



**HAL**  
open science

**APPORTS DE L'IMMUNISATION GENIQUE A  
L'OBTENTION D'ANTICORPS A VISEE  
THERAPEUTIQUE: VERS UNE  
IMMUNOTHERAPIE DES MALADIES A PRIONS**

Coralie Alexandrenne

► **To cite this version:**

Coralie Alexandrenne. APPORTS DE L'IMMUNISATION GENIQUE A L'OBTENTION D'ANTICORPS A VISEE THERAPEUTIQUE: VERS UNE IMMUNOTHERAPIE DES MALADIES A PRIONS. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00351080

**HAL Id: tel-00351080**

**<https://theses.hal.science/tel-00351080>**

Submitted on 8 Jan 2009

**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 XI**  
**FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

École doctorale « Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué » pôle Immunologie

Année 2007

N° attribué par la bibliothèque

**THESE**

pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI**

Champs disciplinaire : Médecine

présentée et soutenue publiquement par :

**Coralie Alexandrenne-Durieux**

le 30 novembre 2007

Sujet de thèse :

**Apports de l'immunisation génique à l'obtention d'anticorps à visée  
thérapeutique : vers une immunothérapie des maladies à prions.**

Directeur de thèse : Jean-Yves COURAUD

**JURY**

**Mr Dominique ÉMILIE**

**Président**

**Mr Claude CARNAUD**

**Rapporteur**

**Mr Jean-Luc TEILLAUD**

**Rapporteur**

**Mr Pascal BIGEY**

**Examineur**

**Mr Ollivier MILHAVET**

**Examineur**

**Mr Didier BOQUET**

**Examineur**

**Mr Jean-Yves COURAUD**

**Directeur de thèse**

# REMERCIEMENTS

Je suis arrivée au SPI, pour la première fois, pour un stage de niveau licence. Je souhaitais alors devenir institutrice. Cependant, le « virus » de la paillasse m'a alors contaminée et a contrecarré mes plans. Me voici, 7 ans après, à soutenir mon doctorat.

Ce travail de thèse est le fruit de nombreuses rencontres scientifiques et personnelles de toutes ces années passées. Je tiens donc à remercier très chaleureusement toutes celles et ceux qui, par leurs connaissances scientifiques et/ou leur présence ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à **Jean-Yves Couraud** pour m'avoir accueillie dans son équipe durant ces nombreuses années. Merci de m'avoir toujours témoigné ta confiance... même après quelques déboires lors de mon année de DEA. Ton enthousiasme, ta disponibilité et nos discussions scientifiques (des fois un peu houleuses mais au final souvent en accord) m'ont encouragée durant toutes ses années.

Mes remerciements les plus sincères vont également à **Anne Wijkhuisen**. Tu as été pendant toutes ses années : une interlocutrice pour de nombreuses discussions scientifiques, ma compagne à l'animalerie (et de manip, en général), un soutien sans failles lors des moments de doute mais, par dessus tout, ma confidente et une amie sincère. J'ai eu un immense plaisir à travailler avec toi.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à **Didier Boquet**. Merci de m'avoir formée aux joies de la biologie moléculaire pour lesquelles je n'étais pas très sensibilisée en arrivant. Tes conseils, ta confiance et tes encouragements ont été pour moi d'une aide très précieuse.

Un grand merci à toute l'équipe ParisVII : **Fatima Dkhissi**, **Vincent Hanoux** et **Séverine Padiolleau**. Vos discussions scientifiques, votre bonne humeur et vos encouragements m'ont fait aller de l'avant.

Je tiens à remercier **Christophe Créminon** qui m'a accueillie dans son laboratoire puis son service. Lorsque je suis arrivée au SPI, j'appréhendais les moments où, en pleine manip, tu allais te mettre derrière mon dos en attendant que la bêtise arrive... et elle arrivait souvent (pour ne pas dire toujours). Mais grâce à cela, j'ai pris confiance en moi. Merci encore mille fois pour tes encouragements et tes discussions scientifiques toujours très fructueuses.

Un grand merci à **Jacques Grassi** pour m'avoir accueillie dans son service. Merci d'avoir soutenu ma candidature pour ma bourse de thèse et de m'avoir initiée au monde du prion.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers **Biomérieux**, notamment à **Michel Jolivet**, pour avoir financé ce travail de thèse ainsi qu'envers **tous les membres du Jury** qui m'ont fait l'honneur de participer à l'évaluation de ce travail.

Je remercie bien évidemment tous les habitants du 136, qui de près ou de loin, m'ont encouragé tout au long de ces années passées et qui ont rendu, par leur présence, ce séjour très agréable. Une pensée toute particulière pour **Séverine Maillet** qui au fur et à mesure de nos discussions et devenue une amie. Bon courage pour la suite. Merci à **Hervé Volland** pour ses nombreux conseils notamment en immuno-analyse. Mille mercis à **Stéphanie Simon** pour ses nombreuses discussions tant scientifiques que personnelles. Je garde un excellent souvenir de notre escapade à Dusseldorf. Je remercie également **Nathalie Morel et Cécile Féraudet** pour leurs nombreux éclaircissements dans le domaine du prion. Je n'oublie pas toute l'équipe des « monoclonettes » : **Patricia Lamourette** qui m'a encouragée pendant toutes ces années, **Karine Moreau et Marc Plaisance**. Tous mes remerciements vont également à toute l'équipe d'immuno-analyse : **Marie-Claire Nevers** qui m'a toujours soutenue et qui m'a initiée à la confection des traceurs, **Hervé Boutal** toujours partant pour la production de ce fameux SAF83-G4. Un grand merci à toute l'équipe INRA qui a montré un intérêt constant à mon travail de doctorat. Mes remerciements les plus sincères vont donc à **Karine Adel-Patient**. Tes conseils tant scientifiques que personnelles m'ont toujours été d'un grand soutien. Mille mercis à **Jean-Marc Chatel**, un de mes compagnons de bureau, à **Stéphane Hazebrouck**, à **Marie-Françoise Drumare**, à **Sandrine Ah-Leung**, à **Laëtitia**

**Pothelune** et **Jean-Michel Wal**. Je garderai également un excellent souvenir du premier étage. Merci à **Aloïse Mabondzo** pour ses conseils en culture cellulaire et à **Eric Ezan** pour ses critiques toujours constructives de ce travail.

Un grand merci à tout le LIAS et plus particulièrement à **Frédéric Ducancel** pour son soutien.

Merci à **Sandrine Leblais** et **Laurie Menez** qui m'ont aidé dans les démarches administratives ainsi qu'à toute l'équipe de l'animalerie.

Un grand merci et pleins de courage à mes compatriotes thésards : **Nathalie Kreich**, **Fany Blanc**, **Laurence Bousquet**, **Alexandra Hembury**, **Julie Pringent**, **Erwan Wernier**.

Je tiens à remercier **Audrey** qui m'a soutenue depuis maintenant 10 ans et **Catherine** qui m'a été d'une aide précieuse notamment pour s'occuper de Cyprien dans les moments difficiles.

Un grand merci à toute ma famille : **mes parents** (avec une pensée toute particulière pour mon correcteur d'orthographe personnel qui se reconnaîtra), **ma grand-mère** et **mes frères et soeurs** qui par leur présence et leur soutien ont été un atout majeur.

Pour finir, je dédie ce travail à mes deux trésors : mon fils, **Cyprien**, et mon mari. Ce travail, **Namour**, je te le dois. Tu m'a soutenue contre vents et marées. Ca y est! Je suis arrivée au bout grâce à ton amour. Merci du fond du coeur.

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AChE :	Acétylcholinestérase
ADCC :	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADNc :	Acide Déoxy-ribonucléique complémentaire
ARN :	Acide Ribonucléique
BCA :	Bicinchoninic Acid
BSA :	Bovine Serum Albumine
CAS :	Anticorps de chèvre anti-souris
CDC :	Complement-Dependent Cytotoxicity
CDR :	Complementary Determining Region
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA :	Cellule Présentatrice de l'Antigène
DMEM :	Dulbecco Modified Eagle Medium
DO :	Densité Optique
EIA :	Dosage immunoenzymatique
ESST :	Encéphalopathie Subaiguë Spongiforme Transmissible
Fc :	Fragment Constant d'un anticorps
FITC :	Isothiocyanate de fluorescéine
GPI :	Glycosyl phosphatidylinositol
HAMA :	Human Anti-Mouse Antibodies
HEK :	Cellule embryonnaire humaine de poumons
hGH :	Hormone de croissance humaine
ic :	intra-cérébrale
IFF :	Insomnie Fatale Familiale
Ig :	Immunoglobuline
ig :	intra-gastrique
Il :	Interleukine
im :	intra-musculaire
ip :	intra-péritonéale
iv :	intra-veineuse
LB/LT :	Lymphocyte B/ Lymphocyte T
mAb :	Anticorps monoclonal
MCJ :	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
NK :	cellule Natural Killer
PAGE-SDS :	Gel électrophorétique en polyacrylamide-Sodium Dodécyl Sulfate
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCR/RT-PCR :	Polymerase Chain Reaction/ Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
PE :	Phycoérytrine
PK :	Protéinase K
PM :	Poids Moléculaire
PrPc :	Protéine prion sous sa conformation cellulaire
PrPrec :	Protéine prion recombinante
PrPsc :	Protéine prion sous sa conformation pathogène (Sc=scrapie)
PVP :	Polyvinylpyrrolidone
RMN :	Résonnance Magnétique Nucléaire
SAF :	Scrapie-Associated Fibrils
scFv :	Single Chain Fragment Variable
SNC :	Système Nerveux Central

# TABLE DES MATIÈRES

<b>I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 La protéine prion et les maladies à prions.....</b>	<b>2</b>
I.1.1 La protéine prion cellulaire (PrPc) et pathogène (PrPsc).....	2
I.1.1.1 Historique et théorie de la « protéine seule » .....	2
I.1.1.2 Le gène codant la protéine prion.....	3
I.1.1.3 La protéine prion cellulaire (PrPc).....	4
I.1.1.4 La protéine prion pathogène (PrPsc).....	8
I.1.1.5 Les différences structurales et biochimiques de la PrPc et PrPsc....	10
I.1.2 Les maladies à prion .....	12
I.1.2.1 Les principales caractéristiques .....	12
I.1.2.2 Etiologie et pathologies associées à la protéine prion.....	14
I.1.2.3 Le système immunitaire et les maladies à prion.....	16
I.1.3 Les thérapies contre les maladies à prions .....	19
I.1.3.1 Généralités.....	19
I.1.3.2 Chimiothérapie.....	20
I.1.3.3 Immunothérapie.....	22
<b>I.2 Généralités sur l'immunothérapie.....</b>	<b>35</b>
I.2.1 Généralités sur les anticorps.....	35
I.2.1.1 Structure des anticorps .....	35
I.2.1.2 Isotypes des anticorps et leur fonction .....	37
I.2.1.3 Les fonctions des anticorps .....	41
I.2.2 Les anticorps en immunothérapie et en imagerie.....	43
I.2.2.1 Histoire de l'immunothérapie.....	44
I.2.2.2 Intérêt des anticorps monoclonaux en immunothérapie.....	46
I.2.2.3 Vers une humanisation des anticorps.....	49
I.2.2.4 Les différents formats d'anticorps et leur pharmacocinétique .....	51
I.2.2.5 Anticorps ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché.....	55

