that does not require processing. In comparing the stimulating capacity of peptide Ac24-36 in its free form or previously coupled to Tat37-57, we observed that Ac24-36 and Ac24-36-Tat37-57 did not differ significantly in their ability to stimulate T1C9 in the presence of fixed (Fig. 4B) or live (Fig. 4C) splenocytes, indicating that the boosting effect is not related to an increase in the cell-surface presentation. Finally, we examined whether the boosting effect depends on MHC class II-restricted Ag presentation. To investigate this, we used splenocytes from two mice that have the same genetic background but different H-2 haplotypes. We observed a lack of stimulation with splenocytes from C57BL/10 mice of the H-2^b haplotype (Fig. 4D). In contrast, using splenocytes from B10.D2 of the H-2^d haplotype, we found that toxin α and alpha37-57 were efficiently presented and that the latter Ag was ~5-fold more efficient than free toxin α at stimulating T1B2 (Fig. 4E), which demonstrates that the boosting effect

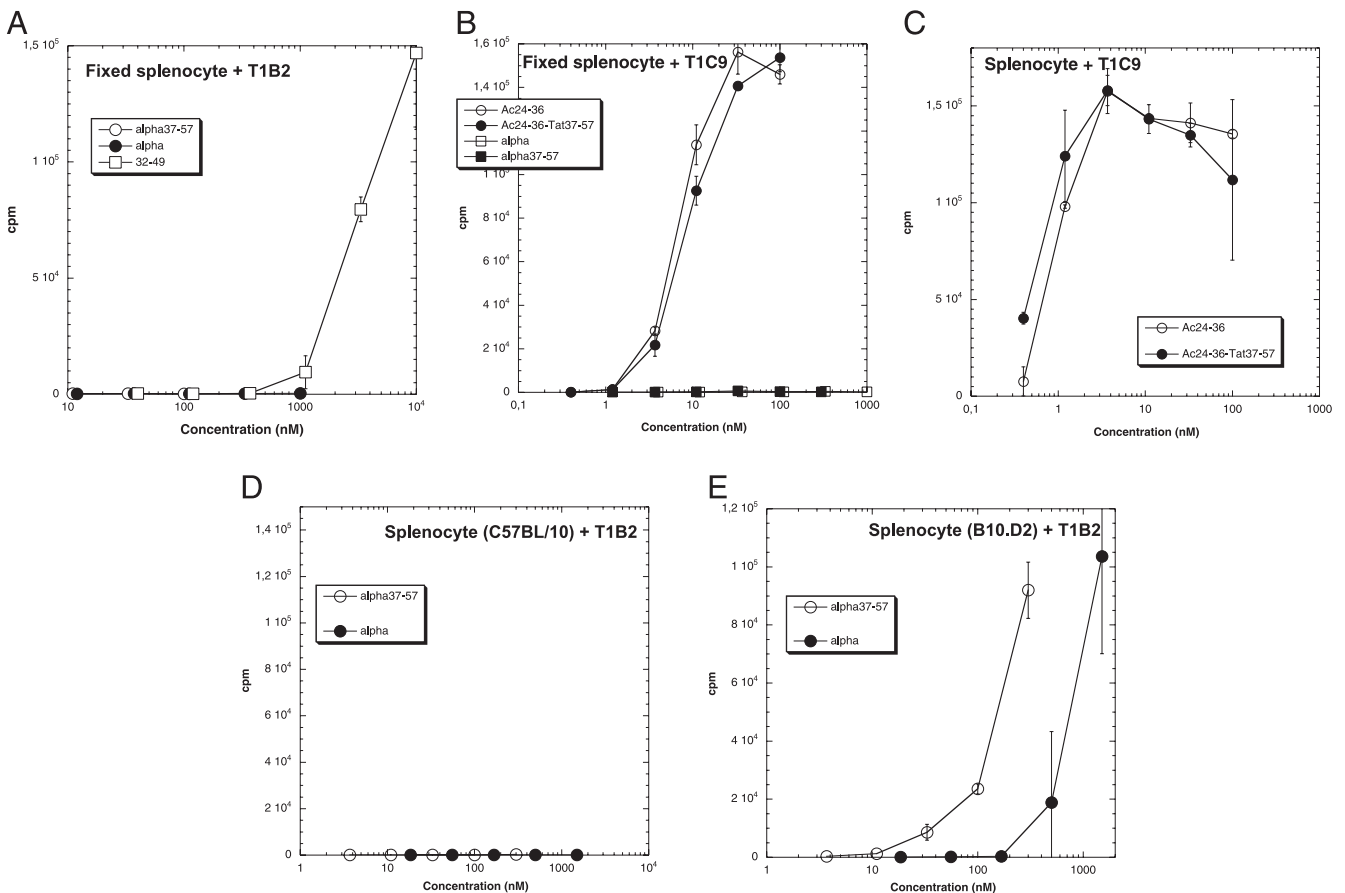


FIGURE 4. The boosting effect requires Ag processing and depends on MHC class II-restricted Ag presentation. To examine the processing requirement, splenocytes from BALB/c mice were fixed and incubated for 3 h with serial dilutions of toxin α , alpha37-57, and peptide 32-49 before the addition of T1B2 (A) or with serial dilutions of toxin α , alpha37-57, and peptide Ac24-36 or peptide Ac24-36-Tat37-57 before the addition of T1C9 (B). C, To compare the stimulating capacities of Ac24-36 and Ac24-36-Tat37-57 in the presence of live APCs, splenocytes from BALB/c mice were incubated for 3 h with these two peptides. T1C9 was added, and T cell stimulation was assessed as described in Fig. 3. To examine whether the boosting effect depends on MHC class II-restricted Ag presentation, serial dilutions of free toxin α or alpha37-57 were incubated with splenocytes from C57BL/10 (D) and B10.D2 mice (E). After 3 h at 37°C, T1B2 was added, and T cell stimulation was assessed as described in Fig. 3. Similar results were observed in at least two separate experiments.

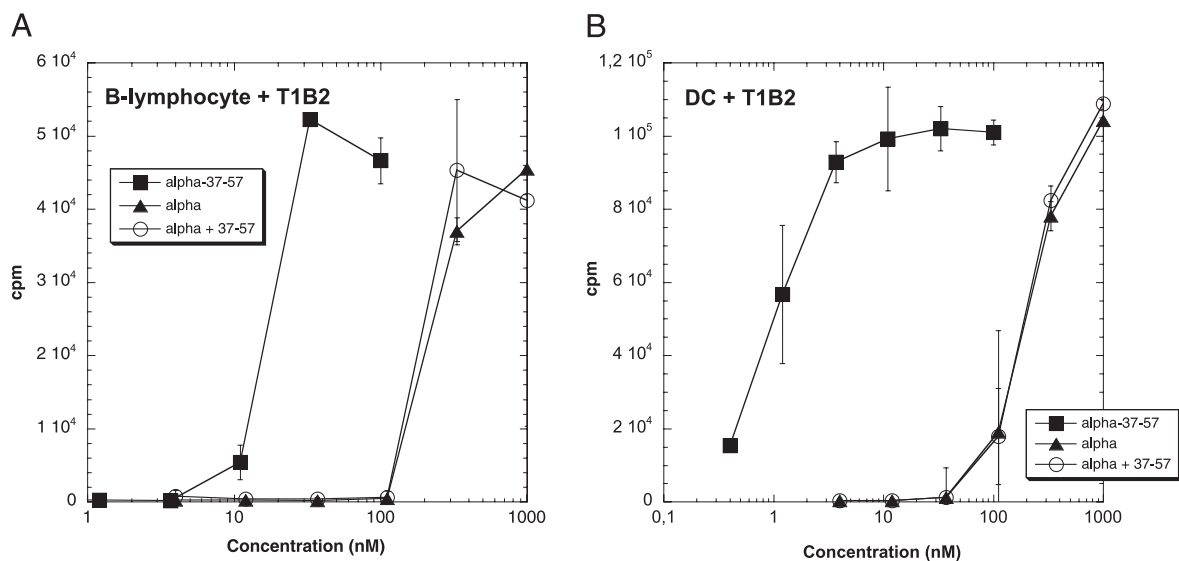


FIGURE 5. The Tat fragment 37–57 increases the presentation of toxin α by splenic B lymphocytes and DCs to T1B2. B lymphocytes (A) or DCs (B) were incubated with serial dilutions of toxin α , α plus peptide 37–57, or alpha37–57. After 3 h at 37°C, T1B2 was added, and T cell stimulation was assessed as described in Fig. 3. Similar results were observed in at least two separate experiments.

depends on class II-restricted Ag presentation. Altogether, these results indicate that the Tat37–57 moiety targets HSPGs and, thus, increases the MHC class II-restricted presentation of a protein Ag that requires processing.

Next, we purified B lymphocytes and DCs from splenocytes to examine whether the boosting effect was observed in the presence of these two different types of APCs. With B lymphocytes, stimulation of T1B2 requires an amount of alpha37–57 ~10-fold lower than that of free toxin α or free toxin α plus peptide 37–57 (Fig. 5A). The effect is inhibited with an excess of heparin (Supplemental Fig. 1), indicating that the phenomenon is related to the ability to bind heparan sulfates. A more pronounced stimulating effect was observed with DCs, because T cell stimulation requires 180 times less hybrid than free toxin α in the presence or absence of peptide 37–57 (Fig. 5B). Therefore, the boosting effect is observed in the presence of these two types of APCs and depends on the covalent coupling of the Tat fragment to the protein Ag.

Fc γ RII-bearing APCs present an IC containing toxin α covalently coupled to peptide 37–57 more efficiently

Because HSPGs can act as coreceptors that modulate the encounter of extracellular proteins with their receptors by forming HS/protein (7, 18), we used alpha37–57 to investigate whether HSPGs can regulate receptor-mediated Ag presentation. We focused on Fc γ RII-mediated Ag presentation because this receptor binds ICs and influences Ag presentation (6, 31–33). We first assessed whether polyclonal antitoxin α Abs previously complexed with alpha37–57 or free toxin α could bind to an A20 B cell lymphoma devoid of Fc γ RII (31). We found binding of the antitoxin Abs only in the presence of alpha37–57 (Fig. 6A). Furthermore, this binding was inhibited by heparin (Fig. 6C). Therefore, we concluded that peptide 37–57 mediates the interaction of ICs with the cells. We observed a different scenario with the Fc γ RII-expressing A20 cells (Fig. 6B). Thus, the toxin α containing IC binds similarly to that containing alpha37–57 for Ag concentrations ≤ 1 nM, indicating that the two ICs have a similar ability to interact with Fc γ R at low Ag concentrations. However, when the amount of Ag is > 1 nM, binding of alpha37–57 containing IC still increases, whereas binding decreases for toxin α containing IC. This difference is related to heparin-binding capacity because heparin alters binding of alpha37–57 +

antialpha, whereas it has no effect on the interaction of α + antialpha (Fig. 6D). Therefore, we concluded that, at concentrations > 1 nM, the 37–57 moiety counterbalances the lack of interaction with Fc γ RII.

Next, we examined whether coupling of fragment 37–57 boosted T cell presentation of toxin α if it had been complexed with polyclonal antitoxin Abs. For Fc γ RII[−] (Fig. 7A) and Fc γ RII⁺ A20 cells (Fig. 7C), differences were found in the capacity of toxin α and alpha37–57 to stimulate T1B2, indicating that these two APCs present toxin α more efficiently when it has been coupled to peptide 37–57. Furthermore, when free toxin α and alpha37–57 were incubated in the presence of an excess of heparin only, the increased presentation was inhibited (Supplemental Fig. 2), indicating that the boosting effect is related to the ability to bind heparan sulfate. Although equivalent in their ability to present α and alpha37–57, the two APCs differed in their ability to present them when they were included in ICs. Thus, the Fc γ RII[−] A20 cells presented the ICs containing toxin α or alpha37–57 similarly to the free forms of these two Ags (Fig. 7A, 7B), whereas the Fc γ RII⁺ A20 cells showed similar behavior for the IC containing α but not for the one containing alpha37–57. More precisely, presentation of alpha37–57 was 130- (Fig. 7C) to 700-fold (Fig. 7D) more efficient in the presence of the polyclonal antitoxin Abs compared with nonspecific IgGs. The boosting effect vanished in the presence of an excess of heparin (alpha37–57 + antialpha + heparin; Fig. 7D), indicating that the phenomenon was mediated by peptide 37–57. Furthermore, the phenomenon was not found when the toxin-specific T cell hybridomas were replaced by an unrelated diphtheria toxin-specific T cell hybridoma (data not shown). Therefore, we conclude that the polyclonal antitoxin Abs specifically increase T cell presentation of toxin α through a mechanism mediated by peptide 37–57 and Fc γ RII.

Discussion

The aim of our study was to assess whether the T cell-stimulating capacity of an Ag varies when it acquires the ability to interact with heparan sulfate and, thus, to examine whether ubiquitously expressed molecules, such as HSPGs, can play a role in MHC class II-restricted Ag presentation. We first focused on HIV-1 Tat, because it is a well-known heparin- and HS-binding protein (22, 23) that is

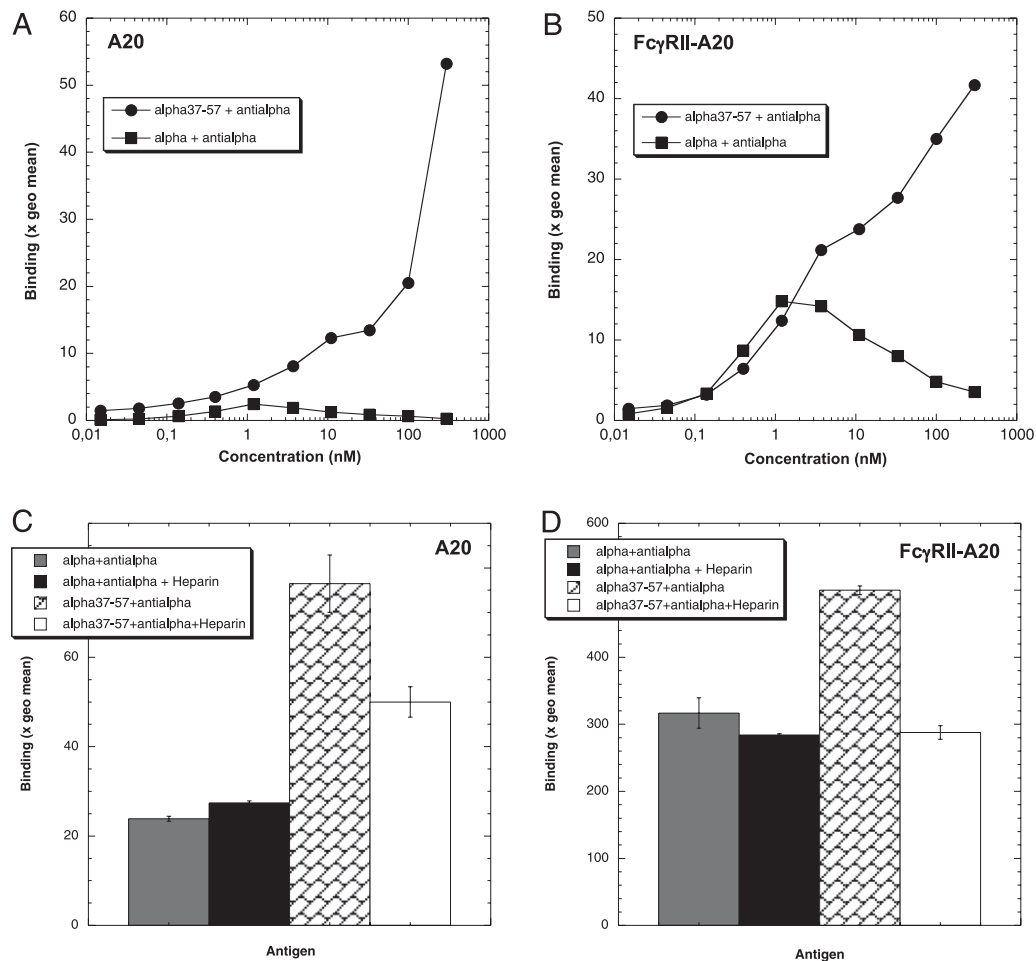


FIGURE 6. The Tat fragment 37–57 makes an IC containing toxin α capable of binding Fc γ RII⁻ and Fc γ RII⁺ A20 cells, and the phenomenon depends on heparin binding. Serial dilutions of alpha37–57 or free toxin α were incubated overnight in the presence of a fixed amount of a rabbit anti-alpha polyclonal Ab (10 nM). A20 cells (A) or Fc γ RII-expressing A20 cells (B) were added to the mixtures and incubated for 30 min at 4°C. The cells were subsequently washed, and a goat F(ab)₂ polyclonal anti-rabbit IgG labeled with fluorescein was added to assess binding of the ICs by FACS analysis. Similar results were observed in four separate experiments. To determine whether the phenomenon depends on heparin binding, a rabbit anti-alpha polyclonal Ab (10 nM) was incubated with alpha37–57 or toxin α (10 nM) in the presence or absence of heparin (3 μ M). A20 cells (C) or Fc γ RII-expressing A20 cells (D) were added for 30 min at 4°C, and binding was assessed using a donkey F(ab)₂ polyclonal anti-rabbit IgG labeled with phycoerythrin and FACS analysis. Similar results were observed in two separate experiments.

internalized in cells through a mechanism that requires cell surface HSPGs (25). In agreement with the ubiquitous distribution of HSPGs, we observed that Tat is able to bind a large variety of cells. We identified the Tat determinant involved in the interaction and selected the region 37–57, which overlaps this determinant, for synthesis and coupling to toxin α from *N. nigricollis*, which we used as a model Ag. The resulting hybrid, called alpha37–57, was prepared by disulfide bridge formation between cysteine residue 37 of the Tat fragment and a thiol group previously added to the N-terminal residue of toxin α (29). This N-terminal coupling was chosen because it is remote from the toxin α T cell epitopes recognized in the H-2^d haplotype, which are mainly located in region 24–49 of the molecule (19, 20). Thus, we obtained a hybrid protein that could be optimally compared with the free form of toxin α for the ability to bind APCs and to stimulate two H-2^d-restricted toxin-specific T cell hybridomas.

Our experiments showed that alpha37–57 is able to bind a variety of cells, whereas the free toxin α interacts weakly, if at all, indicating that the Tat characteristic of ubiquitous binding has been transferred to the antigenic protein. Furthermore, this binding capacity increases Ag uptake in APCs. Several observations indicate that the acquisition of the binding property makes toxin α more

potent at stimulating T cells. First, in the presence of splenocytes, the hybridomas T1B2 and T1C9 are stimulated for concentrations of alpha37–57 that are 5 and 13 times lower, respectively, than the concentrations of free toxin α . Second, the boosting effect is not observed when free toxin α is incubated in the presence of equimolar quantities of free fragment 37–57, indicating that the phenomenon requires covalent coupling to the Ag. Third, when the phase of binding to splenocytes is separated from the processing and presentation stage, an excess of free peptide 37–57 affects the stimulating capacity of alpha37–57, demonstrating that the effect is mediated by the binding of the 37–57 moiety to a receptor expressed on the surface of splenocytes. Fourth, in the presence of heparin, a soluble sulfated sugar representative of heparan sulfates able to bind Tat, the hybrid binds less efficiently to splenocytes, and its stimulating capacity becomes similar to that of free toxin α , indicating that the boosting effect depends on the ability of the 37–57 moiety to bind heparan sulfate. The specificity for this type of polysaccharide is underscored by the absence of inhibition of chondroitins A and B, which are representative of chondroitin sulfate (23). This latter observation, as well as the poor binding of Tat to chondroitins, also suggests that the phenomenon is not related to an interaction with the chondroitin sulfate moiety that is associated

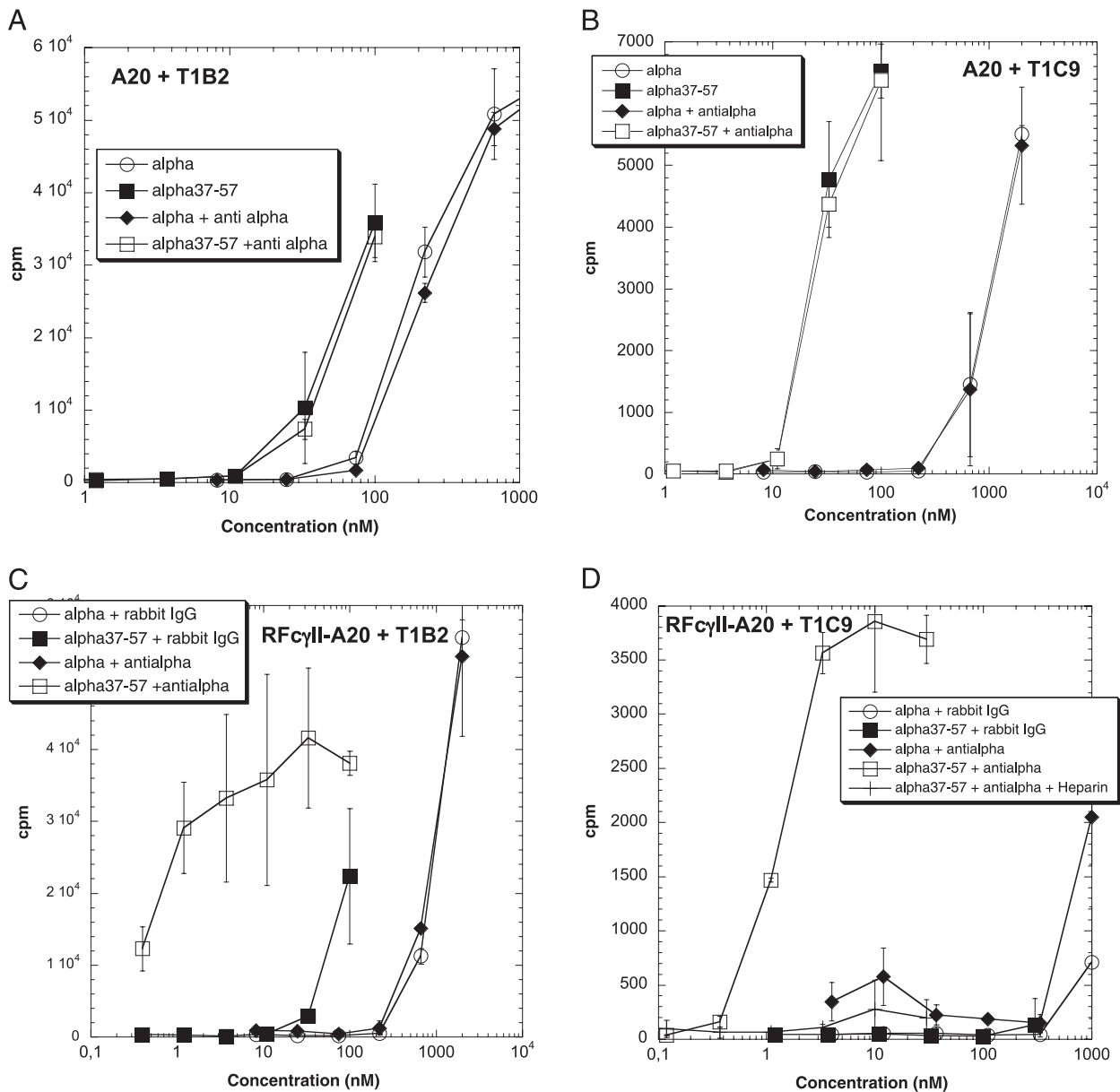


FIGURE 7. Fc γ RII-bearing A20 cells present the IC antialpha/alpha37–57 very efficiently to two toxin-specific T cell hybridomas. Alpha37–57 and toxin α were serially diluted and incubated overnight at 4°C in the presence or absence of a fixed amount of rabbit IgGs or rabbit antialpha polyclonal Abs (12.5 nM). A20 cells (A, B) or Fc γ RII-expressing A20 cells (C, D) were added to the mixtures. After 3 h at 37°C, T1B2 (A, C) or T1C9 (B, D) was added and incubated for 24 h at 37°C. IL-2 secretion was assessed using a CTLL–IL-2–dependent assay. Similar results were observed in at least two separate experiments.

with the invariant chain (34) and that was previously shown to influence Ag processing and presentation (35). Altogether, these observations lead to a scenario in which the 37–57 moiety targets the toxin to HSPG expressed on the surface of splenocytes and, thus, increases its T cell-stimulating capacity. This scenario does not rule out the possibility that T cell stimulation efficiency might also be impacted by slight modifications in the processing of toxin α when it is coupled to fragment 37–57.

We postulate that the HSPGs–alpha37–57 complex is then routed to late compartments where toxin α is processed. This scenario, which corresponds to that previously described for fibroblast growth factor because fibroblast growth factor/HSPG are removed from the cell surface and degraded in lysosomes (15–17), is supported by three observations. First, when fragment 37–57 is coupled to the T cell peptide Ac24–36, which does not require prior processing for presentation to T1C9, the stimulating capacity of this T cell epitope is

not increased, indicating that the boosting effect is not provided when the peptide is loaded directly on class II MHC molecules located on the cell surface. Second, toxin α is a very stable protein whose structure requires intensive processing to unfold and stimulate T cells (20, 21), and its processing remains an absolute requirement when it is coupled to peptide 37–57. Thus, alpha37–57 is unable to stimulate the T1B2 and T1C9 hybridomas when incubated in the presence of fixed splenocytes devoid of processing capacity. Third, the T1B2 T cell hybridoma recognizes a thiol-dependent epitope, and processing of such epitopes is dependent on γ IFN-inducible lysosomal thiol reductase, which is a lysosomal enzyme (36) colocalized with MHC class II and the marker Lamp II in mouse DCs (37).

Coupling of toxin α to fragment 37–57, which contains the core and basic regions of Tat, is particularly effective because, in the presence of DCs, alpha37–57 stimulates T1B2 180 times better than free toxin α . These results contrast with those reported by

Mitsui et al. (38), who showed that OVA is not better presented by DCs when it is coupled to the basic region of Tat. It is well known that the basic region of Tat is able to bind heparan sulfate (24) and it is often used as a cargo for transduction of proteins, which thus transit in early endosomes before their transfer to the cytoplasm (39, 40). However, the differences in the boosting capacities are not due to the difference between the Tat fragments used for coupling to OVA and toxin α , because when the latter Ag is coupled to the basic region of Tat, its T-stimulating capacity increases to a level close to that of alpha37–57 (data not shown). We assume that the differences might, in contrast, be related to the inherent stability of the two model Ags. Thus, a dichroic analysis at different temperatures indicates that OVA unfolds when the temperature reaches 72°C (data not shown), whereas toxin α must be heated to 92°C (21) to observe the same phenomenon. In addition, OVA is sensitive to acidic pH (41), whereas toxin α remains stable between pH 3 and pH 9 (data not shown). From these observations, we postulate that targeting to HSPG would enhance the MHC class II-restricted presentation of stable proteins whose processing requires the harsh conditions of degradation found in lysosomes but would have a poor effect for less stable proteins, which can be partially unfolded and processed in the mild conditions encountered in early endosomes.

The enhancement of the T-stimulating capacity of the hybrid varies, depending on the type of APC used. Thus, to stimulate T1B2 as efficiently as toxin α , the amounts of alpha37–57 required are 3, 13, and 180 times lower in the presence of A20 cells, B lymphocytes, and DCs, respectively. Although it was previously shown that APCs may have variable processing capacity (42), we postulate that Ag-processing efficiency does not account for the differences in T cell stimulation, because the concentrations of free toxin α required to stimulate the T cell hybridoma are close for the three types of APCs, suggesting that they process the hybrid protein with similar effectiveness. We hypothesize that the differences might be due to variations in intracellular trafficking or to interactions with different oligosaccharide structures, because glycosaminoglycans have varied architectures (17) and because their quantity may vary, depending on the type of APC and the degree of cell differentiation (43).

It was shown that HSPGs can act as coreceptors. Thus, they modulate the encounter between the protein and its ligand and the resulting biological activity (7, 18). Our results indicate that HSPGs can behave similarly in Fc γ RII-mediated Ag presentation. The ICs containing α -37–57 are more efficient than those containing toxin α at binding a B cell lymphoma expressing Fc γ RII. The increased binding correlates with an enhancement of the T cell-stimulating capacity. This boosting effect is abrogated with an excess of heparin, indicating that HSPGs can act as coreceptors during internalization of ICs containing heparan sulfate ligands via Fc γ RII. Therefore, the data presented in this study show that HSPGs can behave as receptors or coreceptors in MHC class II-restricted Ag presentation for proteins able to bind HS. Because heparan sulfate interacts with motifs containing basic residues (17, 44), we postulate that proteins carrying such motifs are more effectively supported by the immune system.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182: 389–400.
- Lanzavecchia, A. 1996. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 348–354.
- Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 821–850.
- Théry, C., and S. Amigorena. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 45–51.
- Guermónprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Théry, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 621–667.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179: 1109–1118.
- Park, P. W., O. Reizes, and M. Bernfield. 2000. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J. Biol. Chem.* 275: 29923–29926.
- Wadström, T., and A. Ljungh. 1999. Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity. *J. Med. Microbiol.* 48: 223–233.
- Menozi, F. D., K. Pethe, P. Bifani, F. Soncin, M. J. Brennan, and C. Locht. 2002. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol. Microbiol.* 43: 1379–1386.
- Patel, M., M. Yanagishita, G. Roderiquez, D. C. Bou-Habib, T. Oravec, V. C. Hascall, and M. A. Norcross. 1993. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9: 167–174.
- Roderiquez, G., T. Oravec, M. Yanagishita, D. C. Bou-Habib, H. Mostowski, and M. A. Norcross. 1995. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J. Virol.* 69: 2233–2239.
- Compton, T., D. M. Nowlin, and N. R. Cooper. 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193: 834–841.
- Butcher, B. A., L. A. Sklar, L. C. Seamer, and R. H. Glew. 1992. Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. A fluorescence flow cytometric analysis. *J. Immunol.* 148: 2879–2886.
- Love, D. C., J. D. Esko, and D. M. Mosser. 1993. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. *J. Cell Biol.* 123: 759–766.
- Gleizes, P. E., J. Noaillac-Depeyre, F. Amalric, and N. Gas. 1995. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) internalization through the heparan sulfate proteoglycan-mediated pathway: an ultrastructural approach. *Eur. J. Cell Biol.* 66: 47–59.
- Gleizes, P. E., J. Noaillac-Depeyre, M. A. Dupont, and N. Gas. 1996. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) is addressed to caveolae after binding to the plasma membrane of BHK cells. *Eur. J. Cell Biol.* 71: 144–153.
- Conrad, H. E. 1998. *Heparin-Binding Proteins*, Vol. 1. Academic Press, San Diego, CA.
- Carey, D. J. 1997. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* 327: 1–16.
- Léonetti, M., L. Pillet, B. Maillère, H. Lamthanh, P. Frachon, J. Couderc, and A. Ménez. 1990. Immunization with a peptide having both T cell and conformationally restricted B cell epitopes elicits neutralizing antisera against a snake neurotoxin. *J. Immunol.* 145: 4214–4221.
- Maillère, B., J. Cotton, G. Mourier, M. Léonetti, S. Leroy, and A. Ménez. 1993. Role of thiols in the presentation of a snake toxin to murine T cells. *J. Immunol.* 150: 5270–5280.
- Thai, R., G. Moine, M. Desmadril, D. Servent, J. L. Tarride, A. Ménez, and M. Léonetti. 2004. Antigen stability controls antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 279: 50257–50266.
- Albini, A., R. Benelli, M. Presta, M. Rusnati, M. Ziche, A. Rubartelli, G. Paglialunga, F. Bussolino, and D. Noonan. 1996. HIV-tat protein is a heparin-binding angiogenic growth factor. *Oncogene* 12: 289–297.
- Rusnati, M., D. Coltrini, P. Oreste, G. Zoppetti, A. Albini, D. Noonan, F. d'Adda di Fagagna, M. Giacca, and M. Presta. 1997. Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J. Biol. Chem.* 272: 11313–11320.
- Chang, H. C., F. Samaniego, B. C. Nair, L. Buonaguro, and B. Ensoli. 1997. HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS* 11: 1421–1431.
- Tyagi, M., M. Rusnati, M. Presta, and M. Giacca. 2001. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 276: 3254–3261.
- Patel, H. V., A. A. Vyas, K. A. Vyas, Y. S. Liu, C. M. Chiang, L. M. Chi, and W. Wu. 1997. Heparin and heparan sulfate bind to snake cardiotoxin. Sulfated oligosaccharides as a potential target for cardiotoxin action. *J. Biol. Chem.* 272: 1484–1492.
- Léonetti, M., J. Galon, R. Thai, C. Sautès-Fridman, G. Moine, and A. Ménez. 1999. Presentation of antigen in immune complexes is boosted by soluble bacterial immunoglobulin binding proteins. *J. Exp. Med.* 189: 1217–1228.
- Kittiworakarn, J., A. Lecoq, G. Moine, R. Thai, E. Lajeunesse, P. Drevet, C. Vidaud, A. Ménez, and M. Léonetti. 2006. HIV-1 Tat raises an adjuvant-free humoral immune response controlled by its core region and its ability to form cysteine-mediated oligomers. *J. Biol. Chem.* 281: 3105–3115.
- Kessler, P., F. Kotzyba-Hibert, M. Leonetti, F. Bouet, P. Ringler, A. Brisson, A. Ménez, M. P. Goeldner, and C. Hirth. 1994. Synthesis of an acetylcholine receptor-specific toxin derivative regioselectively labeled with an undecagold cluster. *Bioconjug. Chem.* 5: 199–204.