<b>I.3 Généralités sur l'immunisation génique.....</b>	<b>60</b>
I.3.1 Introduction à l'immunisation génique.....	60
I.3.1.1 Historique .....	60
I.3.1.2 Mécanisme d'induction de la réponse immunitaire.....	61
I.3.1.3 Avantages et inconvénients de l'immunisation génique .....	63
I.3.2 Les outils de transfert de gènes .....	65
I.3.2.1 Vecteurs viraux .....	65
I.3.2.2 Vecteurs non-viraux.....	67
I.3.2.3 Outils physiques.....	69
I.3.3 Essais thérapeutiques .....	72
I.3.3.1 En thérapie génique.....	72
I.3.3.2 En vaccination génique .....	74
 <b>II. OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THÈSE.....</b>	 <b>75</b>
 <b>III. RESULTATS .....</b>	 <b>78</b>
<b>III.1 Immunothérapie passive .....</b>	<b>79</b>
III.1.1 Evaluation de l'effet thérapeutique <i>ex vivo</i> de fragments Fab dérivés d'anticorps monoclonaux anti-PrP .....	79
III.1.1.1 Détermination des anticorps candidats .....	80
III.1.1.2 Production et vérification de la fonctionnalité des fragments Fab 82	
III.1.1.3 Etude de l'effet thérapeutique des fragments Fab sur un modèle cellulaire de maladies à prions .....	91
III.1.1.4 Discussion.....	96
III.1.2 Obtention d'anticorps anti-PrPc humaine à visée thérapeutique par immunisation génique chez des souris de type sauvage.....	98
III.1.2.1 Description des constructions plasmidiques utilisées.....	99
III.1.2.2 Etude de différents protocoles d'immunisation .....	114



<b>III.2 Immunothérapie active : vers un protocole vaccinal.....</b>	<b>138</b>
III.2.1 Rupture de la tolérance immunitaire pour la PrPc murine par électrotransfert <i>in vivo</i> de l'ADN codant la protéine prion humaine .....	139
III.2.1.1 Description du protocole d'immunisation .....	139
III.2.1.2 Suivi de la réponse immunitaire humorale dirigée contre la protéine prion humaine. ....	140
III.2.1.3 Rupture de la tolérance immunitaire .....	147
III.2.2 Expériences complémentaires.....	150
III.2.2.1 Description des protocoles d'immunisation.....	150
III.2.2.2 Suivi de la réponse immunitaire humorale dirigée contre la protéine prion humaine. ....	151
III.2.2.3 Rupture de la tolérance immunitaire .....	153
III.2.3 Discussion.....	156
<b>III.3 Travaux complémentaires : Étude de nanosphères In-Cell-Art sur l'expression de la PrPc humaine in vivo.....</b>	<b>158</b>
III.3.1 Mise au point des dosages .....	158
III.3.1.1 Dosages de l'ADN et de l'ARNm spécifiques.....	158
III.3.1.2 Dosage de la PrPc humaine in vivo.....	161
III.3.2 Résultats obtenus.....	162
III.3.2.1 Dosages des ADN et ARNm spécifiques .....	162
III.3.2.2 Dosage de la PrPc humaine in vivo.....	164
III.3.3 Conclusion .....	166
<b>IV.DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>167</b>
<b>IV.1 Immunothérapie passive .....</b>	<b>169</b>
<b>IV.2 Immunothérapie active.....</b>	<b>171</b>
<b>V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>174</b>
<b>VI.ANNEXES.....</b>	<b>211</b>
<b>VII. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</b>	<b>235</b>

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Alignement de séquences de la PrPc de différentes espèces .....	5
Figure 2 : Structure primaire de la PrPc .....	6
Figure 3 : Modèles de conversion de la PrPc et PrPsc .....	9
Figure 4 : Structure de la PrPc .....	10
Figure 5 : Structure tertiaire hypothétique de la PrPsc.....	11
Figure 6 : Lésions neuronales caractéristiques des ESST .....	13
Figure 7 : Evolution au cours des années des cas théoriques d'ESB entrant dans la chaîne alimentaire humaine et des cas rapportés de vMCJ au Royaume Uni.....	16
Figure 8 : Mécanismes hypothétiques d'inhibition de la PrPsc par les anticorps.....	25
Figure 9 : Sélection thymique des lymphocytes T immatures.....	27
Figure 10 : Anergie des lymphocytes T. ....	29
Figure 11 : Notion de lymphocytes T régulateurs.....	29
Figure 12 : Sélection négative et correction du récepteur des lymphocytes B immatures. ....	30
Figure 13 : Tolérance périphérique des lymphocytes B.....	31
Figure 14 : Structure générale d'un anticorps.....	35
Figure 15 : Les différents domaines d'un anticorps.....	37
Figure 16 : Les cinq classes d'immunoglobulines .....	38
Figure 17 : Les fonctions effectrices des anticorps.....	41
Figure 18 : Production des anticorps monoclonaux.....	48
Figure 19 : Anticorps chimériques et anticorps humanisés .....	49
Figure 20 : Coupure d'un anticorps par la papaine et la pepsine.....	51
Figure 21 : Les différents formats d'anticorps.....	53
Figure 22 : Anticorps monoclonaux thérapeutiques entrant en phase clinique .....	59
Figure 23 : Mécanismes hypothétiques de la présentation de l'antigène après une immunisation génique.....	63
Figure 24 : Principales fonctions des lipides et polymères cationiques.....	68
Figure 25 : Répartition des essais cliniques selon leur année d'initiation.....	72
Figure 26 : Répartition des essais cliniques en fonction des phases. ....	72
Figure 27 : Répartition des essais selon les pays. ....	73

Figure 28 : Répartition des essais cliniques selon le type de maladie.....	73
Figure 29 : Liste des cinq anticorps monoclonaux utilisés dans cette étude. ....	81
Figure 30 : Pureté des anticorps monoclonaux et de leur dérivé Fab : <i>exemple du SAF34</i> .....	84
Figure 31 : Dosage enzymo-immunométrique par compétition.....	86
Figure 32 : Détermination de l'affinité apparente par un dosage immunométrique par compétition : <i>exemple du couple Bar236 pour la PrP murine.</i> ....	87
Figure 33 : Reconnaissance des PrPc murine et humaine natives par les anticorps entiers et leur dérivé Fab.....	90
Figure 34 : Dosage de la PrPsc dans des cellules N2a.....	93
Figure 35 : Effet dose des couples d'anticorps anti-PrP sur l'accumulation de la PrPsc dans les cellules N2a22L.....	95
Figure 36 : Schéma d'un vecteur d'expression eucaryote illustrant ses principales caractéristiques.....	100
Figure 37 : Construction du vecteur p3-PrP1-229.....	103
Figure 38 : Coopération lymphocytes T et lymphocytes B.....	105
Figure 39 : Construction du vecteur p3-PrP1-229-TT.....	108
Figure 40 : Dosage immunométrique de la protéine prion humaine.....	110
Figure 41 : Détection de l'expression de la protéine prion humaine après transfection transitoire de cellules COS par dosage immunométrique.....	111
Figure 42 : Mise en évidence de la protéine prion humaine par immuno-transfert.....	112
Figure 43 : Détection de la protéine prion humaine par immuno-transfert.....	113
Figure 44 : Production d'anticorps dirigés contre une conformation native de la protéine prion humaine : description du protocole d'immunisation.....	115
Figure 45 : Mode d'action de l'in vivo JetPEI™.....	117
Figure 46 : Structure générale des poloxamines.....	117
Figure 47 : Schéma du montage expérimental de l'électrotransfert intramusculaire.....	119
Figure 48 : Dosage de la PrPc humaine <i>in vivo</i> .....	123
Figure 49 : Analyse de la spécificité du dosage immunométrique.....	124
Figure 50 : Ajouts dosés.....	125
Figure 51 : Expression de la protéine prion humaine <i>in vivo</i> .....	127
Figure 52 : Dosage immunométrique : suivi de la réponse anticorps dirigés contre la PrPc humaine.....	129

Figure 53 : La réponse anticorps dirigés contre la PrPc humaine recombinante.....	130
Figure 54 : Détermination du titre en anticorps dirigés contre la PrPc humaine.....	132
Figure 55 : Reconnaissance de la PrPc humaine native exprimée à la surface des cellules .....	134
Figure 56 : Vers un protocole vaccinal... : description du protocole d'immunisation....	140
Figure 57 : Titre en anticorps dirigés contre la PrPc humaine en fonction des semaines au cours du protocole vaccinal.....	141
Figure 58 : Comparaison entre la réponse humorale primaire et secondaire .....	142
Figure 59 :Reconnaissance de la PrPc humaine native exprimée à la surface des cellules après une stimulation par la protéine recombinante.....	144
Figure 60 : Généralités sur l'orientation de la réponse immunitaire.....	145
Figure 61 : Dosage immunométrique : suivi de l'orientation de la réponse immunitaire humorale dirigée contre la PrPc humaine. ....	146
Figure 62 : Orientation de la réponse humorale dirigée contre la PrPc humaine. ....	147
Figure 63 : Reconnaissance de la PrPc murine native exprimée à la surface des cellules après une restimulation par la protéine humaine recombinante.....	149
Figure 64 : Description du protocole d'immunisation contrôle.....	150
Figure 65 : Titre en anticorps dirigés contre la PrPc humaine en fonction des semaines	152
Figure 66 : Reconnaissance de la PrPc murine native exprimée à la surface des cellules après une restimulation par la protéine humaine recombinante.....	155
Figure 67 : Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN et de l'ARN de la PrPc humaine.....	159
Figure 68 : Fonctionnalité et spécificité des amorces utilisées pour la détection d'ADN et d'ARN de la PrPc humaine <i>in vivo</i> .....	160
Figure 69 : Amplification par PCR de l'ADN plasmidique des extraits de muscle .....	163
Figure 70 : Niveau d'expression de la PrPc humaine dans les extraits de muscle .....	165