30. Maillère, B., G. Mourier, J. Cotton, M. Hervé, S. Leroy, and A. Ménez. 1995. Probing immunogenicity of a T cell epitope by L-alanine and D-amino acid-scanning. *Mol. Immunol.* 32: 1073–1080.
31. Amigorena, S., C. Bonnerot, J. R. Drake, D. Choquet, W. Hunziker, J. G. Guillet, P. Webster, C. Sautes, I. Mellman, and W. H. Fridman. 1992. Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 256: 1808–1812.
32. Amigorena, S., D. Lankar, V. Briken, L. Gapin, M. Viguier, and C. Bonnerot. 1998. Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. *J. Exp. Med.* 187: 505–515.
33. Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Théry, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena. 1999. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189: 371–380.
34. Miller, J., J. A. Hatch, S. Simonis, and S. E. Cullen. 1988. Identification of the glycosaminoglycan-attachment site of mouse invariant-chain proteoglycan core protein by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1369.
35. Naujokas, M. F., M. Morin, M. S. Anderson, M. Peterson, and J. Miller. 1993. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 74: 257–268.
36. Arunachalam, B., U. T. Phan, H. J. Geuze, and P. Cresswell. 2000. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 745–750.
37. Maric, M., B. Arunachalam, U. T. Phan, C. Dong, W. S. Garrett, K. S. Cannon, C. Alfonso, L. Karlsson, R. A. Flavell, and P. Cresswell. 2001. Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science* 294: 1361–1365.
38. Mitsui, H., T. Inozume, R. Kitamura, N. Shibagaki, and S. Shimada. 2006. Polyarginine-mediated protein delivery to dendritic cells presents antigen more efficiently onto MHC class I and class II and elicits superior antitumor immunity. *J. Invest. Dermatol.* 126: 1804–1812.
39. Fittipaldi, A., A. Ferrari, M. Zoppé, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram, and M. Giacca. 2003. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 34141–34149.
40. Futaki, S. 2006. Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers* 84: 241–249.
41. Weaver, J. M., C. A. Lazarski, K. A. Richards, F. A. Chaves, S. A. Jenks, P. R. Menges, and A. J. Sant. 2008. Immunodominance of CD4 T cells to foreign antigens is peptide intrinsic and independent of molecular context: implications for vaccine design. *J. Immunol.* 181: 3039–3048.
42. Delamarre, L., M. Pack, H. Chang, I. Mellman, and E. S. Trombetta. 2005. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307: 1630–1634.
43. Wegrowski, Y., A. L. Milard, G. Kotlarz, E. Toulmonde, F. X. Maquart, and J. Bernard. 2006. Cell surface proteoglycan expression during maturation of human monocytes-derived dendritic cells and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 144: 485–493.
44. Imberty, A., H. Lortat-Jacob, and S. Pérez. 2007. Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr. Res.* 342: 430–439.

Suite à ces travaux, nous avons réalisé des expériences proches à l'aide d'un autre système protéique également capable de cibler à la fois les HS cellulaires et les Ig exprimées à la surface de cellules B. Ce système correspond à une protéine de fusion contenant un Ag capable de lier les HS, et un ligand de la région Fc des Ig exprimées à la surface des cellules. Le choix de l'Ag s'est porté sur le domaine de liaison au récepteur cellulaire de la toxine diphtérique, appelé DTR-BD. Nous avons utilisé DTR-BD car nous avons préalablement observé que ce domaine protéique est doté de la capacité de liaison des HS. Pour le ciblage des Ig, nous avons utilisé le dérivé ZZ de la protéine A de *S aureus*, car il avait été précédemment montré au laboratoire que des protéines antigéniques sont plus efficacement internalisées et présentées aux cellules T lorsqu'elles sont préalablement fusionnées à ZZ (Figure 27).

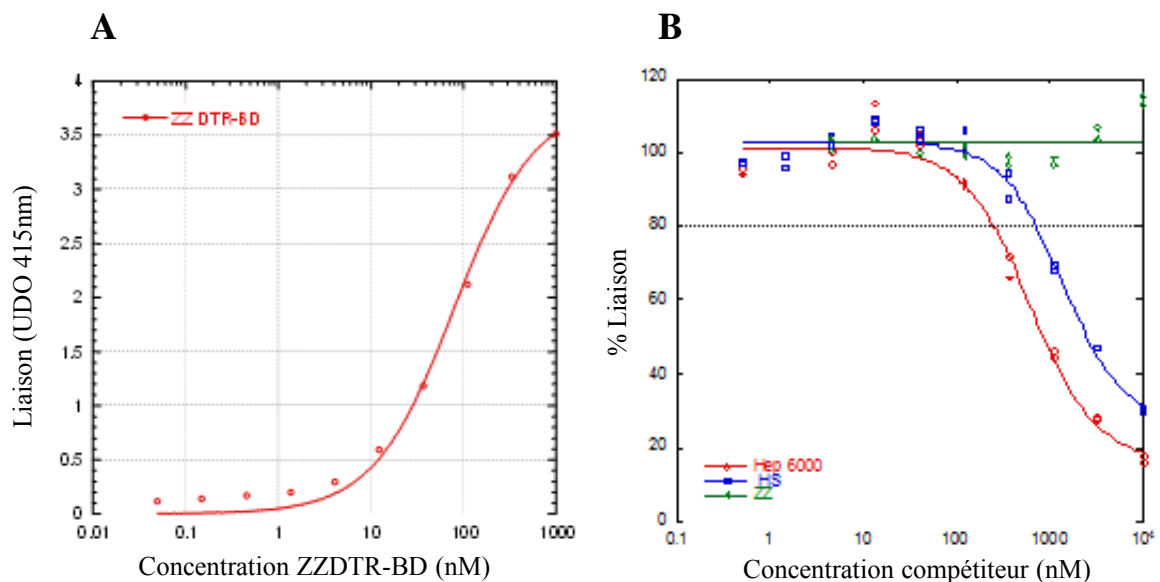


Figure 27 Capacité de liaison de l'héparine et des HS de ZZDTR-BD

Pour évaluer la capacité de la protéine de fusion ZZDTR-BD à lier l'héparine et les HS, des séries de dilution de cette dernière ont été incubées dans des plaques de microtitration préalablement adsorbées avec de l'héparine couplée à de l'albumine. La liaison de ZZDTR-BD aux plaques a été mise en mesure à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin et d'un anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin couplé à la peroxydase et d'un substrat de cet enzyme (ABTS) (A). Pour évaluer la spécificité de liaison aux plaques et la région de ZZDTR-BD impliquée dans l'interaction, une quantité fixe de ZZDTR-BD a été incubée dans les plaques en présence de séries de dilution de ZZ, héparine 6000 (Hep6000) et HS, respectivement (B). La liaison aux plaques a été détectée de la même manière qu'en A.

Nous avons analysé la capacité T stimulante de ZZDTR-BD *in vitro*, à l'aide de la lignée présentatrice A20 et d'un hybridome T spécifique du fragment 92-106 de la toxine

diphthérique, appelé T4B6. L'expérience a été réalisée en présence ou en absence d'un excès d'héparine 6000 et/ou d'IgG de lapin, susceptibles d'entrer en compétition avec les ligands de la surface cellulaire pour la liaison de la construction.

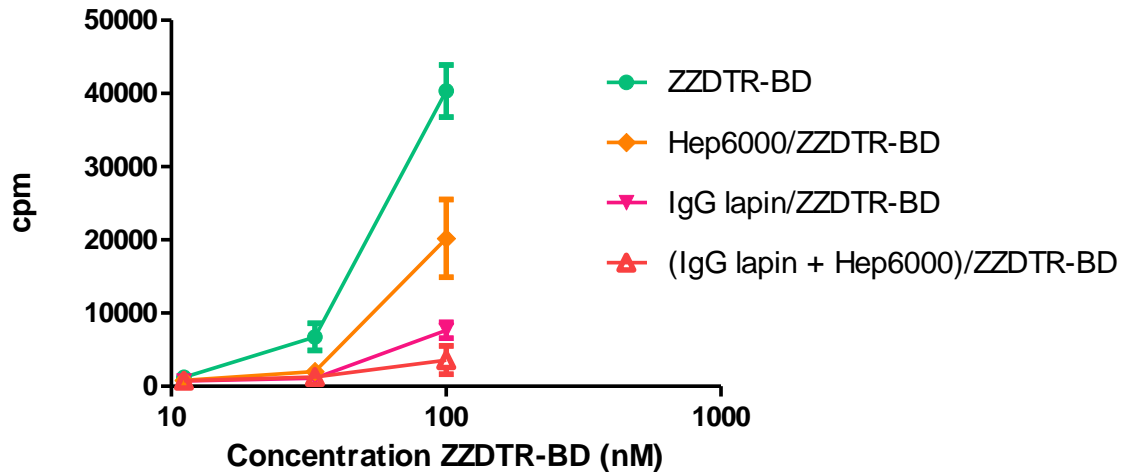


Figure 28 Capacité T-stimulante de ZZDTR-BD

Des séries de dilution de ZZDTR-BD ont été pré-incubées en présence ou en absence d'un excès d'Hep6000 ($3\mu\text{M}$), d'IgG de lapin ($0,8\mu\text{M}$), ou d'un mélange d'Hep6000 ($3\mu\text{M}$) et d'IgG de lapin ($0,8\mu\text{M}$). Les mélanges ont été ajoutés aux cellules A20. Après 1 heure à 37°C , l'hybridome T4B6 a été ajouté. 24 heures plus tard, la présence d'IL-2 a été évaluée dans les surnageants à l'aide d'un test de prolifération d'une lignée CTL-IL-2 dépendante.

Comme on peut le voir sur la Figure 28, la construction ZZDTR-BD est dotée d'une capacité T stimulante qui peut être inhibée par un excès d'héparine et/ou d'IgG. Ces données suggèrent que cette construction constitue bien un système capable de cibler les cellules grâce à la liaison simultanée des HS et d'Ig à la surface des cellules. Ensemble, ces résultats indiquent que le ciblage simultané des HS et des récepteurs Fc via la portion Fc des Ig agit en synergie et permet d'accroître la présentation d'Ag.

Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer l'effet du ciblage simultané des HS cellulaires et de déterminants non ubiquitaires à la surface des cellules autres que les Ig. Etant donné que le déterminant ZZ est doté de la capacité de lier la portion Fc des Ig, nous avons complexé la construction ZZDTR-BD à des anticorps ciblant des marqueurs exprimés préférentiellement par des CPA et nous avons évalué la capacité T stimulante de ces

complexes *in vitro*. Nous avons utilisé un anticorps anti- CMH II d'une part, et un second anticorps anti-Lyb2.1 d'autre part.

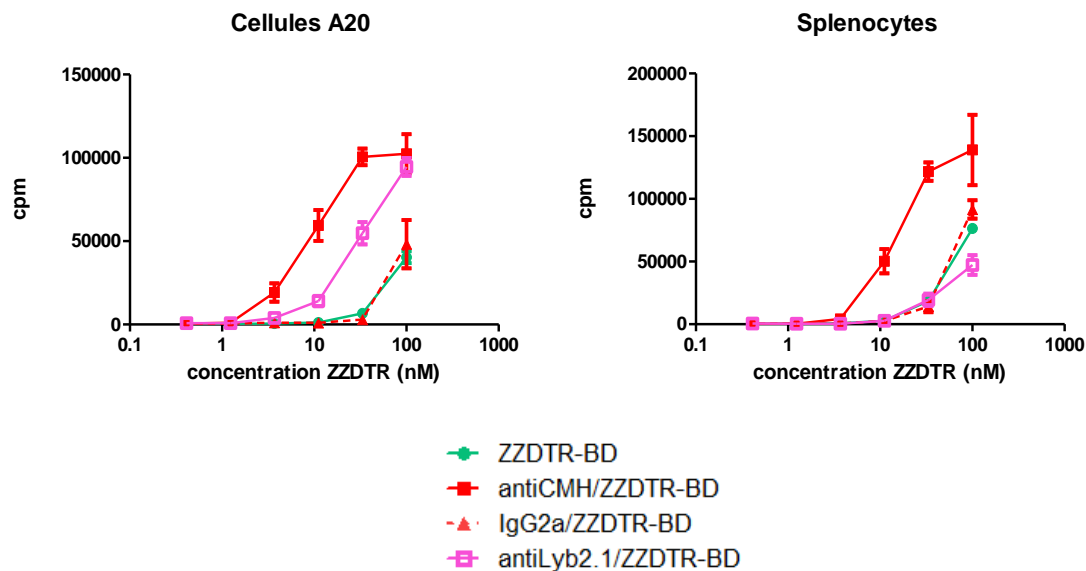


Figure 29 Capacité T-stimulante de ZZDTR-BD préalablement complexé à des anticorps spécifiques de marqueurs exprimés à la surface de CPA

ZZDTR-BD a été pré-incubé en présence ou en absence de quantités équimolaires de d'anticorps anti-CMH, anti-Lyb2.1 ou d'un anticorps contrôle d'isotype IgG2a, respectivement. Les mélanges ont été ajoutés à des cellules A20 ou à des splénocytes. Après 1 heure à 37 °C, l'hybridome T4B6 a été ajouté. 24 heures plus tard, les surnageants ont été prélevés et la présence d'IL-2 a été évaluée à l'aide d'une lignée CTL-IL-2 dépendante

Comme on peut le voir sur la Figure 29, l'association d'anticorps anti-CMH II et anti-Lyb2.1 à la construction ZZDTR-BD permet d'accroître de manière spécifique la capacité de cette dernière à être présentée par des cellules A20 ou des splénocytes à un hybridome T spécifique.

La méthodologie des différents tests réalisés au cours de cette étude est détaillée dans la partie finale de ce manuscrit consacrée aux procédures expérimentales

2.2. Modulation de la présentation de l'Ag restreinte au CMH I grâce au ciblage des HS

La question de la capacité de ligands des HS à améliorer la présentation des Ag a été adressée dans différentes études qui ont permis de montrer que ces systèmes sont efficaces *in vitro* et *in vivo* pour permettre l'activation de cellules T cytotoxiques (Kim et al. 1997 ; Shibagaki et Udey, 2002; Batchu et al., 2005). Dans cette étude, nous avons souhaité établir si ce type de ciblage permet également de moduler la présentation croisée des Ag sous forme de complexes immuns, médiée par les récepteurs Fc, comme c'est le cas dans le cadre de la présentation restreinte au CMH de classe II (Léonetti et al., 2010).

Pour étudier cette question, nous avons examiné si la présentation d'une protéine antigénique modèle contenant un épitope T restreint au CMH de classe I engagée dans un complexe immun varie quand celle-ci est couplée de façon covalente à un ligand d'HS. Comme dans l'étude précédente, nous avons utilisé la toxine α de *Naja nigricollis* comme Ag modèle, auquel nous avons associé un épitope TCD8⁺ de séquence SIINFEKL issu de l'ovalbumine. Pour le ciblage des HS, nous avons sélectionné la région 47-57 de la protéine Tat du VIH-1 correspondant à la région basique, identifiée comme étant le domaine minimal de transduction médiée par la liaison aux HS (Brooks et al., 2010).

Nous avons analysé la capacité T stimulante de ces constructions *in vitro*, grâce à un test de présentation impliquant la lignée de cellules dendritiques murine Jaws II utilisées comme cellules présentatrices, et des splénocytes de souris de la lignée OT-1 spécifiques du peptide SIINFEKL présenté dans le contexte H2K^b. La méthodologie complète de ce test est décrite dans la partie finale de ce manuscrit consacrée aux procédures expérimentales.

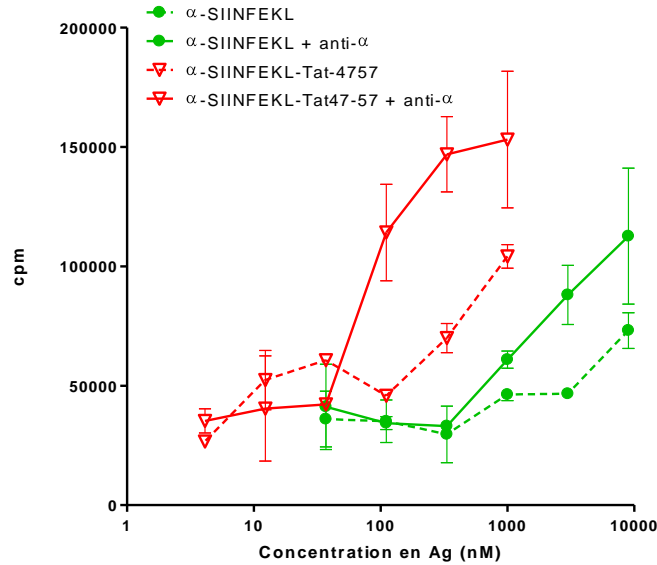


Figure 30 Présentation croisée d'Ag couplés ou non à un fragment capable de lier les HS sous forme libre ou sous forme de complexes immuns

Des cellules JawsII (30 000 cellules / puits) ont été incubées avec des dilutions de toxine α -SIINFEKL ou α -SIINFEKL-47-57, en présence ou en absence de 50nM d'anticorps polyclonal de lapin anti- α . Après 5 heures d'incubation, les cellules ont été lavées et fixées avec du glutaraldéhyde à 0,008% et des splénocytes de souris de la lignée OT-1 (90 000 cellules / puits) ont été ajoutés. Après 3 jours d'incubation, la prolifération des splénocytes a été mesurée. Des résultats similaires ont été observés dans trois expériences indépendantes.

Comme on peut le voir sur la Figure 30, la présence du déterminant Tat47-57 confère à l'Ag une capacité de présentation accrue d'un facteur 25. Ces résultats sont conformes avec les données de la littérature indiquant que la présence d'un déterminant de type CPP accroît la présentation croisée des Ag (Kim et al., 1997). De la même manière, et également en conformité avec les données de la littérature, on observe que la présentation croisée des Ag est plus importante lorsque ces derniers sont engagés dans des complexes immuns (Regnault et al., 1999). De manière intéressante, on observe que la présence du déterminant Tat47-57 permet d'accroître la présentation de l'Ag sous forme de complexe immun d'un facteur 27. En fait, le ciblage simultané des HS et des récepteurs Fc par les complexes immuns comprenant le déterminant Tat47-57 procure une synergie d'effet et permet d'accroître la présentation croisée de l'Ag d'un facteur 145 par rapport à l'Ag libre dépourvu du déterminant Tat47-57.

Afin de déterminer si l'effet synergique du ciblage simultané des HS et des récepteurs Fc à la surface des CPA est associé à une augmentation de la liaison des Ag sur les cellules,

nous avons comparé la capacité de liaison de complexes immuns comprenant ou non le déterminant Tat47-57 sur des cellules Jaws II d'une part, et des splénocytes d'autre part, par cytométrie en flux. Nous avons également évalué la spécificité du ciblage des HS et des récepteurs Fc grâce à des expériences de compétition avec un excès d'héparine libre et/ou d'anticorps bloquant spécifiquement les récepteurs Fc CD16/CD32 (2.4G2).

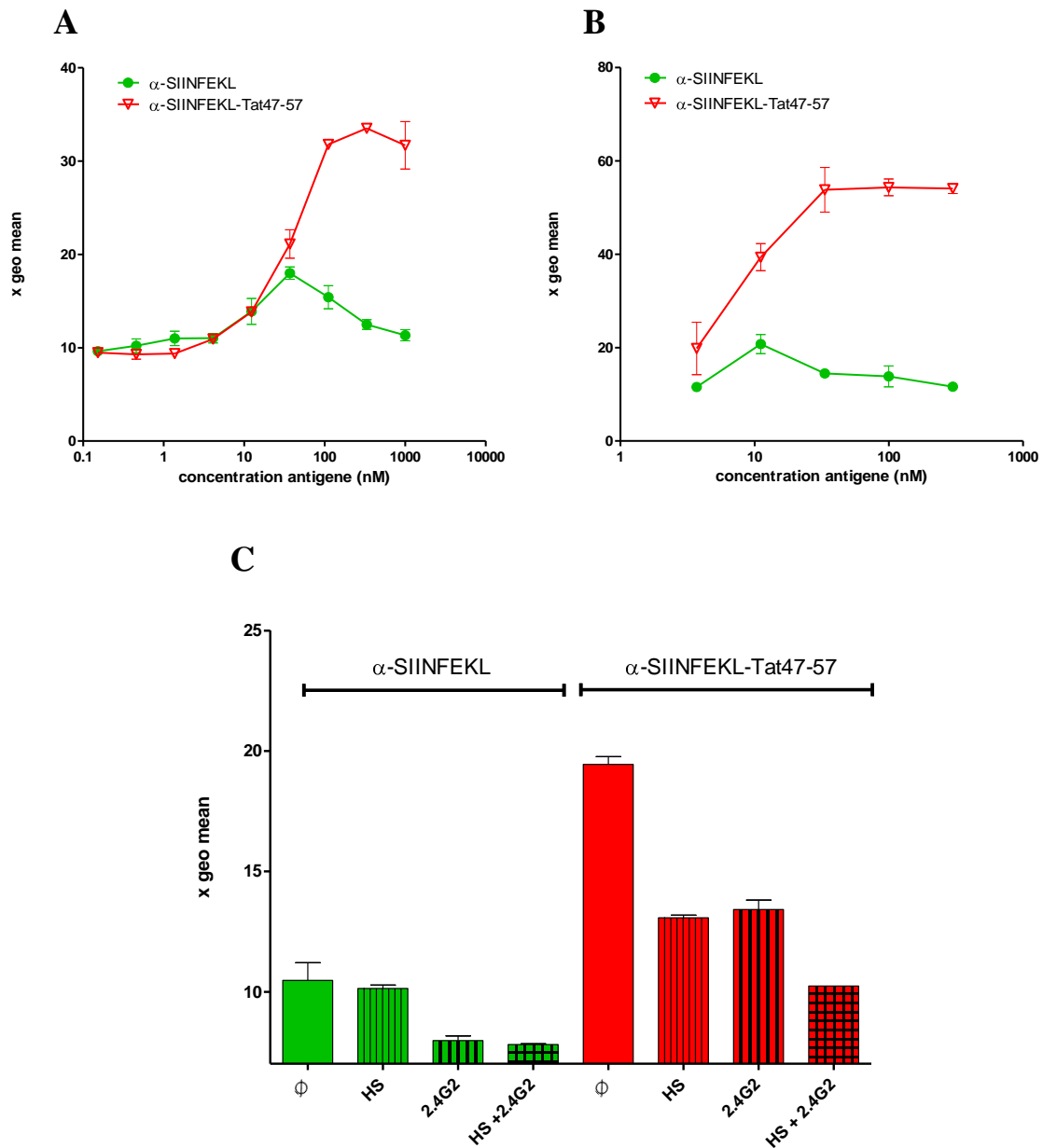


Figure 31 Liaison de complexes immuns contenant ou non un fragment capable de lier les HS sur différents types cellulaires

Des cellules JawsII (A) ($1,5 \cdot 10^5$ cellules / puits) ou des splénocytes de souris C57/Bl6 (B) ($2 \cdot 10^5$ cellules / puits) ont été incubées dans des plaques de polypropylène avec des séries de dilution de α -SIINFEKL ou α -SIINFEKL-Tat47-57, en présence de 25nM d'anticorps polyclonal de lapin anti- α . Après 1 heure d'incubation à 4°C, les cellules ont été lavées et incubées pendant 30 minutes avec un fragment F(ab)₂ polyclonal anti-lapin couplé au FITC. La liaison des complexes immuns à la surface des cellules a été révélée par cytométrie en flux. Afin d'étudier le rôle de la liaison aux HS et des récepteurs Fc, α -SIINFEKL et α -SIINFEKL-Tat47-57 ($1\mu\text{M}$ final) ont été incubés avec l'anticorps polyclonal de lapin anti- α (25nM final), en présence ou en absence d'un excès d'HS ($3\mu\text{M}$) et/ou d'ascite d'anticorps anti CD16/CD32 (2.4G2). Les mélanges ont ensuite été incubés avec les cellules JawsII et la liaison a été évaluée comme en A et B (C). Des résultats similaires ont été observés dans au moins trois expériences indépendantes.

Comme on peut le voir sur la Figure 31, la capacité de liaison de complexes immuns sur les cellules JawsII (A) comme sur des splénocytes (B) est accrue lorsque ces derniers contiennent le déterminant Tat47-57 capable de lier les HS. La liaison aux cellules du complexe α -SIINFEKL/anti- α est diminuée en présence de l'anticorps anti-récepteur Fc mais pas en présence d'un excès d'HS ce qui indique que les HS n'interviennent pas dans la liaison de ce complexe immun aux cellules, et que celle-ci est spécifiquement médiée par le récepteur Fc. En revanche, la liaison du complexe α -SIINFEKL-Tat47-57/anti- α . est diminuée en présence d'un excès d'HS ou d'anticorps bloquant les récepteurs Fc, ce qui indique que la capacité à lier les HS et le récepteur Fc jouent un rôle dans l'interaction de ce complexe avec les cellules. La liaison est encore plus diminuée quand les HS et l'anti-récepteur Fc sont incubés conjointement, ce qui indique que la liaison d' α -SIINFEKL-Tat47-57/anti- α résulte de la capacité à lier les HS et de l'interaction avec le récepteur Fc.

L'activation efficace des cellules T nécessite non seulement que l'Ag soit présenté aux cellules T sous la forme d'un peptide associé à une molécule CMH I, mais également que la délivrance de ce stimuli soit associé à des signaux de co-stimulation (Bennett et al., 1997). Afin d'évaluer la capacité du ciblage simultané des HS et des récepteurs Fc à activer la maturation des DC, nous avons exposé les cellules JawsII à des séries de dilution d' α -SIINFEKL couplé ou non à Tat47-57, en présence ou en absence d'anticorps anti- α pendant 24h. Nous avons ensuite analysé l'expression des marqueurs de maturation CD80 et CD86 à la surface des cellules.

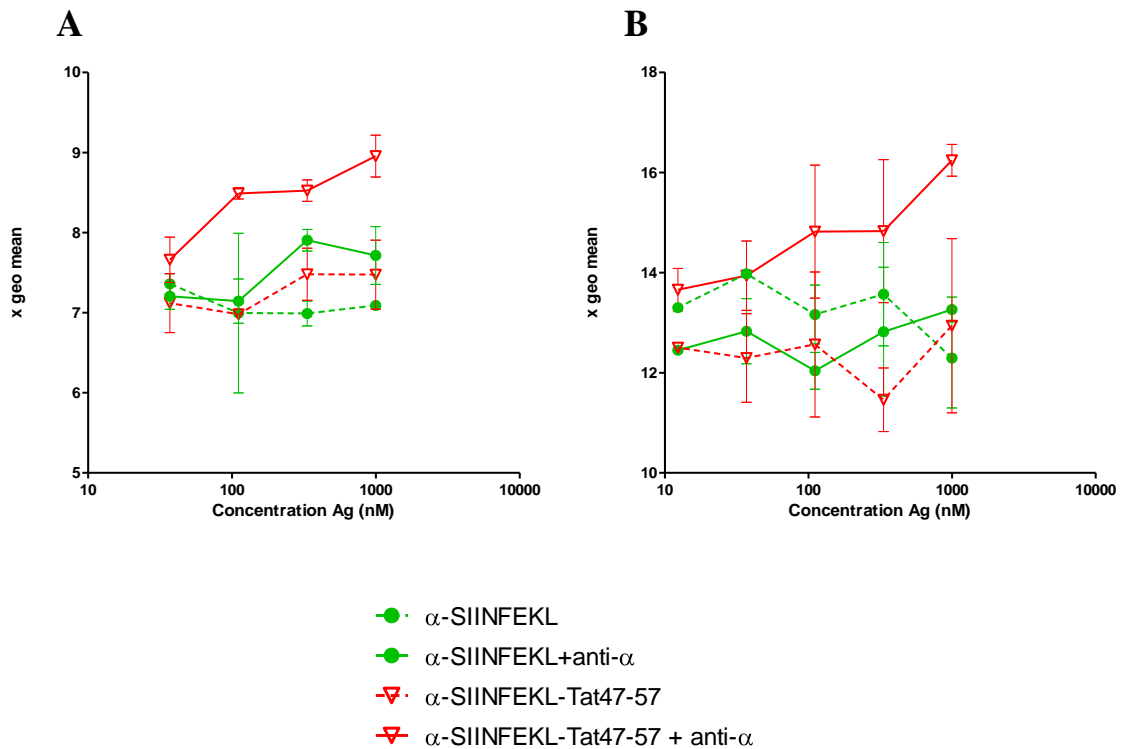


Figure 32 Maturation des cellules JawsII en réponse à l'exposition à des Ag couplés ou non à un fragment capable de lier les HS

Des cellules JawsII ($2 \cdot 10^5$ cellules / puits) ont été incubées avec des dilutions d' α -SIINFEKL ou α -SIINFEKL-Tat47-57, en présence ou en absence de 25nM d'anticorps polyclonal de lapin anti- α . Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été lavées et incubées pendant 30 minutes à 4°C avec l'anticorps anti-CD80-FITC (A) et l'anticorps anti-CD86-FITC(B) puis analysées par cytométrie en flux. Des résultats similaires ont été observés dans deux expériences indépendantes.

Comme on peut le voir sur la Figure 32A, l'expression du marqueur de co-stimulation CD80 est augmentée à la surface des cellules JawsII lorsque celles-ci sont exposées à des Ag capables de cibler les HS (α -SIINFEKL-Tat47-57) ou les récepteurs Fc (α -SIINFEKL/anti- α) à la surface des cellules. Nous n'avons pas observé cet effet pour le marqueur CD86, pour lequel les niveaux d'expression ne varient pas de façon significative en réponse à α -SIINFEKL-Tat47-57 comme α -SIINFEKL/anti- α par rapport à l'Ag α -SIINFEKL dépourvu de toute capacité de ciblage (Figure 32 B). Cependant, le complexe α -SIINFEKL-Tat47-57/anti- α se montre capable d'augmenter significativement le niveau d'expression de ce marqueur (Figure 32A) ainsi que celui de CD80 (Figure 32 B). Ces résultats indiquent que le ciblage simultané des récepteurs Fc et des HS procure un effet synergique sur la maturation des DC. Ce phénomène de maturation des DC pourrait permettre une activation plus efficace des cellules T et ainsi contribuer à l'augmentation de la présentation croisée de l'Ag que nous avons précédemment observée.

2.3. Applications vaccinales du ciblage simultané des HS et des récepteurs spécifiques de CPA par les Ag

Nos travaux montrent que le ciblage conjoint des HS et des récepteurs Fc à la surface des cellules permet d'augmenter la présentation des Ag de manière synergique, dans la voie CMH I comme dans la voie CMH II. Or, la présentation des Ag par les CPA représente une étape clé dans le déclenchement des réponses immunitaires. Aussi, l'utilisation de systèmes de ciblage des Ag intégrant des ligands des HS et d'autres ligands de récepteurs non ubiquitaires à la surface des CPA pourrait représenter une approche attractive pour améliorer l'immunogénicité d'Ag d'intérêt en vaccination. Cependant, en raison du caractère ubiquitaire de la distribution des HS (Park et al., 2000), le ciblage de ces derniers est susceptible d'entraîner *in vivo* une dissémination de l'Ag sur des cellules ainsi que la matrice extracellulaire, diminuant la quantité d'Ag disponible pour les CPA.