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des ESST humaines .....	14
Tableau 2 : Nombre annuel de cas certains ou probables de maladie de Creutzfeldt-Jakob en France entre 1992 et 2007. ....	19
Tableau 3 : Liste non exhaustive d'anticorps anti-PrPc inhibant la réplication de la PrPsc <i>ex vivo</i> .....	24
Tableau 4 : Liste des essais d'immunisation active contre les maladies à prions.....	34
Tableau 5 : Caractéristiques des différents isotypes d'immunoglobulines humaines.....	40
Tableau 6 : Anticorps utilisés en imagerie médicale.....	56
Tableau 7 : Anticorps utilisés en immunothérapie.....	58
Tableau 8 : Vecteurs viraux utilisés en immunisation génique .....	66
Tableau 9 : Concentrations obtenues pour les cinq Fab étudiés. ....	84
Tableau 10 : Affinités apparentes des anticorps entiers et des Fab pour la PrP murine et la PrP humaine. ....	87
Tableau 11 : Effet thérapeutique <i>ex vivo</i> des anticorps entiers et des Fab .....	95
Tableau 12 : Origine et propriétés des deux adjuvants étudiés.....	120
Tableau 13 : Orientation de la réponse humorale dirigée contre la PrPc humaine. ....	153

## **I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1.1 La protéine prion et les maladies à prions**

### **1.1.1 La protéine prion cellulaire (PrPc) et pathogène (PrPsc)**

#### **1.1.1.1 Historique et théorie de la « protéine seule »**

Alors qu'il travaille sur la tremblante du mouton, Bjorn Sigurdsson identifie pour la première fois en 1954 un agent pathogène aux caractéristiques particulières mais si proches de celles d'un virus qu'il le nomme « virus lent » (slow virus) (Sigurdsson, 1954). D'autres maladies furent assimilées à cette forme de pathogénie comme le Kuru en 1957 et la maladie de Creutzfeldt-Jakob en 1959 (Hadlow, 1959 ; Klatzo *et al.*, 1959). En 1982, après plusieurs expériences démontrant d'une part l'inefficacité des traitements contre les acides nucléiques et d'autre part la réduction de l'infectivité par hydrolyse protéique, Stanley Prusiner réfute la théorie du virus et suggère, en reprenant des hypothèses proposées par Griffith en 1967, que l'agent pathogène ne peut être que protéique (Prusiner *et al.*, 1982). Il propose alors pour cet agent pathogène le nom de *prion* dérivant de « **proteinaceous and infectious** », notée *PrP* pour « **protéine du prion** » ou « **protéine résistante aux protéases** ». Selon cette hypothèse de « la protéine seule » (« protein only hypothesis »), la protéine prion possède deux conformations distinctes. Dans des conditions particulières, la forme cellulaire (PrPc) subit un réarrangement conformationnel au contact de la forme pathogène (PrPsc) : c'est le « baiser de la mort » tel que l'a qualifié Caughey (Caughey *et al.*, 2001). La PrPsc, qui est le vecteur de la maladie, conduirait à l'apparition des symptômes par la propagation de sa forme pathogène aux unités non pathogènes.

Bien que ce postulat puisse expliquer la plupart des phénomènes observés lors de la maladie et semble se confirmer plus précisément (Legname *et al.*, 2004 ; King and Diaz-Avalos, 2004 ; Tanaka *et al.*, 2004), cette théorie de « la protéine seule » ne fait pas l'unanimité car elle révolutionne la pensée biologique où il est admis que les seules molécules « transportant » l'information sont des acides nucléiques. Cette théorie laisse de nombreuses questions sans réponse : Comment une protéine unique peut-elle entraîner l'apparition de nombreuses variantes de la maladie ? Pourquoi la PrPsc n'est-elle pas toujours associée à l'infection (Race *et al.*, 1998) ? La protéine prion étant fortement conservée au cours de l'évolution, à quoi est due la barrière d'espèce (van Rheede *et al.*,

2003)? Ainsi, des hypothèses alternatives ont émergé au début des années 1980 impliquant notamment les virinos (ou les virus) (Kimberlin, 1982). Comme le rappelle Michel Laurent, la protéine prion serait associée et fortement liée à un acide nucléique soumis à une grande variabilité intra et inter-espèce. Cette particularité « confère au complexe ainsi formé des propriétés stéréospécifiques à même d'interpréter l'existence de souches multiples d'une même maladie mais aussi celle de la barrière inter-espèces » (Laurent, 1998). En 1991, Weissmann propose une « théorie unifiée » qui incorpore les caractéristiques de l'hypothèse de la protéine seule mais tente d'expliquer les phénomènes de la barrière d'espèce et l'origine sporadique et génétique des maladies à prion (Weissmann, 1991). Cette théorie propose que la PrP<sup>sc</sup> se propage par la conversion de la PrP<sup>c</sup> induite par la PrP<sup>sc</sup>, liée à un « coprion » dont l'origine probable serait un acide nucléique. Aujourd'hui, nombreux sont ceux qui oscillent entre le concept de « protéine seule » et le recours à un cofacteur, mais de nature inconnue (Fasano *et al.*, 2006). En particulier, Prusiner propose l'intervention d'une protéine X qui accompagnerait telle une chaperonne le passage de la protéine normale à la protéine pathogène (Telling *et al.*, 1995).

### **1.1.1.2 Le gène codant la protéine prion**

Le gène codant pour la protéine prion a été décrit par l'équipe d'Alan Dickinson dans les années 70 : baptisé *Sinc* (pour Scrapie incubation period). Par la suite, Oesch a isolé le gène de la PrP chez le hamster (Oesch *et al.*, 1985). Ce sont les travaux de Wertaway et Moore qui ont permis de montrer que le gène *Prnp* et *Sinc* étaient identiques (Moore *et al.*, 1998).

Les deux isoformes, PrP<sup>c</sup> et PrP<sup>sc</sup>, sont codées par un unique gène : le gène *Prnp*, localisé sur le bras court du chromosome 20 chez l'Homme et sur le chromosome 2 homologue chez la souris (Basler *et al.*, 1986). Quelle que soit l'espèce, le gène ne présente pas d'intron. C'est un gène bien conservé chez tous les mammifères avec une homologie de séquence supérieure à 90% (van Rheede *et al.*, 2003). L'exon est constitué d'environ 2000 nucléotides et la phase ouverte de lecture du gène de 759 à 792 nucléotides.



### **I.1.1.3 La protéine prion cellulaire (PrPc)**

#### *I.1.1.3.1 Séquence et mutations*

La protéine prion est une glycoprotéine membranaire très conservée au cours de l'évolution (Figure 1) (van Rheede et al., 2003). La PrPc est exprimée de façon constitutive et ubiquiste dans la majorité des tissus (notamment dans les cellules du système immunitaire, les cellules sanguines, le tube digestif) mais avec une expression plus importante dans le système nerveux central (voir pour revue : Harris, 1999).

**-Séquence :** La protéine prion comprend 253 acides aminés chez l'Homme, 254 chez la souris et le hamster, 256 chez le mouton et la vache. Elle est ancrée à la membrane par l'intermédiaire d'un glycosyl phosphatidyl inositol (GPI). Elle possède deux sites de glycosylations aux résidus Asn 181 et Asn 197 permettant l'accrochage de sucres N-liés responsables des trois états glycosylés de la PrP (di-, mono-, non-glycosylée). Les deux cystéines 179 et 214 sont reliées par un pont disulfure. Les résidus 1-22, qui seront excisés, constituent le peptide signal d'adressage à la membrane. La partie C-terminale comportant les résidus 231-253, est elle aussi excisée lors de la maturation protéique au moment de l'addition de l'ancre GPI. Le reste de la séquence est constitué de deux parties : la queue N-terminale très flexible (résidus 23 à 123) contenant un motif octamérique PHGGGWGQ répété et le coeur C-terminal structuré (résidus 124-231) (Figure 1 et Figure 2).

# INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions

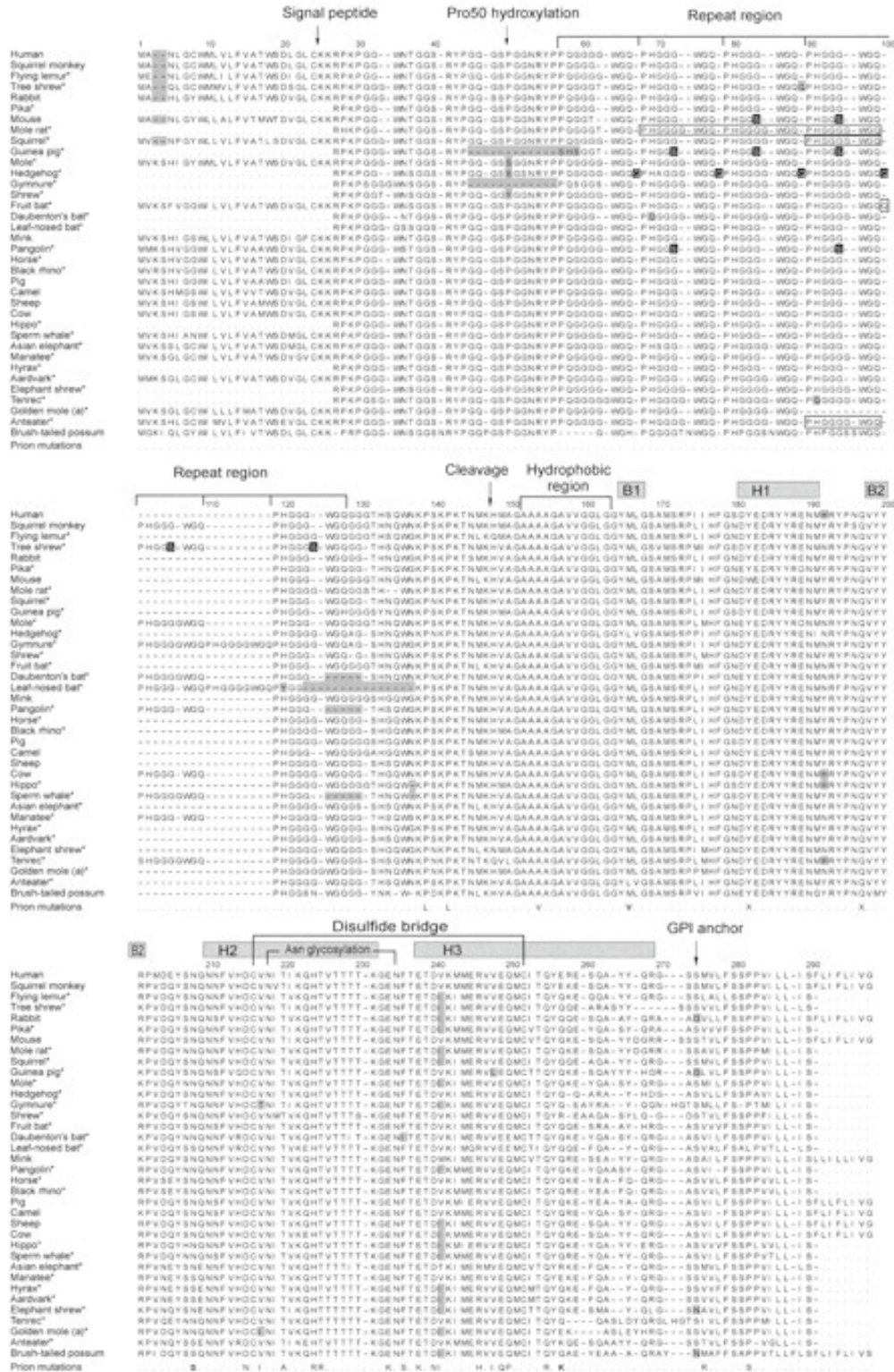


Figure 1 : Alignement de séquences de la PrPc de différentes espèces

(d'après van Rheede *et al.*, 2003)