Afin d'évaluer l'influence de la présence d'un ligand des HS sur la spécificité de ciblage d'un système liant un marqueur spécifique de CPA, nous avons incubé des splénocytes de souris avec la molécule ZZDTR-BD complexée à un anticorps anti-CMH II, et nous avons évalué, par cytométrie en flux, sa distribution au sein de différents types cellulaires composants ce mélange hétérogène de cellules.

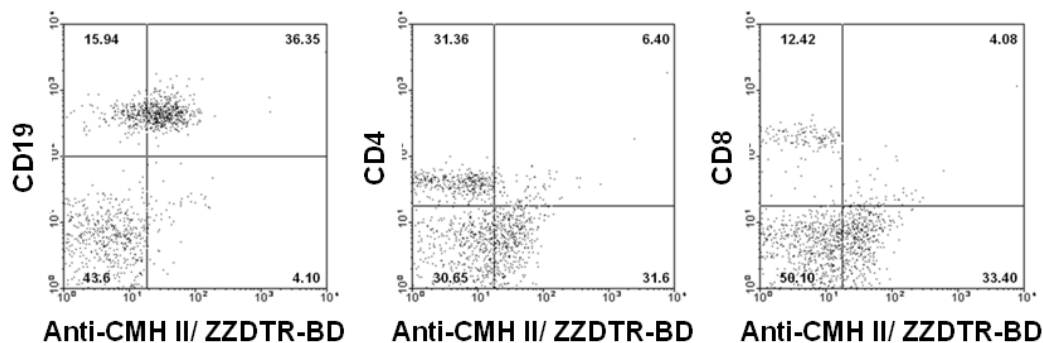


Figure 33 Distribution du complexe anti-CMH II/ZZDTR-BD au sein des splénocytes de souris

Une quantité fixe de complexe anti-CMH II/ZZDTR-BD a été incubée en présence de splénocytes et de trois anticorps marqués à la phycoérythrine, spécifiques des lymphocytes T CD4⁺ (anti-CD4), des lymphocytes T CD8⁺ (anti-CD8), et des lymphocytes B (anti-CD19). Après 30 minutes à 4 °C, les cellules ont été lavées et incubées en présence d'un anticorps polyclonal anti-anticorps de lapin couplé à la fluorescéine. 30 minutes plus tard, les cellules ont été lavées et analysées par cytométrie de flux.

Comme on peut le voir sur la Figure 33, le complexe anti-CMH II/ZZDTR-BD cible préférentiellement les cellules CD19⁺, qui expriment des récepteurs Fc et des molécules CMH II. A l'inverse, les cellules CD4⁺ et CD8⁺, qui n'expriment pas ces récepteurs chez la souris à l'état de repos sont faiblement ciblées. Ce résultat indique que la présence d'un ligand des HS perturbe peu la spécificité du ciblage des anticorps dans un mélange hétérogène de cellules *in vitro*. Néanmoins, ce résultat préjuge difficilement de la dissémination qui pourrait s'opérer *in vivo* et des conséquences sur l'immunogénicité.

Afin de réaliser une première évaluation du potentiel immunogénique de ce nouveau système *in vivo*, nous avons comparé l'immunogénicité du complexe anti-CMH II/ZZDTR-BD à celle d'un complexe intégrant un anticorps contrôle à la place de l'anticorps anti-CMH II de même isotype chez la souris. Pour cela, la protéine de fusion ZZDTR-BD a été incubée pendant une heure à température ambiante en milieu HBSS en présence de quantités équimolaires de l'anticorps anti-CMH II ou de l'anticorps contrôle. Deux groupes de quatre souris ont ensuite été injectés en absence d'adjuvant avec 0,01nmole de l'un ou de l'autre des complexes. La présence d'anticorps anti-toxine diphtérique a ensuite été mesurée dans les sera des animaux immunisés quarante cinq jours après l'injection par dosage immunoenzymatique. Nous avons mesuré des titres d'anticorps anti-toxine diphtérique 3,5 fois plus élevé pour le complexe anti-CMH II/ZZDTR-BD que pour le complexe incluant l'isotype contrôle. Ces résultats indiquent que le ciblage des molécules de CMH de classe II permet d'accroître la réponse immunitaire humorale induite contre le complexe ZZDTR-BD.

3. Discussion et perspectives

De nombreuses données de la littérature montrent que le ciblage de récepteurs à la surface des CPA permet d'augmenter la présentation des Ag, dans la voie CMH I comme dans la voie CMH II (Ueno et al., 2011), principalement en augmentant la concentration de ces derniers dans les cellules. Dans ce contexte, on peut imaginer que les marqueurs de ciblage les plus attractifs pour augmenter la présentation antigénique devraient présenter une distribution restreinte aux CPA, pour concentrer l'Ag sur ces dernières et éviter sa dispersion vers des cibles cellulaires et/ou extracellulaires qui ne jouent pas de rôle dans ce processus. Ainsi, on peut supposer que les récepteurs ubiquitaires, qui sont distribués sur une grande variété de cellules non immunes, ne jouent pas un rôle majeur dans la présentation antigénique. Toutefois, de nombreuses données de la littérature indiquent que des déterminants de type CPP, capables de cibler de manière non restrictive de nombreux type

cellulaires et d'y être internalisés, sont capables d'accroître la présentation croisée d'Ag conjugués (Kim et al. 1997 ;Shibagaki et Udey, 2002;Batchu et al., 2005). Devant l'implication de plus en plus documentée des HS dans le phénomène de liaison et d'internalisation des CPP dans les cellules, nous avons adressé la question du rôle des HS dans les mécanismes de présentation antigénique.

La première partie de nos travaux a permis de montrer que le ciblage des HS grâce à la région CPP de Tat, porteuse de l'activité de transduction et de liaison des HS, permet, en dépit du caractère ubiquitaire de ces derniers, d'augmenter la présentation restreinte au CMH II d'un Ag conjugué. Ce premier jeu de données montre pour la première fois qu'une séquence naturelle de protéine présentant des caractéristiques de CPP peut augmenter la présentation restreinte au CMH de classe II. Cet aspect n'avait pas été élucidé précédemment puisque seule une séquence CPP optimisée du point de vue de son activité de transduction s'était montrée capable d'induire un tel effet (Mitsui et al., 2006). Ces travaux établissent également pour la première fois le rôle des HS dans la présentation antigénique restreinte au CMH II. Une étude a montré que la capacité d'un vecteur viral vivant à lier les HS influence de manière positive l'activation de réponses T spécifiques du vecteur *in vivo* (Vandenberghe et al., 2006). Sur la base de nos résultats, on peut envisager qu'une augmentation de la présentation des Ag restreinte au CMH II grâce au ciblage des HS pourrait contribuer à ce phénomène. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'examiner l'influence des HS sur la capacité de ce vecteur à être présenté *in vitro*. Nos travaux nous ont permis d'établir que cette capacité de modulation de la présentation antigénique restreinte aux molécules CMH II par les HS est reliée à une augmentation de la capacité de liaison des Ag à la surface des CPA, et à une augmentation de leur internalisation.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 4.2 du chapitre 7 consacré à la description des mécanismes responsables de l'internalisation de Tat, les CPP lient les HS chargés négativement à la surface des cellules grâce à leurs nombreux résidus lysine et/ou arginine qui leur confèrent un caractère cationique. Cette propriété est largement responsable de leur propriété de transduction et de l'efficacité de présentation qui les caractérisent. Or, dans les années 80-90, de nombreux travaux ont montré que les Ag de nature cationique sont reconnus et internalisés plus efficacement par les CPA (Apple et al., 1988), et sont également plus immunogènes que leurs homologues moins chargés (Dohlman et al., 1991;Muckerheide et al., 1987). Dès lors, ce phénomène pourrait être réinterprété comme un processus de ciblage des

HS à la surface des CPA. Il serait intéressant d'examiner la sensibilité à l'héparine des phénomènes observés dans ces anciens modèles afin de tester cette hypothèse.

Au cours de ces travaux, nous avons également observé que le ciblage concomitant des HS et des récepteurs Fc par un Ag couplé au déterminant CPP de Tat et engagé dans un complexe immun entraîne une augmentation synergique de la présentation antigénique restreinte aux molécules CMH II. Nous avons obtenu le même type de résultats à l'aide d'une protéine de fusion constituée d'un Ag issu de la toxine diphtérique capable de lier les HS, et d'un ligand de la région Fc des Ig issu de la protéine A de *S. Aureus*. Grâce à ce système, nous avons été en mesure de cibler les récepteurs Fc de manière indirecte, grâce à la liaison par ZZ de la portion Fc des Ig naturellement présentes à la surface des cellules et liées aux récepteurs Fc. En outre, nous avons ciblé d'autres récepteurs non ubiquitaires exprimés spécifiquement à la surface des cellules présentatrices d'Ag : la molécule CMH II, et Lyb2.1 en formant des complexes non covalents entre la protéine de fusion et des anticorps monoclonaux dirigés contre ces récepteurs. Nous avons également montré que la capacité à lier simultanément les HS et des récepteurs spécifiques des CPA à la surface des cellules procure une synergie d'effet et permet une augmentation de la présentation antigénique restreinte au CMH de classe II par rapport au ciblage simple de l'un ou de l'autre déterminant.

Nous avons fait la même observation dans le cadre de la présentation de complexes immuns restreinte aux molécules CMH I à l'aide d'un système comprenant une protéine antigénique modèle associée à un épitope T restreint au CMH de classe I couplée ou non au CPP de Tat. Ces résultats montrent pour la première fois la capacité d'un CPP à accroître la présentation croisée d'un Ag possédant également la capacité de cibler un récepteur à la surface des CPA. Une étude récente avait en effet montré que le CPP de Tat ne permettait pas d'induire la présentation croisée d'Ag conjugués et que le couplage additionnel d'un CPP optimisé de type poly-arginine sur un complexe Ag-anticorps anti-DC-SIGN n'affecte pas la capacité de ce dernier à être présenté (Tacke et al., 2008). De nombreuses différences dans les systèmes expérimentaux peuvent être à l'origine de ces résultats contradictoires. D'une part, l'étude de Tacke et al. a été conduite dans un système humain, tandis que nous travaillons dans un système murin. D'autre part, les constructions utilisées dans cette étude font appel à des couplages non covalents de très haute affinité impliquant des complexes avidine-biotine, dont la stœchiométrie n'est pas contrôlée, et les anticorps utilisés ne sont pas capables de lier les récepteurs Fc. Enfin, dans cette étude, le test de présentation antigénique est réalisé en présence de ligands de TLR destinés à faire maturer les DC. Nous n'avons pas

utilisé de tels ligands, et nous pouvons imaginer que si la qualité de la maturation des CPA est un facteur déterminant pour l'effet, le recours à ces derniers pourrait masquer une partie des effets en saturant ce signal. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que le ciblage des HS et des récepteurs Fc induit la maturation des DC, et ce de manière synergique, suggérant que ce système pourrait activer des voies de signalisation du même type que celles induites par les signaux de danger. Ce phénomène pourrait contribuer à l'augmentation de la présentation que nous avons observée dans notre modèle. Néanmoins, d'autres mécanismes pourraient également intervenir dans ce phénomène, en particulier une capacité de ciblage des cellules accrues, ou encore une capacité de l'échappement endosomal des Ag. En effet, plusieurs études tendent à montrer qu'après leur internalisation, les CPP et leur éventuel cargo peuvent rejoindre le cytoplasme de manière directe ou par échappement endosomal lorsque le mécanisme d'internalisation fait intervenir les voies d'endocytose (Johnson et al., 2011), et la capacité des CPP à augmenter la présentation croisée des Ag a largement été attribuée à cette propriété. Nous avons établi que la capacité de modulation de la présentation antigénique restreinte aux molécules CMH I par les HS est liée à une capacité accrue de la liaison de l'Ag par les CPA en présence d'un ligand d'HS, en revanche, nous n'avons pas investigué l'adressage intracellulaire de l'Ag dans cette étude. En revanche, il a été montré que l'Ag modèle utilisé dans cette étude (la toxine alpha), est une protéine très stable qui requiert une forte activité protéolytique et vraisemblablement un passage dans les lysosomes pour obtenir un apprêtement suffisant permettant son chargement sur les molécules du CMH de classe II (Maillère et al., 1993a; Thai et al., 2004). Sur la base de ces données, nous n'excluons pas que notre construction Ag-CPP puisse éventuellement rejoindre le cytoplasme, mais nous postulons qu'une certaine proportion devrait être capable de progresser dans la voie d'endocytose classique pour permettre un apprêtement suffisant de l'Ag. En accord avec cette idée, plusieurs études ont mis en évidence que des protéines couplées à des CPP sont adressées vers les endosomes, mais pas le cytoplasme des cellules après leur internalisation (Tacken et al., 2008; Lundberg et al., 2003). Des expériences complémentaires de microscopie confocale pourraient s'avérer informatives pour répondre à cette question de l'échappement endosomal. Il serait également intéressant de tester la sensibilité de notre système à différents inhibiteurs afin de déterminer quelle voie de présentation croisée (voie vacuolaire ou dépendante de TAP) est mise en œuvre dans ce phénomène.

L'ensemble de nos résultats montre que des systèmes de ciblage des Ag intégrant des ligands des HS et d'autres ligands de récepteurs non ubiquitaires à la surface des CPA

permettent d'augmenter la présentation des Ag de manière synergique, dans la voie CMH I comme dans la voie CMH II. Or, la présentation des Ag par les CPA représente une étape clé dans le déclenchement des réponses immunitaires. Ces éléments permettent d'envisager l'utilisation de ce nouveau mode de ciblage des Ag pour augmenter la présentation et l'immunogénicité des Ag *in vivo*. Toutefois, l'expression ubiquitaire des HS (Park et al., 2000) pourrait représenter une limite majeure au potentiel applicatif de ce système. En effet, le ciblage de ces derniers pourrait provoquer une dissémination des Ag dans l'ensemble de l'organisme et une diminution de leur immunogénicité. Conformément à cette hypothèse, une expérience réalisée par Tacke et al., montre que la pré-incubation de CPP avec des cellules *in vitro* diminue la quantité de CPP disponible dans le surnageant, au profit d'une liaison non spécifique sur les cellules. Ce phénomène, qui n'a pas été mis en évidence avec un anticorps spécifique d'un déterminant de CPA, reflète la propension des CPP à se disperser de manière non spécifique (Tacke et al., 2008). Cette expérience n'explore pas l'effet de la présence d'un ligand d'HS sur la spécificité de liaison d'un ligand de récepteur ubiquitaire. Cependant, une étude montrant que la spécificité de ciblage des DC par des lentivirus liant DC SIGN est affectée négativement lorsque ceux-ci ont la capacité de lier les HS (Yang et al., 2008) laisse penser que les HS peuvent perturber la spécificité de ciblage d'un ligand d'un marqueur de CPA *in vivo*. Conformément à cette hypothèse, les auteurs de cette étude montrent que la capacité de ciblage spécifique des cellules dendritiques médiée par la reconnaissance de la molécule DC-SIGN par ces vecteurs peut être restaurée en créant des virus mutés déficients pour la capacité de liaison des HS. Dans ce contexte, l'utilisation potentielle des CPP a été restreinte à des approches *ex-vivo* consistant à charger des DC avec des peptides vaccinaux de manière optimisée, et de les réinjecter chez les individus (Tacke et al., 2007). De manière intéressante, nous avons observé que des complexes antigéniques dotés de la capacité de double ciblage des HS et de marqueurs de CPA (récepteurs Fc et molécule CMH II) lient préférentiellement les cellules CD19⁺, et très peu les cellules CD4⁺ et CD8⁺ qui sont dépourvues de ces marqueurs à l'état de repos. Ces données suggèrent que la capacité de liaison des HS pourrait ne pas altérer significativement la spécificité du ciblage des Ag par des ligands de molécules de surface des CPA. Cette hypothèse doit maintenant être évaluée *in vivo* à l'aide d'Ag marqués. D'ores et déjà, les premiers résultats d'immunogénicité que nous avons obtenus chez la souris montrent que le ciblage conjoint des HS et de la molécule CMH II permet d'accroître l'immunogénicité d'un Ag par rapport à un système de ciblage simple en absence d'adjuvant chez la souris. Le pouvoir immunogénique de différentes constructions doit maintenant être évalué de façon plus approfondie *in vivo* en présence ou en absence

d'adjuvant, afin de déterminer si leur utilisation s'avère intéressante ou si elles doivent être réservées à une utilisation *in vitro* pour l'amélioration du chargement des Ag sur les CPA.