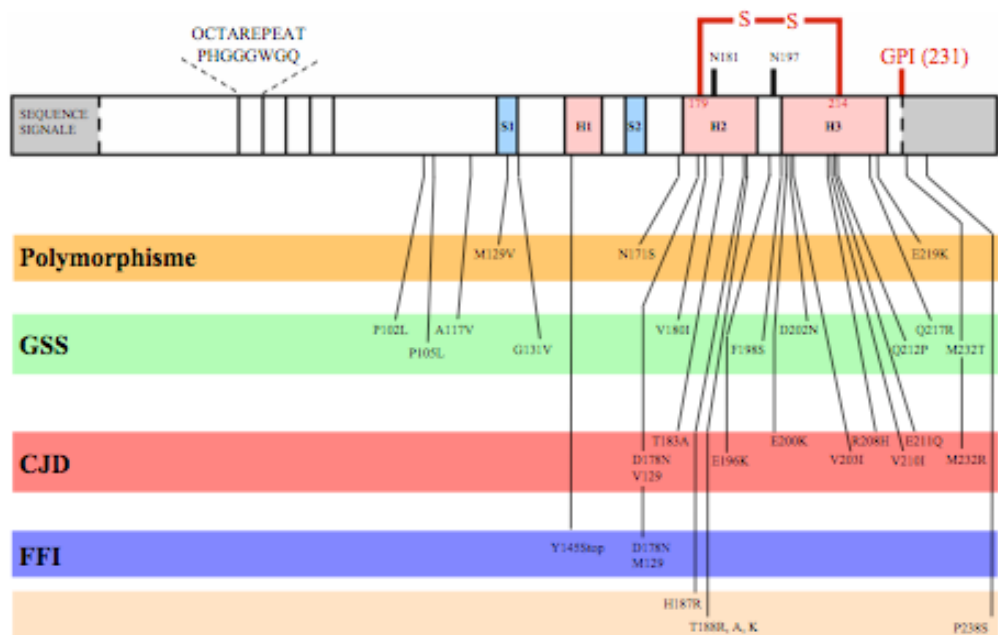


Figure 2 : Structure primaire de la PrPc

**-Mutations.** On peut observer différents types de mutations ayant un effet plus ou moins caractérisé : polymorphismes, substitutions, délétions ou insertions. Dans la figure 11, la localisation de différentes mutations de la PrPc humaine connues et les maladies correspondantes sont résumées. Parmi ces mutations, 6 sont responsables du syndrome de Gerstmann-Sträussler-Sheinker, 7 provoquent la maladie de Creutzfeldt-Jakob, 2 sont à l'origine d'insomnie familiale fatale (voir le paragraphe p14). La plus grande partie des mutations se situe dans la partie C-terminale de la protéine et notamment au niveau des hélices H2 et H3. En outre, plusieurs polymorphismes de la protéine sont connus.

I.1.1.3.2 Fonctions présumées

La fonction exacte de la protéine prion est aujourd'hui toujours inconnue (Martins *et al.*, 2002). L'approche classique consistant à invalider le gène de la PrP chez des souris (*Prnp<sup>0/0</sup>*) a démontré l'importance de la PrPc dans le développement et la transmission des ESST mais n'a pas pu établir clairement sa fonction physiologique naturelle. En effet, ces souris transgéniques présentent un phénotype quasi-normal et sont parfaitement viables suggérant que cette protéine n'exerce pas de fonctions vitales et/ou que ses fonctions peuvent être compensées par d'autres molécules (Bueler *et al.*, 1992 ; Manson *et al.*, 1994). Cependant plusieurs travaux ont mis en évidence son intervention probable dans différents mécanismes liés ou non à la fonction neuronale.

**-Interactions avec le Cuivre et endocytose.** Une des pistes privilégiées pour la fonction de la PrPc est celle donnée par la forte affinité pour le cuivre et la région de l'octapeptide répété ( $K_d=10^{-14}M$ ) (Jackson *et al.*, 2001). Ceci amène logiquement la question de la fonction de cette fixation. L'équipe de Pauly a mené une série d'expériences sur des cellules de poulet et a montré que le cuivre stimulait rapidement et réversiblement l'endocytose de la PrPc depuis la surface cellulaire (Pauly and Harris, 1998). Ils proposent que l'endocytose soit provoquée par un changement de conformation lié à la fixation des ions  $Cu^{2+}$  dans la région de l'octapeptide. Ceci augmenterait l'affinité de la PrPc pour un récepteur hypothétique d'endocytose conduisant la PrPc dans des vésicules de clathrine. La PrPc serait donc un récepteur et transporteur du cuivre.

**-Rôle d'antioxydant.** La forte affinité de la PrPc pour le cuivre peut aussi avoir une autre conséquence. En effet, le cuivre libre peut créer des radicaux oxygénés hautement toxiques pour la cellule. Dans la mesure où elle chélate le cuivre, la protéine prion pourrait donc avoir un effet protecteur antioxydant. En effet, le niveau d'expression de la PrPc a pu être lié à la résistance au stress induit par les radicaux libres ainsi qu'à l'augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase, enzyme clé du système cellulaire contre le stress oxydatif (Brown and Besinger, 1998).

**-Fonction neuronale.** La nature des ligands susceptibles d'interagir avec la PrPc peut renseigner sur ses fonctions éventuelles. Parmi eux, les molécules d'adhérence neuronale (N-CAM) et la laminine impliquées dans la régulation de la prolifération, de la

*INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*  
différenciation et de la mort neuronale, laissent supposer que la PrPc puisse remplir un rôle dans ces domaines (Chiarini *et al.*, 2002 ; Solforosi *et al.*, 2004).

#### **I.1.1.4 La protéine prion pathogène (PrPsc)**

##### *I.1.1.4.1 Définition*

La PrPsc désigne l'isomère de la protéine prion associée aux ESST car elle représente le constituant majeur des fractions infectieuses (Bolton *et al.*, 1982 ; Bolton *et al.*, 1984 ; Gabizon *et al.*, 1988 ; Merz *et al.*, 1983) :

- la PrPsc est copurifiée avec l'infectiosité
- sa concentration est proportionnelle au titre infectieux
- la PrPsc peut être mise en évidence, par microscopie électronique, sous forme d'agrégats fibrillaires appelés SAF (Scrapie Associated Fibrils) dans des cerveaux infectés

##### *I.1.1.4.2 Conversion de la PrPc*

Les étapes de conversion de la PrPc en PrPsc sont aujourd'hui toujours mal connues. Plusieurs modèles moléculaires théoriques ont été proposés et chacun satisfait en partie les données expérimentales.

**-Le modèle de repliement ou de la matrice (Figure 3A).** Ce modèle est basé sur l'hypothèse que la PrPsc est thermodynamiquement plus stable que la PrPc et que les deux entités sont séparées par une grande barrière d'énergie. Ce postulat empêche la conversion de la PrPc en PrPc et rend la conversion spontanée de la forme normale en forme pathologique impossible. Cependant, l'association d'un précurseur PrPsc (endogène ou exogène) avec une protéine normale abaisserait la barrière d'énergie nécessaire à la formation de deux molécules de PrPsc par conversion de la PrPc qui pourraient à leur tour transformer deux autres molécules de PrPc et ainsi de suite. L'étape limitante de ce modèle est la formation du complexe PrPc-PrPsc (Prusiner, 1991).

-Le **modèle de nucléation-polymérisation** (Figure 3B). Dans ce modèle la PrPc et la PrPsc coexistent dans un état d'équilibre thermodynamique réversible. Il est caractérisé par un temps de latence qui se traduit par la formation d'un noyau stable composé d'oligomères de PrPsc. Une fois le noyau formé, l'addition de nouveaux monomères devient thermodynamiquement favorable et la fibre croît alors rapidement. L'étape limitante est donc la formation du noyau (Jarrett and Lansbury, 1993).

-Le **modèle de conversion assistée par une chaperonne** (Figure 3C). Ce modèle fait intervenir un état intermédiaire PrP\* en équilibre avec la PrPc et capable d'interagir avec la PrPsc. L'interaction du complexe PrP\*/protéine X (protéine chaperonne non formellement identifiée) avec une molécule de PrPsc diminuerait la barrière d'énergie permettant ainsi à la PrP\* d'évoluer vers la PrPsc.