L'ensemble de ces éléments font de ce nouveau procédé de ciblage de l'Ag un nouvel outil potentiel pour améliorer l'immunogénicité d'Ag d'intérêt en vaccination. Grâce à son effet « pro-immunogène », le recours à ce nouveau système pourrait permettre d'améliorer l'efficacité vaccinale. Il pourrait également permettre de diminuer les doses injectées, limiter le nombre d'injections de rappel à effectuer, et éventuellement de s'affranchir de l'utilisation d'adjuvants. Ce système de double ciblage comprenant un Ag associé à deux ligands de molécules de surface de cellules présentatrices d'Ag, dont un ligand d'HS et un second ligand d'une molécule de surface exprimée essentiellement sur les cellules présentatrices d'Ag représente un nouveau système d'adressage des Ag vers les CPA présentant des applications potentielles en vaccination a fait l'objet du dépôt d'un brevet.

Procédures expérimentales

1. Synthèse et purification des protéines et des peptides.

Les peptides utilisés dans cette étude ont été synthétisés chimiquement en utilisant la stratégie Fmoc / tert-butyl sur un synthétiseur Applied Biosystems 433A. 0,1 mmol de Fmoc-Asp (OtBu)-PAL-PEG-PS de résine ont réagit un excès 10 x de chaque acide aminé, en présence de dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole et diisopropyléthylamine / N-méthyl pyrrolidone. Les acides aminés Phe38 Tat et Thr39 de Tat 1-86 ont été remplacés par les résidus pseudoproline Fmoc-Phe-Thr, et les résidus cys-trityl ont été utilisés. Lorsque cela était nécessaire, biotinylation N-terminale a été effectuée à l'aide de 50µmole de résine, un excès de 5 fois de d-biotine (Sigma), dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole, et O-benzotriazole-N, N, N', N'-tétraméthyl-uronium-hexafluoro-phosphate et un excès de 20 fois de diisopropylethylamin, et N-méthyl pyrrolidone. Le clivage et la déprotection ont ensuite été réalisée en utilisant un mélange d'acide trifluoroacétique / triisopropylsilane / eau (9.5/0.25/0.25, v / v / v). Le matériau brut a été précipité deux fois avec de l'éther de méthyle à froid de tert-butyle et ensuite dissous dans l'acide acétique à 15%. Les peptides ont ensuite été purifiés par HPLC sur une colonne C18 Supelco. Les différents produits ont été caractérisés par spectrométrie de masse et leur pureté a été évaluée par HPLC. Ils ont enfin été lyophilisés et conservés à -20 ° C.

2. Immunisation des souris

Pour l'évaluation des réponses humorales, des groupes de six souris femelles BALB/c (Charles River, France) ont été immunisés deux fois, à deux semaines d'intervalle, par voie sous-cutanée à la base de la queue avec 100µl d'une solution de PBS contenant soit 0,51 ou 1,2nmole d'Ag. Des échantillons de sang ont été prélevés 14 ou 18 jours après la deuxième injection. Ces expériences ont été répétées deux fois.

Pour l'étude des réponses T, des groupes de six souris BALB/c femelles ont été immunisées deux fois à deux semaines d'intervalle avec Tat1-86 et ont reçu une troisième injection huit semaines plus tard. Les rates ont été prélevées deux semaines après la dernière injection pour les expériences d'ELISPOT.

Pour l'évaluation de la contribution des cellules T à l'effet autoadjuvant, 4 souris mâles C57BL/6 de la lignée Ly5.1 CD3ε ko, originaires de CDTA d'Orléans et 4 mâles de type

C57BL/6 de type sauvage (Charles River, France) ont été immunisés deux fois avec 50 µg de protéines Tat1-86, selon la procédure décrite ci-dessus.

3. Mesure des réponses immunitaires chez les animaux immunisés

3.1. Mesure des réponses anticorps par ELISA

Des plaques de microtitration (Nunc) ont été incubées une nuit à 4 ° C avec un tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4, contenant 10µg/mL des différents peptides utilisés pour les immunisations, une série de peptides chevauchants de 15 acides aminés Tat, recouvrant toute la longueur de la molécule Tat, ou la biotine couplée à la BSA. Les plaques ont ensuite été saturées avec 0,1 M de tampon phosphate, pH 7,4, contenant 0,3% de BSA. Chaque antisérum a ensuite été dilué en série dans le même tampon contenant 0,1% de BSA et incubé dans les puits une nuit à 4 ° C. La liaison des anticorps sériques a été évaluée en utilisant un anticorps de chèvre anti IgG de souris conjugué à la peroxydase (Interchim) et le substrat 2,2 '-azinobis (acide 3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonique) (Sigma). Les titres ont été définis comme la dilution du sérum donnant une valeur d'absorbance de 0,6 après 30 minutes d'incubation avec le substrat. Pour les analyses statistiques, un test de Mann Whitney a été utilisé. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

3.2. Analyse des réponses T par ELISPOT

Pour l'analyse des réponses T, des suspensions cellulaires ont été préparées à partir des rates des souris immunisées. Les globules rouges ont été lysés avec un tampon de Gey. Les cellules ont été lavées deux fois, comptées, et resuspendues dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, de la streptomycine et de la pénicilline et 100 µM de 2-βmercaptoéthanol. L'anticorps monoclonal anti-IL-4 BVD4-1D11 (BD Pharmingen) dilué à 0,5 mg/ml dans un tampon carbonate 0,1 M pH 9,6 a été immobilisé une nuit à 4°C sur des plaques 96 puits contenant des filtres de nitrocellulose (Millipore). Les plaques ont ensuite été lavées trois fois avec du milieu RPMI 1640 et saturées avec du milieu RPMI contenant 10% de SVF décomplémenté pendant 2 heures à 37 ° C. Les splénocytes ($0,9 \times 10^6$ cellules / puits) ont ensuite été ensemencés dans les plaques.

Pour réaliser la cartographie des épitopes T CD4 de Tat1-86, un mélange de quatorze peptides chevauchant de 15 acides aminés recouvrant la séquence de Tat1-86, ou chacun de

ces peptides individuellement ont été utilisés pour stimuler les splénocytes (concentration finale des peptides : 1.25 μ M).

Pour l'évaluation du transfert de l'effet d'autoadjuvant à des Ag modèles, les splénocytes ont été stimulés avec le peptide 92-106 issu de la toxine diphtérique. La Concanavaline A(ConA) (5 μ g/ml) a été utilisée comme contrôle positif, et un peptide contrôle ou le milieu de culture seul ont été utilisés comme contrôle négatif. Les splénocytes ont ainsi été stimulés une nuit à 37°C, dans une atmosphère contenant 7% de CO₂. Les plaques ont ensuite été lavées à six reprises avec une solution de PBS contenant 0,05% de Tween 20, et ont été incubées pendant 1h30 avec un l'anticorps biotinylé anti-IL-4 BVD6-24G2 ou l'anticorps anti-IFN- γ (BD Pharmingen). Après de nombreux lavages, les plaques ont ensuite été incubées pendant 1 h à température ambiante avec 50 μ L / puit de streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline (Roche Molecular Biochemicals). Les spots ont été révélés à l'aide des substrats BCIP (5-bromo-4 phosphate ,3-indolyl), et NBT (nitrobleu de tétrazolium) (Promega). Les spots (SFC : spot forming cell) ont été comptés en utilisant un lecteur ELISPOT (aide Diagnostika). Les résultats ont été exprimés en nombre de SFC/10⁶ splénocytes. Pour les analyses statistiques, un t test a été utilisé. Les valeurs de p <0,05 ont été considérées comme significatives.

4. Tests de liaison de Tat et de ses dérivés aux cellules

Les complexes immuns, ont été préalablement préparés quand cela était nécessaire en incubant pendant une nuit à 4 °C des séries de dilution de toxine alpha ou alpha37-57 en présence d'un anticorps polyclonal de lapin antitoxine alpha (10 nM ou 25 nM).

Des séries de dilutions de chaque Ag ont été incubées en présence de différent types de cellules (2.10⁵ splénocytes, 10⁵ cellules A20 ou A20 exprimant RF γ II, 10⁵ DC, 1,5.10⁵ Jaws, ou 10⁵ T1B2 par puits) pendant 30 min à 4 °C dans du tampon PBS complété avec 0,5 % de sérum albumine bovine (PBS/0,5% BSA). Les cellules ont été lavées trois fois et incubées en présence d'anticorps monoclonal murin spécifique de la région N-terminale de Tat couplé de façon covalente à la fluorescéine tel que décrit dans (Lecoq et al., 2008)(1 μ g/puits), d'anticorps polyclonal de lapin anti-toxine alpha (1 μ g/well) ou d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la fluorescéine. Après 30 min d'incubation à 4 °C, les cellules ont été lavées et analysées en FACS.

5. Tests de présentation antigénique

5.1. Présentation restreinte au CMH II

Cellules utilisées

- La lignée de lymphome B murin, dénommée A20, obtenue comme décrit dans (Kim et al., 1979), est disponible sous le n°ATCC TIB-208.
- Les lignées de lymphome B, A20, dépourvues ou exprimant RFcγII, sont décrites dans (Amigorena et al., 1992).
- Deux hybridomes de cellules T spécifiques de la toxine alpha dénommés T1C9 et T1B2 ont été obtenus comme décrit dans (Maillère et al., 1995) et (Maillère et al., 1993b), respectivement.
- Les splénocytes de souris ont été isolés à partir de rates de souris. Pour cela, les animaux ont été sacrifiés puis les rates ont été prélevées 5 stérilement. Les rates ont été dilacérées et les globules rouges ont été lysés à 4°C à l'aide d'un tampon de Gey. Les splénocytes ont été récupérés après 10 minutes de centrifugation à 4°C.
- Les cellules dendritiques ont été isolées à partir de splénocytes de souris en utilisant des microbilles MACS, selon le protocole du fabricant (MILTENYI BIOTEC). Brièvement, les rates ont été incubées en présence de collagénase D (2 mg/ml) pendant 30 minutes à 37 °C en présence d'un excès d'IgG de souris nonspécifiques. Les cellules ont ensuite été incubées à 4 °C. Quinze minutes plus tard, des microbilles antiCD11c ont été ajoutées et incubées pendant 15 minutes à 6-8 °C. Les splénocytes ont été lavés, centrifugés et passés au travers de colonnes magnétique.L'enrichissement a été évalué par analyse en FACS à l'aide de quatre anticorps anti-CD (antiCD4-FITC, anti-CD19-PE, anti-CD11c-FITC, et anti-IA/IE-PE, BECTONDICKINSON). La pureté était supérieure à 95%.
- Les lymphocytes B ont été isolés en utilisant des microbilles antiCD19, selon un protocole similaire.

Toutes les expériences ont été réalisées à l'aide de DCCM1 (BIOLOGICAL INDUSTRIES) comme milieu de culture synthétique. Des dilutions en série des différents Ag ont été incubées dans les puits de micro-culture (NUNC) pendant 3 heures à 37 °C en présence, de cellules A20 dépourvues ou exprimant RFcγII ($5 \cdot 10^4$ cellules par puits), de splénocytes ($5 \cdot 10^5$ /puits) ou de DC ($3 \cdot 10^4$ /puits). Les hybridomes T1C9 ou T1B2 ont ensuite été ajoutés à

raison de 5.10^4 /puits et les cellules ont été cultivées pendant 24 h à 37 °C. Le niveau de stimulation T qui se traduit par une sécrétion d'IL-2 a été évalué par prélèvement des surnageants de culture et mesure de la présence d'IL-2 à l'aide d'une lignée de cellules T cytotoxiques (CTL) dont la croissance dépend de cette interleukine telle que décrite dans (Gillis et Smith, 1977). La prolifération de la lignée CTL-IL-2 dépendante a été évaluée par mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée (5 Ci/mmol).

5.1. Présentation croisée

Cellules utilisées

- La lignée de cellules dendritiques murine JawsII est disponible sous le n° ATCC CRL-1194
- Les splénocytes de souris de la lignée OT-1 ont été obtenus selon le protocole décrit au paragraphe 5.1. Ces souris expriment un TCR transgénique Tcra-V2 / Tcrb-V5 spécifique des résidus 257-264 de l'ovalbumine (de séquence SIINFEKL) présenté dans le contexte H2K^b. Elles sont disponibles au Jackson laboratory sous la référence C57BL/6-Tg(TcraTcrb) 1100Mjb/J 003831.

Des dilutions en série des différents Ag ont été incubées dans les puits de micro-culture (NUNC) pendant 5 heures à 37 °C en présence, de cellules Jaws II (3.10^4 /puits) en milieu IMDM complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% pénicilline/streptomycine, 1% L-glutamine, 0.1% β mercaptoéthanol, et 5ng/mL de GMCSF recombinant murin. Après 5 heures d'incubation, les cellules ont été lavées et fixées avec du glutaraldéhyde à 0,008% et des splénocytes de souris de la lignée OT-1 (90 000 cellules / puits) ont été ajoutés. Après 3 jours d'incubation dans du milieu RPMI complété avec 10%SVF, 1% pénicilline/streptomycine, 1% L-glutamine, 0.1% β mercaptoéthanol, la prolifération des splénocytes a été mesurée par mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée (5 Ci/mmol).

6. Test de maturation des DC

Des séries de dilutions de chaque Ag ont été incubées en présence de 2.10^5 cellules JawsII, pendant 24 heures à 37°C dans du milieu IMDM complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% pénicilline/streptomycine, 1% L-glutamine, 0.1% β mercaptoéthanol, et 5ng/mL de

GMCSF recombinant murin. Les cellules ont été lavées trois fois et incubées pendant 30 minutes à 4°C avec un anticorps monoclonal anti-CD80 ou anti-CD86 couplé au FITC. Après 30 min d'incubation à 4 °C, les cellules ont été lavées et analysées en FACS.

Bibliographie

- Accapezzato, D., Visco, V., Francavilla, V., Molette, C., Donato, T., Paroli, M., Mondelli, M. U., Doria, M., Torrì, M. R., et Barnaba, V. (2005). Chloroquine enhances human CD8⁺ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J. Exp. Med* 202, 817-828.
- Ackerman, A. L., Giodini, A., et Cresswell, P. (2006). A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25, 607-617.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampé, R., et Cresswell, P. (2005). Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Immunol* 6, 107-113.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampé, R., et Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 12889-12894.
- Ahmed, G. Y., Balkhy, H. H., Bafaqeer, S., Al-Jasir, B., et Althaqafi, A. (2011). Acceptance and Adverse Effects of H1N1 Vaccinations Among a Cohort of National Guard Health Care Workers during the 2009 Hajj Season. *BMC Res Notes* 4, 61.
- Albini, A., Benelli, R., Presta, M., Rusnati, M., Ziche, M., Rubartelli, A., Paglialunga, G., Bussolino, F., et Noonan, D. (1996a). HIV-tat protein is a heparin-binding angiogenic growth factor. *Oncogene* 12, 289-297.
- Albini, A., Soldi, R., Giunciuglio, D., Giraudo, E., Benelli, R., Primo, L., Noonan, D., Salio, M., Camussi, G., Rockl, W., et al. (1996b). The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat. Med* 2, 1371-1375.
- Albini, A., Benelli, R., Giunciuglio, D., Cai, T., Mariani, G., Ferrini, S., et Noonan, D. M. (1998). Identification of a Novel Domain of HIV Tat Involved in Monocyte Chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry* 273, 15895 -15900.
- Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J. R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J. G., Webster, P., Sautes, C., Mellman, I., et Fridman, W. H. (1992). Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 256, 1808-1812.
- Amigorena, S., et Savina, A. (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 22, 109-117.
- Ansel, K. M., Lee, D. U., et Rao, A. (2003). An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat. Immunol* 4, 616-623.
- Apple, R. J., Domen, P. L., Muckerheide, A., et Michael, J. G. (1988). Cationization of protein antigens. IV. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells. *J. Immunol* 140, 3290-3295.
- Bachmann, M. F., et Jennings, G. T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol* 10, 787-796.
- Bangari, D. S., et Mittal, S. K. (2006). Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* 24, 849-862.

Batchu, R. B., Moreno, A. M., Szmania, S. M., Bennett, G., Spagnoli, G. C., Ponnazhagan, S., Barlogie, B., Tricot, G., et van Rhee, F. (2005). Protein Transduction of Dendritic Cells for NY-ESO-1-Based Immunotherapy of Myeloma. *Cancer Research* 65, 10041 -10049.