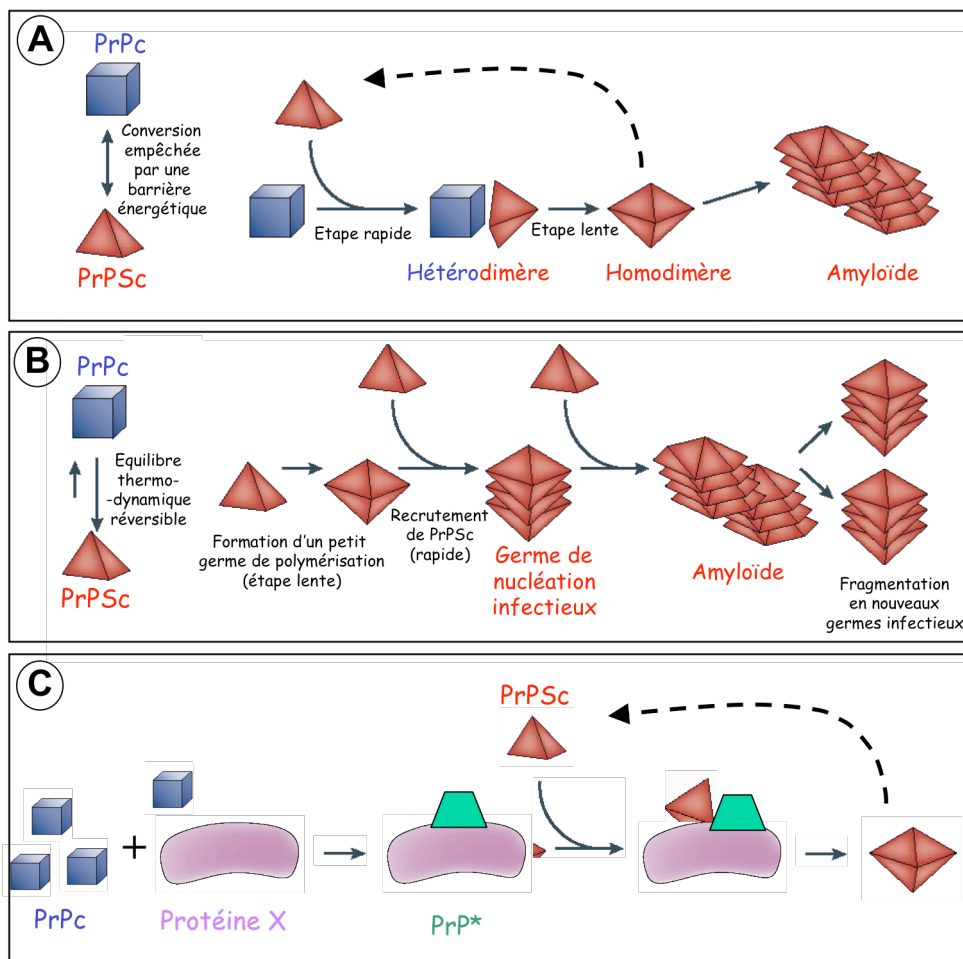


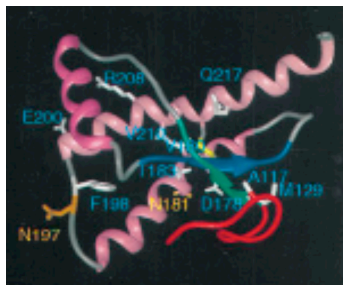
Figure 3 : Modèles de conversion de la PrPc et PrPsc

### I.1.1.5 Les différences structurales et biochimiques de la PrPc et PrPsc

#### I.1.1.5.1 Structure de la PrPc

Sur la base de données de dichroïsme circulaire et de protéolyse ménagée, il est admis que la structure de la protéine prion cellulaire et la structure de la protéine prion recombinante sont identiques, mais aucune structure détaillée n'est disponible pour comparaison. Les structures RMN de la protéine prion recombinante de hamster des fragments 90-231 et 29-231 ont permis de mettre en évidence que la partie N-terminale (29-123) de la PrPc était très flexible et non structurée (Figure 4A) (James *et al.*, 1997 ; Donne *et al.*, 1997). Le coeur de la protéine est au contraire très bien structuré. Il possède trois hélices  $\alpha$  : H1 (145-153), H2 (172-194) et H3 (200-225) ; deux brins formant un feuillet  $\beta$  : S1 (129-132) et S2 (161-163). Donne *et al.*, montrent aussi que les résidus 137-140 adoptent une conformation étendue mais ne forment pas de brin  $\beta$ . Ils proposent que ce fragment intervienne dans le changement conformationnel de la PrPc en PrPsc.

La structure de la protéine prion humaine (hPrP) a été mise en évidence par RMN et radiocristallographie (Knaus *et al.*, 2001). La structure RMN présente aussi les trois hélices H1 (144-154), H2 (173-195) et H3 (200-228) ainsi que les brins  $\beta$  S1 (128-131) et S2 (161-164). Alors que toutes les structures sont monomériques par RMN, la structure de la hPrP résolue par diffraction des rayons X est dimérique (Figure 4B). La dimérisation se fait avec l'échange de l'hélice H3. Ceci entraîne la formation d'un feuillet  $\beta$  inter-moléculaire impliquant les résidus 188-195 de chaque monomère



A- Structure RMN de la PrPc de hamster (90-231) (James *et al.*, 1997)



B- Structure RMN du dimère de PrPc humaine (Knaus *et al.*, 2001)

Figure 4 : Structure de la PrPc

I.1.1.5.2 Structures hypothétiques de la PrP<sup>Sc</sup>

Les propriétés physico-chimiques de la PrP<sup>Sc</sup> sont des obstacles majeurs pour la résolution tridimensionnelle de la structure de cette isoforme. Cependant, des études de spectroscopie infrarouge et de dichroïsme circulaire ont mis en évidence l'implication d'un changement de structure secondaire important lors de la transconformation de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (Pan *et al.*, 1993). En effet, la protéine passe d'une conformation à 42% d'hélice  $\alpha$  et 3% de feuillet  $\beta$  sous sa forme cellulaire, à 30% d'hélice  $\alpha$  et 43% de feuillet  $\beta$  sous sa forme pathogène. Différents modèles hypothétiques de la structure tertiaire de la PrP<sup>Sc</sup> ont été proposés (Figure 5).

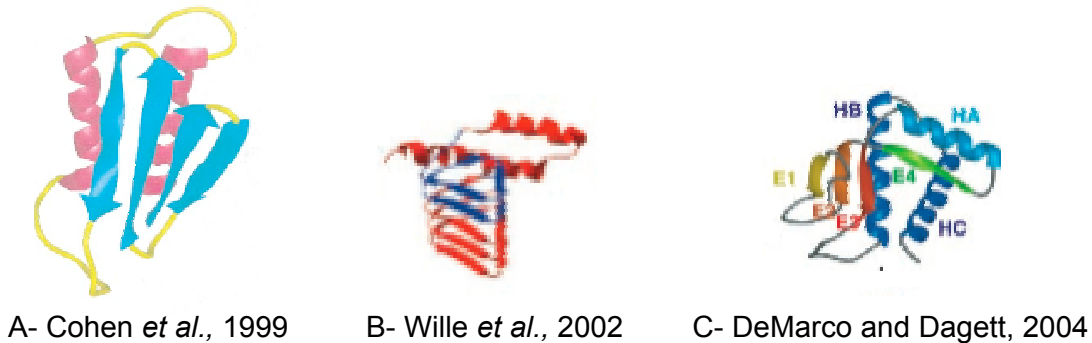


Figure 5 : Structure tertiaire hypothétique de la PrP<sup>Sc</sup>

I.1.1.5.3 Les différences biochimiques de la PrP<sup>C</sup> et de la PrP<sup>Sc</sup>

I.1.1.5.3.1 Solubilité

Sous sa forme cellulaire, la protéine prion est soluble dans des conditions peu dénaturantes. Par opposition, la PrP<sup>Sc</sup> est insoluble : les modifications de structure tridimensionnelle confèrent à la PrP<sup>Sc</sup> des propriétés d'agrégation en fibrilles, appelées SAF (Scrapie Associated Fibrils) décelables sur coupes histologiques de cerveaux infectés.



I.1.1.5.3.2 Résistance à la protéinase K

La protéinase K est une endopeptidase à sérine de 29kD. Son pH de fonctionnement optimal est compris entre 7,5 et 12. Elle présente une spécificité pour les résidus aliphatiques, aromatiques et hydrophobes. La forme cellulaire de la protéine prion est très sensible à la protéinase K et se trouve complètement dégradée en sa présence (Oesch *et al.*, 1985). La forme pathogène PrPsc est partiellement résistante. L'effet de l'enzyme sur la PrPsc conduit à la production du fragment PrP27-20 pouvant faire de 27 à 30 kD.

## **I.1.2 Les maladies à prion**

### **I.1.2.1 Les principales caractéristiques**

Les maladies à prion ou encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) constituent des maladies neurodégénératives transmissibles toujours fatales affectant l'homme et de nombreuses autres espèces animales. Les principales caractéristiques des ESST sont :

**-cliniquement :** ces maladies rares comprennent généralement une longue période d'incubation cliniquement silencieuse (pouvant atteindre 40 ans chez l'homme) puis une phase clinique relativement courte (plusieurs mois) à évolution fatale, sans rémission et sans aucune réaction immunitaire détectable. Les symptômes sont : l'insomnie, la dépression, les désordres comportementaux, les problèmes de coordination, du langage, de la mémoire et des troubles de la perception. Ces manifestations s'accroissent au cours de la progression de la maladie pour conduire à la démence. La maladie est très complexe à diagnostiquer puisque la plupart des symptômes sont communs à plusieurs maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer. Aucun test de dépistage *ante mortem* n'est disponible actuellement et c'est l'autopsie qui révèle encore aujourd'hui un cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob.

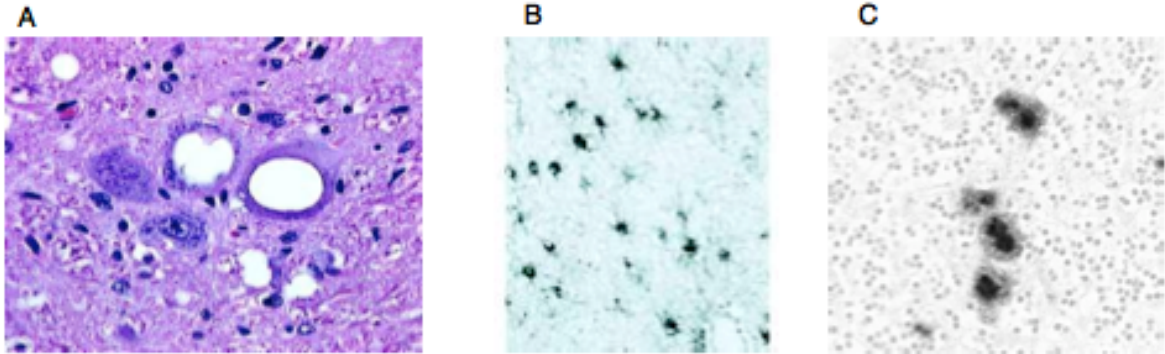
**-pathologiquement :** les ESST présentent trois types de lésions dans le système nerveux central (SNC) dont l'importance et la localisation varient d'une forme de maladie à une autre (Figure 6).

*INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*

1- une mort neuronale qui se traduit par une vacuolisation progressive des neurones donnant un aspect en éponge au SNC d'où le terme encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles.

2- une hypertrophie et une prolifération des cellules gliales (majoritairement astrocytaire).

3- une accumulation de la PrPsc souvent sous forme de plaques amyloïdes extracellulaires



A- Vacuolisation dans la substance grise d'un cerveau de mouton atteint de tremblante.

B- Astrocytose dans un cerveau d'homme atteint de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (marquage de la GFAP).

C- Plaques amyloïdes dans un cerveau atteint de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (marquage immunohistologique de la protéine prion).

Figure 6 : Lésions neuronales caractéristiques des ESST

**-caractère transmissible** : les ESST se caractérisent par leur caractère transmissible par voie naturelle (intra- ou inter-espèce) et expérimentale (Weissmann *et al.*, 2002).

### I.1.2.2 Etiologie et pathologies associées à la protéine prion

Les ESST humaines présentent trois étiologies différentes (Tableau 1) :

Etiologie	Maladie	Fréquence
<b>Sporadique</b> Origine inconnue : mutation somatique du gène <i>Prnp</i> ? Conversion spontanée ?	<b>Maladie de Creutzfeldt-jakob sporadique (sMCJ)</b>	85% ~1 à 2 cas par million d'habitants par an dans le monde
<b>Génétique ou familiale</b> Mutations autosomales dominantes du gène <i>Prnp</i> .	<b>Maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale (fMCJ)</b> <b>Insomnie fatale familiale (IFF)</b> <b>Syndrome de Gerstmann-Straüssler Scheinker (SGSS)</b>	10-15%
<b>Infectieuse ou iatrogène</b> Rites canibales  Administration d'hormones de croissance ou de gonadotrophines extraites d'hypophyses de cadavres humains, greffe de dure-mère, transplantation de cornée, contamination des instruments neurochirurgicaux.  Consommation de tissus bovins contaminés par l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)	<b>Kuru</b>  <b>Maladie de Creutzfeldt-Jakob Iatrogène (iMCJ)</b>  <b>Variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ)</b>	~2000 décès recensés dans les années 50 (Papouasie, Nouvelle-Guinée)  <5% (pays touchés : Etats-Unis, Royaume-Uni, France, Japon)  Royaume-Uni (~150 personnes), France (~14 personnes), cas isolés dans quelques autres pays.

Tableau 1 : Classification des ESST humaines

**-génétique ou héréditaire.** Les formes familiales des ESST sont liées à l'existence de mutations sur le gène *Prnp* codant pour la PrPc (voir le paragraphe 1.3.1. *Séquences et mutations*) (Collins *et al.*, 2004). Selon le type de mutations, on distingue :

a) le Syndrome de Gerstmann-Sträussler (GSS) qui se caractérise par un âge de début précoce (âge moyen 40 ans) et une durée d'évolution de plusieurs années (2 à 8 ans). La fréquence de cette maladie est de 1 à 10 individus sur 100 millions d'individus par an.

b) la maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale (fMCJ) qui est la forme génétique la plus fréquente même si elle ne représente que 5 à 10% des cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob. Elle touche des patients de 35 à 60 ans.

c) l'Insomnie Fatale Familiale qui se caractérise par une insomnie sévère associée à une démence chez des patients âgés de 40 à 50 ans.

**-sporadique.** La maladie apparaît alors qu'aucun signe avant-coureur n'ait été décelé. Le patient ne présente aucune mutation du gène *Prnp*, n'est pas en contact régulier avec des agents à risque telles que des farines animales et n'a aucune partie nerveuse (cervelle, moelle épinière) de bovin dans ses habitudes alimentaires régulières (Boutin, 1998). Toutefois, la MCJ sporadique est la forme la plus fréquente des ESST humaines (85% des cas de MCJ chez l'Homme) même si elle reste malgré tout une maladie rare (1 à 2 cas par million d'individus et par an).

**-infectieuse ou iatrogène.** Le développement de la maladie est dû à l'absorption d'une certaine quantité d'agent infectieux. Ce mode de contamination est diagnostiqué dans environ 5% des cas.

a) elle a été très largement décrite avec l'étude du Kuru. Découverte en 1957 par Gajdusek (Prix Nobel 1976) en Nouvelle Guinée, cette maladie endémique se transmettait entre les individus qui pratiquaient le cannibalisme (Gajdusek, 1977).

b) A ce jour, deux sources de contamination ont été recensées pour la maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène. Une contamination cérébrale ou oculaire : un peu plus d'une centaine de patients ont été contaminés à la suite de greffes de dure-mère ou de cornée. La contamination la plus importante et la plus connue a été observée par une contamination périphérique avec l'hormone de croissance extractive (hGH) : environ 99 cas à ce jour en France (Gibbs *et al.*, 1993 ; Huillard *et al.*, 1999).

c) Le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) a été décrit pour la première fois en 1996. Les patients sont significativement plus jeunes que dans les cas de MCJ sporadique ou familiale (âge moyen 27 ans). Aujourd'hui, il est couramment admis que le vMCJ résulte de la transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine à l'homme par consommation de tissus contaminés (Figure 7). De plus, très récemment, il a été proposé que l'agent infectieux provoquant le vMCJ, et ce contrairement à la forme sporadique, pouvait être transmis par voie sanguine lors de transfusion (Llewelyn *et al.*, 2004). A ce jour, le nombre de victimes du vMCJ s'élève à environ 170 cas : environ 156 cas en Angleterre, 20 en France (tableau 4), 1 en Italie, 1 au Canada, 3 en Irlande, 1 aux Etats-Unis, 1 au Japon, 1 au Portugal, 1 aux Pays-Bas, 1 en Arabie Saoudite et 1 probable en

Espagne. Une caractéristique du vMCJ est la présence de l'agent infectieux dans les tissus lymphoïdes périphériques, en particulier dans les amygdales, à l'inverse des autres formes de MCJ où la protéine prion pathogène est restreinte au SNC.

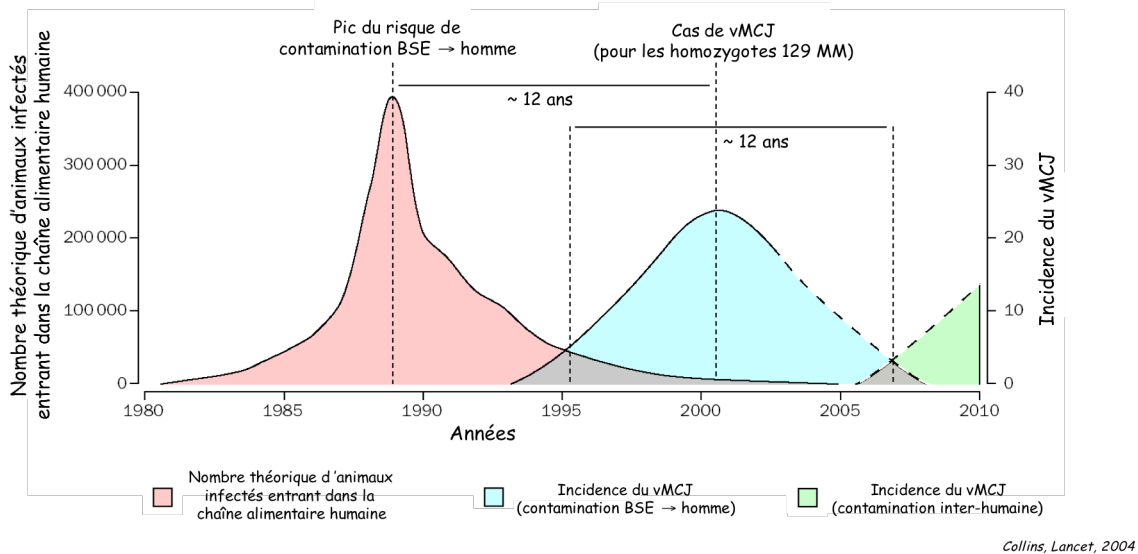


Figure 7 : Evolution au cours des années des cas théoriques d'ESB entrant dans la chaîne alimentaire humaine et des cas rapportés de vMCJ au Royaume Uni.

(d'après Collins et al., 2004)

### 1.1.2.3 Le système immunitaire et les maladies à prion

La longue période d'incubation qui précède les symptômes neurologiques suggère que d'importants événements de la pathogénicité devraient prendre place dans des sites extra-neuronaux. C'est notamment le cas des ESST d'origine iatrogène où l'agent infectieux doit migrer de son site périphérique d'exposition (tractus digestif ou peau) jusqu'au système nerveux central. Deux voies de neuro-invasion, étape conduisant à l'invasion du SNC après infection périphérique, ont été proposées : la lympho-invasion passant d'abord par le système lymphoréticulaire puis par les nerfs périphériques et la neuro-invasion directe. La contamination périphérique varie selon la souche de prion, le mode de contamination, l'âge et le fond génétique de l'hôte. Cependant, concernant les formes sporadiques et héréditaires de la maladie, l'accumulation de la PrP<sup>Sc</sup> débute probablement dans le système nerveux central et ne semble pas toucher les tissus

*INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*  
périphériques (pour revue : Aucouturier and Carnaud, 2002 ; Aguzzi and Heikenwalder, 2005).

#### *I.1.2.3.1 L'invasion lymphoréticulaire*

Ce mode d'invasion implique le système immunitaire et se compose de plusieurs phases :

- infection des cellules immunitaires associées au site de l'inoculation notamment les cellules dendritiques et les macrophages
- transport de l'agent infectieux vers les organes lymphoïdes
- réplication de la PrP<sup>sc</sup> par les cellules dendritiques folliculaires
- entrée dans le système nerveux périphérique (SNP)
- transport rétrograde de l'agent infectieux par le SNP
- entrée dans le SNC
- invasion du SNC

Après une infection par voie orale, le premier site où l'on observe une forte infectiosité se situe au niveau des plaques de Peyer de l'iléon distal (van Keulen *et al.*, 1996 ; Wells *et al.*, 1994). La porte d'entrée des prions par voie muqueuse est représentée par les cellules épithéliales microplissées ou cellules-M, déjà démontrées comme un site clé pour l'entrée de pathogènes par transport transépithélial (Neutra *et al.*, 1996). Ainsi, les prions exploiteraient la transcytose dépendante des cellules M pour accéder au système immunitaire. Après une infection par voie sanguine ou intrapéritonéale, la rate représente un autre site important d'accumulation de l'agent infectieux.