Bazin, H. (2008). *L'Histoire des vaccinations* (John Libbey Eurotext).

Bennett, S. R. M., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. A. P., et Heath, W. R. (1997). Induction of a CD8+ Cytotoxic T Lymphocyte Response by Cross-priming Requires Cognate CD4+ T Cell Help. *The Journal of Experimental Medicine* 186, 65 -70.

Berche, P. (2007). *Une histoire des microbes* (John Libbey Eurotext).

Bernasconi, N. L., Traggiai, E., et Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298, 2199-2202.

Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., et Zako, M. (1999). FUNCTIONS OF CELL SURFACE HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 729-777.

Beuneu, H., Garcia, Z., et Bousso, P. (2006). Cutting edge: cognate CD4 help promotes recruitment of antigen-specific CD8 T cells around dendritic cells. *J. Immunol* 177, 1406-1410.

Bishop, J. R., Schuksz, M., et Esko, J. D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446, 1030-1037.

Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., et Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.

Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S.-I., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T. M., et Steinman, R. M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med* 199, 815-824.

Bousso, P., et Robey, E. (2003). Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat. Immunol* 4, 579-585.

Bozzacco, L., Trumpfheller, C., Siegal, F. P., Mehandru, S., Markowitz, M., Carrington, M., Nussenzweig, M. C., Piperno, A. G., et Steinman, R. M. (2007). DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 1289-1294.

Brooks, N. A., Pouniotis, D. S., Tang, C.-K., Apostolopoulos, V., et Pietersz, G. A. (2010). Cell-penetrating peptides: Application in vaccine delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1805, 25-34.

Buonaguro, L., Barillari, G., Chang, H. K., Bohan, C. A., Kao, V., Morgan, R., Gallo, R. C., et Ensoli, B. (1992). Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J. Virol.* 66, 7159-7167.

Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P. A., et Kurts, C. (2007). Distinct pathways of

antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-616.

Cahill, K. (2010). Cell-penetrating peptides, electroporation and drug delivery. *IET Syst Biol* 4, 367-378.

Campbell, D. J., Kim, C. H., et Butcher, E. C. (2001). Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nat. Immunol* 2, 876-881.

Campbell, G. R., et Loret, E. P. (2009). What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine? *Retrovirology* 6, 50.

Carayanniotis, G., et Barber, B. H. (1987). Adjuvant-free IgG responses induced with antigen coupled to antibodies against class II MHC. *Nature* 327, 59-61.

Carbone, F. R., et Bevan, M. J. (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J. Exp. Med* 171, 377-387.

Casadevall, A., Dadachova, E., et Pirofski, L.-anne (2004). Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Micro* 2, 695-703.

Celli, S., Garcia, Z., Beuneu, H., et Bousso, P. (2008). Decoding the dynamics of T cell-dendritic cell interactions in vivo. *Immunol. Rev* 221, 182-187.

Cemerski, S., et Shaw, A. (2006). Immune synapses in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol* 18, 298-304.

Chakupurakal, G., Onion, D., Cobbold, M., Mautner, V., et Moss, P. A. H. (2010). Adenovirus vector-specific T cells demonstrate a unique memory phenotype with high proliferative potential and coexpression of CCR5 and integrin alpha4beta7. *AIDS* 24, 205-210.

Chang, H. C., Samaniego, F., Nair, B. C., Buonaguro, L., et Ensoli, B. (1997). HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS* 11, 1421-1431.

Chiu, Y.-L., Ho, C. K., Saha, N., Schwer, B., Shuman, S., et Rana, T. M. (2002). Tat Stimulates Cotranscriptional Capping of HIV mRNA. *Molecular Cell* 10, 585-597.

Chudasama, S. L., Espinasse, B., Hwang, F., Qi, R., Joglekar, M., Afonina, G., Wiesner, M. R., Welsby, I. J., Ortel, T., et Arepally, G. M. (2010). Heparin modifies the immunogenicity of positively-charged proteins. *Blood*, blood-2010-06-292938.

Coffman, R. L., Sher, A., et Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33, 492-503.

Cyster, J. G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol* 23, 127-159.

Dandekar, D. H., Ganesh, K. N., et Mitra, D. (2004). HIV-1 Tat directly binds to NFkappaB enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression. *Nucleic Acids Res* 32, 1270-1278.

- Dannull, J., Su, Z., Rizzieri, D., Yang, B. K., Coleman, D., Yancey, D., Zhang, A., Dahm, P., Chao, N., Gilboa, E., et al. (2005). Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 115, 3623-3633.
- Davey, S. (2009). State of the world's vaccines and immunization (World Health Organization).
- Dayton, A. I., Sodroski, J. G., Rosen, C. A., Goh, W. C., et Haseltine, W. A. (1986). The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* 44, 941-947.
- De Groot, A. S., McMurry, J., et Moise, L. (2008). Prediction of immunogenicity: in silico paradigms, ex vivo and in vivo correlates. *Current Opinion in Pharmacology* 8, 620-626.
- Deenick, E. K., Hasbold, J., et Hodgkin, P. D. (2005). Decision criteria for resolving isotype switching conflicts by B cells. *Eur. J. Immunol* 35, 2949-2955.
- Delamarre, L., Couture, R., Mellman, I., et Trombetta, E. S. (2006). Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J. Exp. Med* 203, 2049-2055.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., et Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630-1634.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J., et al. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17, 353-362.
- Dintzis, R. Z., Middleton, M. H., et Dintzis, H. M. (1983). Studies on the immunogenicity and tolerogenicity of T-independent antigens. *J. Immunol* 131, 2196-2203.
- Dohlman, J. G., Pillion, D. J., Rokeach, L. A., et Ramprasad, M. P. (1991). Identification of macrophage cell-surface binding sites for cationized bovine serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 181, 787-796.
- Ekström, N., Ahman, H., Verho, J., Jokinen, J., Väkeväinen, M., Kilpi, T., et Käyhty, H. (2005). Kinetics and avidity of antibodies evoked by heptavalent pneumococcal conjugate vaccines PncCRM and PncOMPC in the Finnish Otitis Media Vaccine Trial. *Infect. Immun* 73, 369-377.
- Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G., Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R. A., Wingfield, P., et Gallo, R. C. (1993). Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* 67, 277-287.
- Ensoli, B., Gendelman, R., Markham, P., Fiorelli, V., Colombini, S., Raffeld, M., Cafaro, A., Chang, H. K., Brady, J. N., et Gallo, R. C. (1994). Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature* 371, 674-680.
- Fanales-Belasio, E., Moretti, S., Nappi, F., Barillari, G., Micheletti, F., Cafaro, A., et Ensoli, B. (2002). Native HIV-1 Tat Protein Targets Monocyte-Derived Dendritic Cells and Enhances

Their Maturation, Function, and Antigen-Specific T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 168, 197-206.

Fenner, F. (1988). Smallpox and its eradication (World Health Organization).

Finn, O. J. (2003). Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat. Rev. Immunol* 3, 630-641.

Flehmgig, B., Staedele, H., Xueref, C., Vidor, E., Zuckerman, J., et Zuckerman, A. (1997). Early appearance of neutralizing antibodies after vaccination with an inactivated hepatitis A vaccine. *J. Infect* 35, 37-40.

Fluckiger, A. C., Li, Z., Kato, R. M., Wahl, M. I., Ochs, H. D., Longnecker, R., Kinet, J. P., Witte, O. N., Scharenberg, A. M., et Rawlings, D. J. (1998). Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *EMBO J* 17, 1973-1985.

Frankel, A. D., et Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189-1193.

Gans, H. A., Maldonado, Y., Yasukawa, L. L., Beeler, J., Audet, S., Rinki, M. M., DeHovitz, R., et Arvin, A. M. (1999). IL-12, IFN-gamma, and T cell proliferation to measles in immunized infants. *J. Immunol* 162, 5569-5575.

Gavioli, R., Cellini, S., Castaldello, A., Voltan, R., Gallerani, E., Gagliardoni, F., Fortini, C., Cofano, E. B., Triulzi, C., Cafaro, A., et al. (2008). The Tat protein broadens T cell responses directed to the HIV-1 antigens Gag and Env: implications for the design of new vaccination strategies against AIDS. *Vaccine* 26, 727-737.

Germain, R. N. (2010). Vaccines and the Future of Human Immunology. *Immunity* 33, 441-450.

Gillis, S., et Smith, K. A. (1977). Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* 268, 154-156.

Girard, M. P., Osmanov, S. K., et Kieny, M. P. (2006). A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* 24, 4062-4081.

Guérin, N. (2007). Histoire de la vaccination □ : de l'empirisme aux vaccins recombinants. *La Revue de Médecine Interne* 28, 3-8.

Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., et Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M., et Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med* 194, 769-779.

Heit, A., Huster, K. M., Schmitz, F., Schiemann, M., Busch, D. H., et Wagner, H. (2004). CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J. Immunol* 172, 1501-1507.

Herce, H. D., Garcia, A. E., Litt, J., Kane, R. S., Martin, P., Enrique, N., Rebolledo, A., et Milesi, V. (2009). Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell penetrating peptides. 0910.1736.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., et Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.

Intlekofer, A. M., Takemoto, N., Wherry, E. J., Longworth, S. A., Northrup, J. T., Palanivel, V. R., Mullen, A. C., Gasink, C. R., Kaech, S. M., Miller, J. D., et al. (2005). Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol* 6, 1236-1244.

Izmailova, E., Bertley, F. M. N., Huang, Q., Makori, N., Miller, C. J., Young, R. A., et Aldovini, A. (2003). HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat. Med* 9, 191-197.

Jäger, A., et Kuchroo, V. K. (2010). Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand. J. Immunol* 72, 173-184.

Janeway, C. (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease* (Garland Science).

Johnson, R. M., Harrison, S. D., et Maclean, D. (2011). Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods Mol. Biol* 683, 535-551.

Johri, M. K., Mishra, R., Chhatbar, C., Unni, S. K., et Singh, S. K. (2011). Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther* 11, 269-283.

Joura, E. A., Leodolter, S., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Koutsky, L. A., Garland, S. M., Harper, D. M., Tang, G. W., et Ferris, D. G. (2007). Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *The Lancet* 369, 1693-1702.

Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., et al. (2002). In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-220.

Kanazawa, S., Okamoto, T., et Peterlin, B. M. (2000). Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity* 12, 61-70.

Kaufmann, S. H. E. (2006). Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol* 6, 699-704.

Kim, D. T., Mitchell, D. J., Brockstedt, D. G., Fong, L., Nolan, G. P., Fathman, C. G., Engleman, E. G., et Rothbard, J. B. (1997). Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J. Immunol* 159, 1666-1668.

Kim, K. J., Kanellopoulos-Langevin, C., Merwin, R. M., Sachs, D. H., et Asofsky, R. (1979). Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J.*

Immunol 122, 549-554.

Kittiworakarn, J., Lecoq, A., Moine, G., Thai, R., Lajeunesse, E., Drevet, P., Vidaud, C., Ménez, A., et Léonetti, M. (2006). HIV-1 Tat raises an adjuvant-free humoral immune response controlled by its core region and its ability to form cysteine-mediated oligomers. *J. Biol. Chem* 281, 3105-3115.

Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C., et von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol* 6, 1219-1227.

Kreuger, J., Spillmann, D., Li, J.-ping, et Lindahl, U. (2006). Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J. Cell Biol* 174, 323-327.

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

Lanzavecchia, A., et Sallusto, F. (2009). Human B cell memory. *Current Opinion in Immunology* 21, 298-304.

Lanzavecchia, A., et Sallusto, F. (2007). Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Current Opinion in Immunology* 19, 268-274.

Leclerc, C. (2007). L'apport des nouvelles technologies en vaccinologie. *Médecine/Sciences* 23, 386-390.

Lecoq, A., Moine, G., Bellanger, L., Drevet, P., Thai, R., Lajeunesse, E., Ménez, A., et Léonetti, M. (2008). Increasing the humoral immunogenic properties of the HIV-1 Tat protein using a ligand-stabilizing strategy. *Vaccine* 26, 2615-2626.

Léonetti, M., Gadzinski, A., et Moine, G. (2010). Cell surface heparan sulfate proteoglycans influence MHC class II-restricted antigen presentation. *J. Immunol* 185, 3847-3856.

Levine, M. M., Dougan, G., et Good, M. F. (2009). *New Generation Vaccines* (Informa Healthcare).

Li, S., Locke, E., Bruder, J., Clarke, D., Doolan, D. L., Havenga, M. J. E., Hill, A. V. S., Liljestrom, P., Monath, T. P., Naim, H. Y., et al. (2007). Viral vectors for malaria vaccine development. *Vaccine* 25, 2567-2574.

Lizée, G., Basha, G., Tiong, J., Julien, J.-P., Tian, M., Biron, K. E., et Jefferies, W. A. (2003). Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol* 4, 1065-1073.

Loureiro, S., Ren, J., Phapugrangkul, P., Colaco, C. A., Bailey, C. R., Shelton, H., Molesti, E., Temperton, N. J., Barclay, W. S., et Jones, I. M. (2010). Adjuvant free immunisation with Hemagglutinin-Fc fusion proteins as an approach to influenza vaccines. *J Virol*.

Lucas, A. H., et Reason, D. C. (1999). Polysaccharide vaccines as probes of antibody repertoires in man. *Immunol. Rev* 171, 89-104.

Lundberg, M., Wikström, S., et Johansson, M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis

of protein transduction domains. *Mol. Ther* 8, 143-150.

MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol* 12, 117-139.

MacLennan, I. C. M., Toellner, K.-M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M. C., et Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev* 194, 8-18.

Maillère, B., Cotton, J., Mourier, G., Léonetti, M., Leroy, S., et Ménez, A. (1993). Role of thiols in the presentation of a snake toxin to murine T cells. *J. Immunol* 150, 5270-5280.

Maillère, B., Mourier, G., Cotton, J., Hervé, M., Leroy, S., et Ménez, A. (1995). Probing immunogenicity of a T cell epitope by L-alanine and D-amino acid scanning. *Mol. Immunol* 32, 1073-1080.

Maldonado, R. A., Irvine, D. J., Schreiber, R., et Glimcher, L. H. (2004). A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* 431, 527-532.

Mamani-Matsuda, M., Cosma, A., Weller, S., Faili, A., Staib, C., Garçon, L., Hermine, O., Beyne-Rauzy, O., Fieschi, C., Pers, J.-O., et al. (2008). The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. *Blood* 111, 4653-4659.

Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M. A., Hieshima, K., Springer, T. A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., et al. (2001). Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Invest* 108, 871-878.

Marasco, W. A., et Sui, J. (2007). The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol* 25, 1421-1434.

Maruyama, M., Lam, K. P., et Rajewsky, K. (2000). Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 407, 636-642.

Mayol, K., Munier, S., Beck, A., Verrier, B., et Guillon, C. (2007). Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: Inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity. *Vaccine* 25, 6047-6060.

Mazo, I. B., Honeczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L. L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K., Xia, L., McEver, R. P., Koni, P. A., et al. (2005). Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells. *Immunity* 22, 259-270.

McKee, A. S., Munks, M. W., et Marrack, P. (2007). How Do Adjuvants Work? Important Considerations for New Generation Adjuvants. *Immunity* 27, 687-690.

Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I., et Cahalan, M. D. (2002). Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296, 1869-1873.

Minges Wols, H. A., Underhill, G. H., Kansas, G. S., et Witte, P. L. (2002). The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J. Immunol* 169, 4213-4221.

Mitsui, H., Inozume, T., Kitamura, R., Shibagaki, N., et Shimada, S. (2006). Polyarginine-mediated protein delivery to dendritic cells presents antigen more efficiently onto MHC class

I and class II and elicits superior antitumor immunity. *J. Invest. Dermatol* 126, 1804-1812.

Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gómez-Moutón, C., Lanzavecchia, A., Martínez-A, C., Mañes, S., et Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat. Immunol* 6, 465-471.

Mond, J. J., Vos, Q., Lees, A., et Snapper, C. M. (1995). T cell independent antigens. *Curr. Opin. Immunol* 7, 349-354.

Moore, M. W., Carbone, F. R., et Bevan, M. J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54, 777-785.

Mora, J. R., et von Andrian, U. H. (2006). T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol* 27, 235-243.

Mora, J. R., Bono, M. R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L. L., Roseblatt, M., et Von Andrian, U. H. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424, 88-93.