Contrairement aux lymphocytes T, diverses études ont montré que les lymphocytes B étaient impliqués dans la transmission des prions. En effet, l'inoculation d'une souche pathogène à des souris immunodéficientes a révélé que l'absence des lymphocytes B rendait les souris résistantes à l'infection (Klein *et al.*, 1997). Il semble que ce soit la présence des lymphocytes B et non l'expression de la PrP<sup>sc</sup> de ces cellules qui soit indispensable au développement de la pathogénèse. En effet, des souris déficientes en lymphocytes B ( $\mu$ MT) et immunologiquement reconstituées avec des précurseurs hématopoïétiques de souris invalidées pour le gène *Prnp* se sont montrées sensibles à l'infection (Aguzzi *et al.*, 2001). Comme l'absence de lymphocytes B est corrélée à une

### *INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*

modification de la micro-architecture des organes lymphoïdes secondaires et une diminution des cellules folliculaires dendritiques (FDC) et que les FDC ont été décrites pour accumuler la PrPsc (Jeffrey *et al.*, 2000), ce type cellulaire est vite apparu comme pouvant représenter un réservoir de la réplication et de l'accumulation de l'agent infectieux en périphérie (Kitamoto *et al.*, 1991). Les lymphocytes B semblent être impliqués dans la pathogénèse périphérique via leurs effets secondaires comme l'expression de cytokines telles que la lymphotoxine. Notamment lorsque l'on bloque l'interaction des FDC avec les lymphocytes B en traitant des souris avec une protéine de fusion LT-bR-Ig, bloquant l'interaction lymphotoxine a/b avec son récepteur LT-bR, l'accumulation de la PrPsc dans les centres germinatifs et l'entrée de l'agent infectieux dans le SNC sont inhibées (Montrasio *et al.*, 2000).

#### *1.1.2.3.2 L'interface neuro-immune*

La réplication et l'accumulation de la PrPsc dans les organes lymphoréticulaires sont requises pour amplifier les titres infectieux après infection par voie périphérique (Mabbott *et al.*, 2000). Par la suite, le transport de l'infectiosité depuis les organes lymphoïdes vers le SNC s'établit par les nerfs périphériques. La neuro-invasion est modulée par le niveau d'expression de la PrPc (Glatzel and Aguzzi, 2000 ; Race *et al.*, 2000). En effet, la PrPc peut être transportée depuis les terminaisons axonales par un mécanisme de transport rétrograde (Moya *et al.*, 2004) et sa surexpression a été décrite comme modulant la neuro-invasion le long des nerfs sympathiques.

### I.1.3 Les thérapies contre les maladies à prions

#### I.1.3.1 Généralités

Globalement, l'incidence des ESST humaines est faible (1 à 2 cas par an et par million d'individus en France) (Tableau 2). Toutefois, l'absence de tests diagnostics *anté-mortem* et la possible transmission de l'agent pathogène par transfusion sanguine ainsi que leur évolution toujours mortelle nécessitent la mise en place de traitements prophylactiques ou thérapeutiques efficaces. Plusieurs essais thérapeutiques ont été tentés chez quelques patients avec la quinacrine et le pentosane polysulfate. Cependant les résultats semblent limités, probablement en raison d'un traitement effectué au moment où les signes cliniques sont déjà installés et où l'accumulation de l'agent infectieux dans le SNC est très importante.

Année	Suspensions signalées	sMCJ décédé	iMCJ décédé		fMCJ décédé	vMCJ décédé*	Total MCJ
			hGH	Autre			
1992	71	38	7	2	4	0	51
1993	63	35	12	1	7	0	55
1994	93	46	5	3	7	0	61
1995	114	59	8	1	6	0	74
1996	201	6	10	0	10	1	89
1997	296	80	6	1	4	0	91
1998	459	81	8	1	13	0	103
1999	590	92	8	0	5	0	105
2000	823	87	9	0		1	105
2001	1103	110	5	0	15	1	131
2002	1062	108	2	2	13	3	128
2003	1086	10	8	1	10	0	127
2004	881	97	8	0	9	2	116
2005	930	82	4	1	10	6	103
2006	1315	124	5	0	7	6	142
2007	824	47	0	0	3	0	50

sMCJ: forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ; iMCJ : forme iatrogène de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ;

fMCJ : forme génétique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ; vMCJ : variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ; hGH : hormone de croissance extractive

\* Ces 20 cas de vMCJ présentent les caractéristiques suivantes : Il s'agit de 9 hommes et 11 femmes. La médiane des âges lors de leur décès est de 37 ans (entre 19 et 58 ans). Parmi eux, 5 personnes résidaient en Ile-de-France et 15 en province.

Tableau 2 : Nombre annuel de cas certains ou probables de maladie de Creutzfeldt-Jakob en France entre 1992 et 2007.

(<http://www.invs.sante.fr>)



## *INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*

Le traitement thérapeutique peut intervenir à différents niveaux dans les processus de synthèse et d'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> :

- inhibition de la synthèse de la PrP<sup>c</sup>
- stabilisation de la PrP<sup>c</sup> rendant la modification conformationnelle moins favorable
- inhibition de l'interaction PrP<sup>c</sup>/PrP<sup>sc</sup>
- déstabilisation et augmentation de la clearance de la PrP<sup>sc</sup>
- prévention de la conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup>

Plusieurs approches thérapeutiques sont envisageables :

-approche curative après la neuro-invasion par compensation des dommages neuronaux et inhibition de la réplication de l'agent infectieux. Les molécules doivent pouvoir passer la barrière hématoencéphalique.

-approche curative avant la neuro-invasion. Les molécules doivent agir au niveau des cellules immunitaires et/ou de l'interface neuro-immune.

-Prophylaxie. cette stratégie nécessite la stimulation du système immunitaire bloquant la réplication de l'agent des ESST au niveau périphérique.

### **I.1.3.2 Chimiothérapie**

#### *I.1.3.2.1 Le Rouge Congo*

Le Rouge Congo est un pigment couramment utilisé en histopathologie pour marquer les dépôts de protéines amyloïdes. *In vitro*, cette molécule a montré qu'elle inhibait l'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> dans des cellules chroniquement infectées (Caspi *et al.*, 1998). *In vivo*, les résultats sont controversés.

#### *I.1.3.2.2 Dérivés de l'acridine et de la phénothiazine*

De nombreux dérivés de l'acridine et de la phénothiazine inhibent l'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> dans des modèles de cellules en culture (Korth *et al.*, 2001). Parmi eux, la quinacrine (anti-paludéen) et la chlorpromazine (anti-psychotique), connus pour leur capacité à franchir la BHE, ont fait l'objet de tests cliniques chez des patients souffrant de

MCJ et vMCJ. Mais aucun effet bénéfique n'a été rapporté (Follette, 2003 ; Nakajima *et al.*, 2004).

#### *1.1.3.2.3 Polyanions*

Les polyanions sont des molécules très fortement chargées qui interagissent avec la membrane cellulaire. Ils sont connus pour inhiber l'entrée de certains virus de manière non spécifique. De nombreux polyanions bloquent l'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> dans des cellules en culture chroniquement infectées et allongent la période d'incubation de souris ou hamsters inoculés par voie périphérique (Caughey and Raymond, 1993; Farquhar *et al.*, 1999; Ladogana *et al.*, 1992). A l'exception du pentosan polysulfate, ils sont sans effet après la neuro-invasion. L'inconvénient majeur de la plupart de ces drogues polyanioniques repose sur leur activité anti-coagulante et leur faible capacité à franchir la BHE.

#### *1.1.3.2.4 Tétracyclines*

Les tétracyclines présentent des capacités à passer la BHE. Des études utilisant des fibrilles amyloïdes générées par des peptides synthétiques 106-126 ont montré que la tétracycline pouvait prévenir l'agrégation et la résistance aux protéases de ces peptides (Tagliavini *et al.*, 2000).

#### *1.1.3.2.5 Les antibiotiques polyéniques*

Les antibiotiques polyéniques sont des agents antifongiques dérivés de l'amphotéricine B. Dans un modèle expérimental, l'utilisation de l'amphotéricine B a montré une réduction de l'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> ainsi qu'un prolongement du temps de survie des animaux (McKenzie *et al.*, 1994; Xi *et al.*, 1992). Le développement d'un dérivé moins toxique, le MS-8209, a montré que ce nouveau composé permettait d'augmenter significativement le temps de survie des animaux, pouvant aller jusqu'à 100% chez le hamster (Demaimay *et al.*, 1994). L'effet le plus remarquable de cette molécule est son efficacité même lors d'administration tardive contrairement à toutes les autres molécules testées (Adjou *et al.*, 1995; Demaimay *et al.*, 1997).

### I.1.3.3 Immunothérapie

#### I.1.3.3.1 Généralités

Bien qu'aucune réponse immunitaire spécifique ne soit stimulée chez des individus infectés en raison de la tolérance naturelle de l'hôte pour la PrPc (voir paragraphe 3-3-3), plusieurs essais thérapeutiques passant par une intervention immunitaire ont été évalués.

Les motifs CpG (séquences non méthylées de cytosine-guanosine d'ADN), signatures habituelles des procaryotes, peuvent stimuler le système immunitaire inné via le récepteur TLR9 exprimé par différentes cellules de l'immunité (cellules dendritiques, macrophages). L'administration d'oligodéoxynucléotides CpG a permis d'augmenter très significativement la période d'incubation de souris infectées (Sethi *et al.*, 2002). Toutefois, une étude récente semble montrer que cet effet prophylactique se fait aux dépens d'une destruction des follicules lymphoïdes dans la rate limitant la faisabilité d'un tel traitement chez l'homme (Heikenwalder *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les composants du complément pourraient jouer un rôle dans la propagation de l'agent infectieux ainsi que dans la pathogénèse dans les premiers jours de l'infection. Le traitement de souris avec un inhibiteur du C3 avant l'inoculation intrapéritonéale prolonge le temps de survie de 24 jours et des souris invalidées pour le gène C1q développent des signes cliniques plus tardivement que des souris de type sauvage (Mabbott *et al.*, 2001).

Une autre approche pour bloquer, après une infection extra-neuronale, l'invasion périphérique de la PrPsc consiste à jouer sur la maturation des cellules qui la répliquent comme les cellules folliculaires dendritiques. Des cytokines produites par les lymphocytes B comme les lymphotoxines  $LT\alpha$  et  $LT\beta$  sont importantes dans le maintien de la microarchitecture des organes lymphoïdes secondaires et l'état différencié des cellules folliculaires dendritiques (Aguzzi and Heikenwalder, 2005). Ainsi, l'administration, avant inoculation, d'une protéine chimère recombinante constituée de deux récepteurs à la lymphotoxine  $\beta$  ( $LT-\beta R$ ) dimérisés par fusion avec la région Fc d'une immunoglobuline humaine entraîne une dédifférenciation des cellules folliculaires dendritiques retardant la neuroinvasion. Toutefois, lorsque le traitement est réalisé après inoculation, l'effet prophylactique est modéré (Montrasio *et al.*, 2000 ; Mabbott *et al.*, 2003).