Mora, J. R., Cheng, G., Picarella, D., Briskin, M., Buchanan, N., et von Andrian, U. H. (2005). Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J. Exp. Med* 201, 303-316.

Moser, M., et Leo, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine* 28 Suppl 3, C2-13.

Moulin, A. M. (1996). *L'aventure de la vaccination* (Fayard).

Moulton, V. R., et Farber, D. L. (2006). Committed to memory: lineage choices for activated T cells. *Trends Immunol* 27, 261-267.

Muckerheide, A., Apple, R. J., Pesce, A. J., et Michael, J. G. (1987). Cationization of protein antigens. I. Alteration of immunogenic properties. *J. Immunol* 138, 833-837.

Muniz, L., Egloff, S., Ughy, B., Jády, B. E., et Kiss, T. (2010). Controlling Cellular P-TEFb Activity by the HIV-1 Transcriptional Transactivator Tat. *PLoS Pathog* 6.

Mutsaers, S. E., et Papadimitriou, J. M. (1988). Surface charge of macrophages and their interaction with charged particles. *J. Leukoc. Biol* 44, 17-26.

Nagata, S., et Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.

Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J. W., Reits, E., Janssen, L., et Neefjes, J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434, 83-88.

Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G., et Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol* 27, 280-288.

Palucka, K., Banchereau, J., et Mellman, I. (2010). Designing Vaccines Based on Biology of Human Dendritic Cell Subsets. *Immunity* 33, 464-478.

- Pape, K. A., Catron, D. M., Itano, A. A., et Jenkins, M. K. (2007). The Humoral Immune Response Is Initiated in Lymph Nodes by B Cells that Acquire Soluble Antigen Directly in the Follicles. *Immunity* 26, 491-502.
- Paramithiotis, E., et Cooper, M. D. (1997). Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 208 -212.
- Park, P. W., Reizes, O., et Bernfield, M. (2000). Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans: Selective Regulators of Ligand-Receptor Encounters. *Journal of Biological Chemistry* 275, 29923 -29926.
- Paul, W. E. (2008). *Fundamental immunology* (Lippincott Williams & Wilkins).
- Plénat, T., Deshayes, S., Boichot, S., Milhiet, P. E., Cole, R. B., Heitz, F., et Le Grimmeléc, C. (2004). Interaction of primary amphipathic cell-penetrating peptides with phospholipid-supported monolayers. *Langmuir* 20, 9255-9261.
- Plotkin, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nat Med*.
- Plotkin, S. A., Orenstein, W. A., et Offit, P. A. (2008). *Vaccines* (Elsevier Health Sciences).
- Ptak, R. G., Fu, W., Sanders-Bear, B. E., Dickerson, J. E., Pinney, J. W., Robertson, D. L., Rozanov, M. N., Katz, K. S., Maglott, D. R., Pruitt, K. D., et al. (2008). Short Communication: Cataloguing the HIV Type 1 Human Protein Interaction Network. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24, 1497-1502.
- Ramakrishna, V., Treml, J. F., Vitale, L., Connolly, J. E., O'Neill, T., Smith, P. A., Jones, C. L., He, L.-Z., Goldstein, J., Wallace, P. K., et al. (2004). Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. *J. Immunol* 172, 2845-2852.
- Rana, T. M., et Jeang, K.-T. (1999). Biochemical and Functional Interactions between HIV-1 Tat Protein and TAR RNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 365, 175-185.
- Rappuoli, R. (2000). Reverse vaccinology. *Curr. Opin. Microbiol* 3, 445-450.
- Rappuoli, R. (2007). Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nat Biotech* 25, 1361-1366.
- Rayne, F., Debaisieux, S., Bonhoure, A., et Beaumelle, B. (2010). HIV-1 Tat is unconventionally secreted through the plasma membrane. *Cell Biol. Int* 34, 409-413.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (1999). Fcγ Receptor-mediated Induction of Dendritic Cell Maturation and Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization. *The Journal of Experimental Medicine* 189, 371 -380.
- Reks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Prensri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., et al. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *N Engl J Med* 361, 2209-2220.

- Riedel, S. (2005a). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 18, 21-25.
- Riedel, S. (2005b). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 18, 21-25.
- Roberts, D. M., Nanda, A., Havenga, M. J. E., Abbink, P., Lynch, D. M., Ewald, B. A., Liu, J., Thorner, A. R., Swanson, P. E., Gorgone, D. A., et al. (2006). Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* 441, 239-243.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., et Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol* 1, 362-368.
- Rusnati, M., Tulipano, G., Urbinati, C., Tanghetti, E., Giuliani, R., Giacca, M., Ciomei, M., Corallini, A., et Presta, M. (1998). The basic domain in HIV-1 Tat protein as a target for polysulfonated heparin-mimicking extracellular Tat antagonists. *J. Biol. Chem* 273, 16027-16037.
- Rusnati, M., Coltrini, D., Oreste, P., Zoppetti, G., Albini, A., Noonan, D., di Fagagna, F., d'Adda, Giacca, M., et Presta, M. (1997). Interaction of HIV-1 Tat Protein with Heparin. *Journal of Biological Chemistry* 272, 11313 -11320.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., et Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., Lennon-Duménil, A.-M., Seabra, M. C., Raposo, G., et Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205-218.
- Schjetne, K. W., Fredriksen, A. B., et Bogen, B. (2007). Delivery of antigen to CD40 induces protective immune responses against tumors. *J. Immunol* 178, 4169-4176.
- Schutze-Redelmeier, M., Gournier, H., Garcia-Pons, F., Moussa, M., Joliot, A., Volovitch, M., Prochiantz, A., et Lemonnier, F. (1996). Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by *Drosophila antennapedia* homeodomain primes cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of Immunology* 157, 650 -655.
- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K., Kundig, T., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P., Thompson, C., et Mak, T. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609 -612.
- Shen, L., et Rock, K. L. (2004). Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 3035-3040.
- Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M., et Rock, K. L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155-165.
- Shibagaki, N., et Udey, M. C. (2002). Dendritic Cells Transduced with Protein Antigens

Induce Cytotoxic Lymphocytes and Elicit Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology* *168*, 2393 -2401.

Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., et Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* *284*, 1835-1837.

Snider, D. P., et Segal, D. M. (1989). Efficiency of antigen presentation after antigen targeting to surface IgD, IgM, MHC, Fc gamma RII, and B220 molecules on murine splenic B cells. *J. Immunol* *143*, 59-65.

Steinbrook, R. (2007). One step forward, two steps back--will there ever be an AIDS vaccine? *N. Engl. J. Med* *357*, 2653-2655.

Strebel, K. (2003). Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS* *17 Suppl 4*, S25-34.

Sullivan, B. M., Juedes, A., Szabo, S. J., von Herrath, M., et Glimcher, L. H. (2003). Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *100*, 15818-15823.

Tacken, P. J., de Vries, I. J. M., Gijzen, K., Joosten, B., Wu, D., Rother, R. P., Faas, S. J., Punt, C. J. A., Torensma, R., Adema, G. J., et al. (2005). Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* *106*, 1278-1285.

Tacken, P. J., Joosten, B., Reddy, A., Wu, D., Eek, A., Laverman, P., Kretz-Rommel, A., Adema, G. J., Torensma, R., et Figdor, C. G. (2008). No Advantage of Cell-Penetrating Peptides over Receptor-Specific Antibodies in Targeting Antigen to Human Dendritic Cells for Cross-Presentation. *The Journal of Immunology* *180*, 7687 -7696.

Tacken, P. J., de Vries, I. J. M., Torensma, R., et Figdor, C. G. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* *7*, 790-802.

Tahirov, T. H., Babayeva, N. D., Varzavand, K., Cooper, J. J., Sedore, S. C., et Price, D. H. (2010). Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* *465*, 747-751.

Thai, R., Moine, G., Desmadril, M., Servent, D., Tarride, J.-L., Ménez, A., et Léonetti, M. (2004). Antigen stability controls antigen presentation. *J. Biol. Chem* *279*, 50257-50266.

Timens, W., Boes, A., Rozeboom-Uiterwijk, T., et Poppema, S. (1989). Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response. *J. Immunol* *143*, 3200-3206.

Tobian, A. A. R., Harding, C. V., et Canaday, D. H. (2005). Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes. *J. Immunol* *174*, 5209-5214.

Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R. E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., et al. (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* *123*, 157-170.

- Trapani, J. A., Jans, D. A., Jans, P. J., Smyth, M. J., Browne, K. A., et Sutton, V. R. (1998). Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *J. Biol. Chem* 273, 27934-27938.
- Tritto, E., Mosca, F., et De Gregorio, E. (2009). Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 27, 3331-3334.
- Trotter, C. L., Andrews, N. J., Kaczmarek, E. B., Miller, E., et Ramsay, M. E. (2004). Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet* 364, 365-367.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., et Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 Tat Requires Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 276, 3254 -3261.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspord, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J. W., Pascual, V., et al. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev* 219, 118-142.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Schmitt, N., Ni, L., Flamar, A.-L., Zurawski, S., Zurawski, G., Palucka, K., Banchereau, J., et Oh, S. (2011). Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines. *Seminars in Immunology* 23, 21-27.
- Valladeau, J., et Saeland, S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol* 17, 273-283.
- Vandenbergh, L. H., Wang, L., Somanathan, S., Zhi, Y., Figueredo, J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Desai, R. A., Chen, C. S., Johnston, J., et al. (2006). Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. *Nat Med* 12, 967-971.
- Veschambre, P., Roisin, A., et Jalinot, P. (1997). Biochemical and functional interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator with the general transcription factor TFIIB. *J. Gen. Virol* 78 (Pt 9), 2235-2245.
- Vingert, B., Adotevi, O., Patin, D., Jung, S., Shrikant, P., Freyburger, L., Eppolito, C., Sapozhnikov, A., Amessou, M., Quintin-Colonna, F., et al. (2006). The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunol* 36, 1124-1135.
- Vinuesa, C. G., Tangye, S. G., Moser, B., et Mackay, C. R. (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol* 5, 853-865.
- Vyas, J. M., Van der Veen, A. G., et Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8, 607-618.
- Wang, H., Griffiths, M. N., Burton, D. R., et Ghazal, P. (2000). Rapid antibody responses by low-dose, single-step, dendritic cell-targeted immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 847-852.
- Wassef, N. M., et Plaeger, S. F. (juillet). Cytokines as adjuvants for HIV DNA vaccines. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2, 229-240.

- Weinberger, L. S., Burnett, J. C., Toettcher, J. E., Arkin, A. P., et Schaffer, D. V. (2005). Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell* 122, 169-182.
- Weldon, W. C., Wang, B.-Z., Martin, M. P., Koutsonanos, D. G., Skountzou, I., et Compans, R. W. (2010). Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin. *PLoS ONE* 5.
- Wells, A. D., Gudmundsdottir, H., et Turka, L. A. (1997). Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* 100, 3173-3183.
- Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K. M., et Krammer, P. H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375, 497-500.
- Wherry, E. J., Teichgräber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., von Andrian, U. H., et Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol* 4, 225-234.
- Whittle, H. C., Maine, N., Pilkington, J., Mendy, M., Fortuin, M., Bunn, J., Allison, L., Howard, C., et Hall, A. (1995). Long-term efficacy of continuing hepatitis B vaccination in infancy in two Gambian villages. *Lancet* 345, 1089-1092.
- Wilson, C. B., et Marcuse, E. K. (2001). Vaccine safety-vaccine benefits: science and the public's perception. *Nat Rev Immunol* 1, 160-165.
- Yang, L., Yang, H., Rideout, K., Cho, T., Joo, K. il, Ziegler, L., Elliot, A., Walls, A., Yu, D., Baltimore, D., et al. (2008). Engineered lentivector targeting of dendritic cells for in vivo immunization. *Nat Biotech* 26, 326-334.
- Zaman, M., Skwarczynski, M., Malcolm, J. M., Urbani, C. N., Jia, Z., Batzloff, M. R., Good, M. F., Monteiro, M. J., et Toth, I. (2010). Self-adjuvanting polyacrylic nanoparticulate delivery system for group A streptococcus (GAS) vaccine. *Nanomedicine*.
- Zandvoort, A., et Timens, W. (2002). The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin. Exp. Immunol* 130, 4-11.
- Zaph, C., Uzonna, J., Beverley, S. M., et Scott, P. (2004). Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat. Med* 10, 1104-1110.
- Zeng, W., Eriksson, E. M., Lew, A., et Jackson, D. C. Lipidation of intact proteins produces highly immunogenic vaccine candidates. *Molecular Immunology In Press, Corrected Proof*.
- Zhao, J., Voltan, R., Peng, B., Davis-Warren, A., Kalyanaraman, V. S., Alvord, W. G., Aldrich, K., Bernasconi, D., Buttò, S., Cafaro, A., et al. (2005). Enhanced cellular immunity to SIV Gag following co-administration of adenoviruses encoding wild-type or mutant HIV Tat and SIV Gag. *Virology* 342, 1-12.

Zhou, J., Lottenbach, K. R., Barenkamp, S. J., et Reason, D. C. (2004). Somatic hypermutation and diverse immunoglobulin gene usage in the human antibody response to the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 6B. *Infect. Immun* 72, 3505-3514.

Zocchi, M. R., Poggi, A., et Rubartelli, A. (1997). The RGD-containing domain of exogenous HIV-1 Tat inhibits the engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells. *AIDS* 11, 1227-1235.

**Étude de la propriété adjuvante de la protéine Tat du VIH-1 et utilisation de sa capacité à lier les héparanes sulfatés pour évaluer le rôle de cibles ubiquitaires dans les mécanismes de présentation antigénique:
Implications dans l'immunogénicité de protéines et applications potentielles en vaccination**

Les protéines solubles sont généralement faiblement immunogènes, ce qui constitue une limite pour le développement de vaccins sous unitaires à base de protéines. Mes travaux de thèse ont eu pour objectif de décrypter certains mécanismes moléculaires et cellulaires qui contribuent à l'immunogénicité et d'en tirer partie pour développer des approches originales permettant d'améliorer la capacité des protéines à déclencher la réponse immunitaire. Pour cela, j'ai principalement utilisé le transactivateur transcriptionnel (Tat) du VIH-1. J'ai montré que l'oligomérisation de Tat permet à un mécanisme de collaboration B-TH-2 d'induire la réponse immunitaire en absence d'adjuvant. J'ai identifié le déterminant minimal responsable de l'effet et montré qu'il confère la propriété adjuvante à d'autres antigènes. J'ai ensuite montré que la présentation aux cellules T restreinte aux CMH I et CMH II est accrue lorsque les protéines sont dotées de la capacité à lier des sucres sulfatés d'expression ubiquitaire: les héparanes sulfate. Ces travaux ont permis de définir de nouvelles approches pour améliorer l'immunogénicité de protéines susceptibles d'être intégrées dans des préparations vaccinales.

**Study of HIV-1 Tat self-adjuvanting property and utilization of its ability to bind heparan sulfates to assess the role of ubiquitous targets in antigen presentation mechanisms:
Implications for the immunogenicity of proteins and potential applications in immunization**

Soluble proteins are usually poorly immunogenic, which is a limit to the development of subunit vaccines based on proteins. My thesis work aimed to decipher some molecular and cellular mechanisms that contribute to the immunogenicity and to exploit them to develop innovative approaches to improve the ability of proteins to trigger the immune response. For this purpose, I mainly used the transcriptional transactivator (Tat) of HIV-1. I showed that the oligomerization of Tat enables a B-TH-2 collaborative mechanism to induce the immune response in the absence of adjuvant. I identified the minimum region determining the effect and showed that it confers the self-adjuvanting property to other antigens. In the second part of my work, I showed that the MHC I and MHC II restricted presentation to T cells is increased when the proteins are endowed with the ability to bind ubiquitous sulfated polysaccharides: heparan sulfates. This work helped to define new approaches to improve the immunogenicity of proteins that are likely to be included in vaccine preparations.

LABORATOIRE D'INGENIERIE DES ANTICORPS POUR LA SANTE (LIAS),

SERVICE DE PHARMACOLOGIE ET D'IMMUNOANALYSE (SPI),
INSTITUT DE BIOLOGIE ET DE TECHNOLOGIES DE SACLAY (IBiTEC-S)
CEA-Saclay Bât 152
91 191 Gif-sur-Yvette CEDEX

POLE IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

UNIVERSITE PARIS-SUD 11
UFR « FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92 296 Châtenay-Malabry CEDEX