I.1.3.3.2 *Immunothérapie passive*

I.1.3.3.2.1 Les anticorps disponibles à ce jour

Au cours de ces dix dernières années, de nombreux travaux ont montré que les anticorps anti-PrP étaient capables d'inhiber l'accumulation de la PrP<sup>Sc</sup> dans des cellules en culture chroniquement infectées et de retarder le développement de la maladie *in vivo* dans des modèles murins après des inoculations périphériques même lorsque le traitement est initié tardivement (Beringue *et al.*, 2004 ; Cardinale *et al.*, 2005; Enari *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Peretz *et al.*, 2001 ; Perrier *et al.*, 2004 ; Heppner *et al.*, 2001; White *et al.*, 2003 ; Féraudet *et al.*, 2005).

La grande majorité des anticorps anti-PrP<sup>C</sup> disponibles à ce jour ont été obtenus par immunisation de souris ou de lapins invalidés pour le gène *Prnp*, par des peptides de PrP (Barry *et al.*, 1988 ; Di Martino *et al.*, 1991 ; Harmeyer *et al.*, 1998 ; Yokoyama *et al.*, 1996), des protéines prions recombinantes (Kim *et al.*, 2004 ; Krasemann *et al.*, 1996 ; Matucci *et al.*, 2005 ; Zanusso *et al.*, 1998) ou des préparations de SAFs obtenus à partir d'échantillons infectieux (Barry *et al.*, 1985 ; Kascsak *et al.*, 1987 ; Kim *et al.*, 2004). Ces anticorps sont dirigés spécifiquement contre des PrP<sup>C</sup> recombinantes et/ou la PrP<sup>C</sup> native de différentes espèces. En revanche, la question de la reconnaissance spécifique de la PrP<sup>Sc</sup> par ces anticorps est fortement controversée.

I.1.3.3.2.2 Les mécanismes d'inhibition des anticorps sur la PrP<sup>Sc</sup>

Cela fait 20 ans qu'il a été montré que les anticorps anti-PrP<sup>C</sup> étaient capables de neutraliser le pouvoir infectieux d'un tissu infecté provenant d'un animal atteint d'ESST (Gabizon *et al.*, 1988). De nombreux travaux ont, à ce jour, rapporté l'effet antagoniste des anticorps anti-PrP sur la réplication de la PrP<sup>Sc</sup> dans des modèles de cellules chroniquement infectées (Tableau 3) (Beringue *et al.*, 2004; Cardinale *et al.*, 2005 ; Donofrio *et al.*, 2005 ; Enari *et al.*, 2001; Gilch *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Peretz *et al.*, 2001; Perrier *et al.*, 2004). Ainsi les anticorps monoclonaux anti-PrP sont capables de prévenir l'infection de cellules permissives (Enari *et al.*, 2001) et d'inhiber la réplication

*INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*

et l'accumulation de la PrPsc de façon dose dépendante (Perrier *et al.*, 2004 ; Beringue *et al.*, 2004 ; Féraudet *et al.*, 2005).

Nature	Nom	Immunogène	Espèce immunisée	Isotype	Epitope	IC50	Référence
AcM	6H4	PrP recombinante bovine	Souris <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup>	IgG1	144-152	ND	Enari, PNAS 2001
	Bar223	PrP recombinante ovine		IgG2a	Conformationnel	ND	Feraudet, JBC 2005
	Bar233			IgG2b	141-151	13,3nM	
	Bar236			IgG2c	Conformationnel	0,7nM	
	SAF34			SAF de hamster syrien traités PK et dénaturés	IgG2a	59-89	
	SAF61	IgG2a			144-152	5,3nM	
	Sha31	SAF de hamster syrien traités PK et non dénaturés		IgG1	145-152	0,7nM	Feraudet, JBC 2005
	110	SAF de souris non traités PK et dénaturés		IgG2b	59-65 et 83-89	1,2nM	Kim, J Gen Virol 2004
	72			IgG1	Discontinu 89-231	4,1nM	
	31C6	PrP recombinante de souris 23-231		IgG1	143-149	0,7nM	
	44B1	PrP recombinante de souris 89-231		IgG2a	Discontinu 155-231	1,7nM	
	ICSM18	PrP recombinante humaine repliée en hélice $\alpha$		IgG1	146-159	3,3nM	Beringue, JBC 2004
	ICSM35	PrP recombinante humaine repliée en feuillet $\beta$		IgG2b	96-109	0,03nM	White, Nature 2003
Fab	D18	SAF de hamster syrien traités PK incorporés dans les liposomes	-	132-156	9nM	Peretz, Nature 2001	
	D13		-	95-103	12nM		
	R1		-	220-231	50nM		
	R2		-	225-231	40nM		
ScFv	8H4	PrP recombinante de souris	-	175-185	ND	Cardinale, JBC 2005	

AcM : anticorps monoclonal

Tableau 3 : Liste non exhaustive d'anticorps anti-PrPc inhibant la réplication de la PrPsc *ex vivo*

*INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*

Les mécanismes d'inhibition sont encore mal connus à ce jour. Des études utilisant des anticorps anti-PrP différents ont permis la proposition de mécanismes hypothétiques d'action des anticorps (Figure 8) :

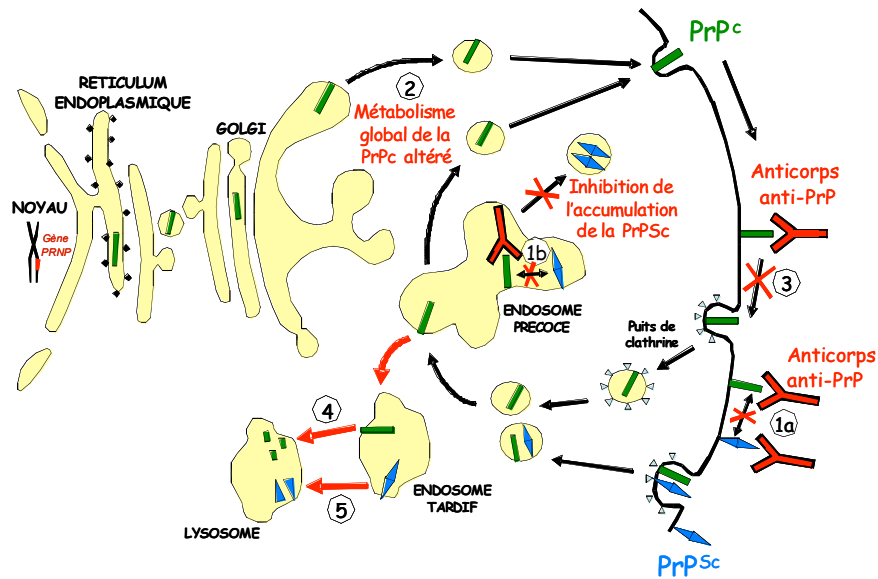


Figure 8 : Mécanismes hypothétiques d'inhibition de la PrPsc par les anticorps

**-inhibition de contact** de la PrPc et de la PrPsc soit en surface cellulaire (1a) soit dans des compartiments intracellulaires en cas d'internalisation des anticorps (1b) (Peretz *et al.*, 2001)

**-perturbation du métabolisme global** de la PrPc en cas d'internalisation des anticorps (2) (Cardinale *et al.*, 2005)

ralentissement le processus de recyclage de la PrPc (3) (Kim *et al.*, 2004)

**-augmentation de la dégradation** de la PrPc, substrat pour la formation de PrPsc (4) (Perrier *et al.*, 2004) ou de la PrPsc (5) (Beringue *et al.*, 2004)

### I.1.3.3.3 Immunothérapie active

Induire une réponse immunitaire anti-PrP *in vivo* chez des souris de type sauvage constitue toujours un véritable défi en raison de la tolérance naturelle de l'hôte pour la PrPc, protéine ubiquiste à la fois dans les compartiments neuronaux et extraneuronaux (Krasemann *et al.*, 1996).

#### I.1.3.3.3.1 Généralités sur la tolérance du système immunitaire

L'une des caractéristiques du système immunitaire normal est qu'il est capable de répondre à une variété de pathogènes sans pour autant réagir aux antigènes de l'individu. Cette absence de réponse aux antigènes du soi est appelée **tolérance immunitaire**. Cependant, des lymphocytes capables de reconnaître des antigènes du soi sont constamment formés au cours du processus de maturation des lymphocytes. Ainsi il existe des mécanismes qui empêchent le déclenchement de réponses immunitaires contre les antigènes du soi et par conséquent permettent de distinguer les antigènes du soi et du non-soi. La tolérance immunitaire aux antigènes du soi peut être induite lorsque les lymphocytes rencontrent au cours de leur développement ces antigènes dans les organes lymphoïdes primaire (tolérance centrale) ou lorsque les lymphocytes matures les rencontrent dans les tissus périphériques (tolérance périphérique).

#### La tolérance des lymphocytes T

**-Tolérance centrale des lymphocytes T.** Les lymphocytes T, en cours de développement dans le thymus, sont des cellules immatures présentant des récepteurs capables de reconnaître à la fois des antigènes propres à l'individu et étrangers. Au cours de leur maturation, ces lymphocytes vont subir une double sélection qui constitue le mécanisme principal de la tolérance centrale : 1) une *sélection positive* où seuls les lymphocytes dont les récepteurs interagissent avec le CMH de l'individu vont continuer leur maturation, 2) une *sélection négative* : si un lymphocyte immature interagit avec une forte affinité avec un antigène du soi présenté sous forme d'un peptide lié à une molécule

*INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*

du CMH, cette cellule recevra des signaux déclenchant l'apoptose (Figure 9). Un grand nombre de protéines du soi qui semblaient être exprimées principalement, voire exclusivement, dans les tissus périphériques sont en fait également exprimées par les cellules épithéliales thymiques. Un facteur de transcription appelé AIRE est responsable de l'expression thymique de ce type d'antigènes (Kont *et al.*, 2007 ; Scarpino *et al.*, 2007). Ainsi, la tolérance centrale des lymphocytes T est un mécanisme important pour se protéger des réponses immunes dirigées contre une très large variété d'antigènes du soi. Les lymphocytes immatures qui reconnaissent des antigènes du soi avec une très forte affinité dans le thymus se différencient en lymphocytes T régulateurs et migrent dans les tissus périphériques. Les fonctions de ces lymphocytes T régulateurs seront décrites dans la partie tolérance périphérique.

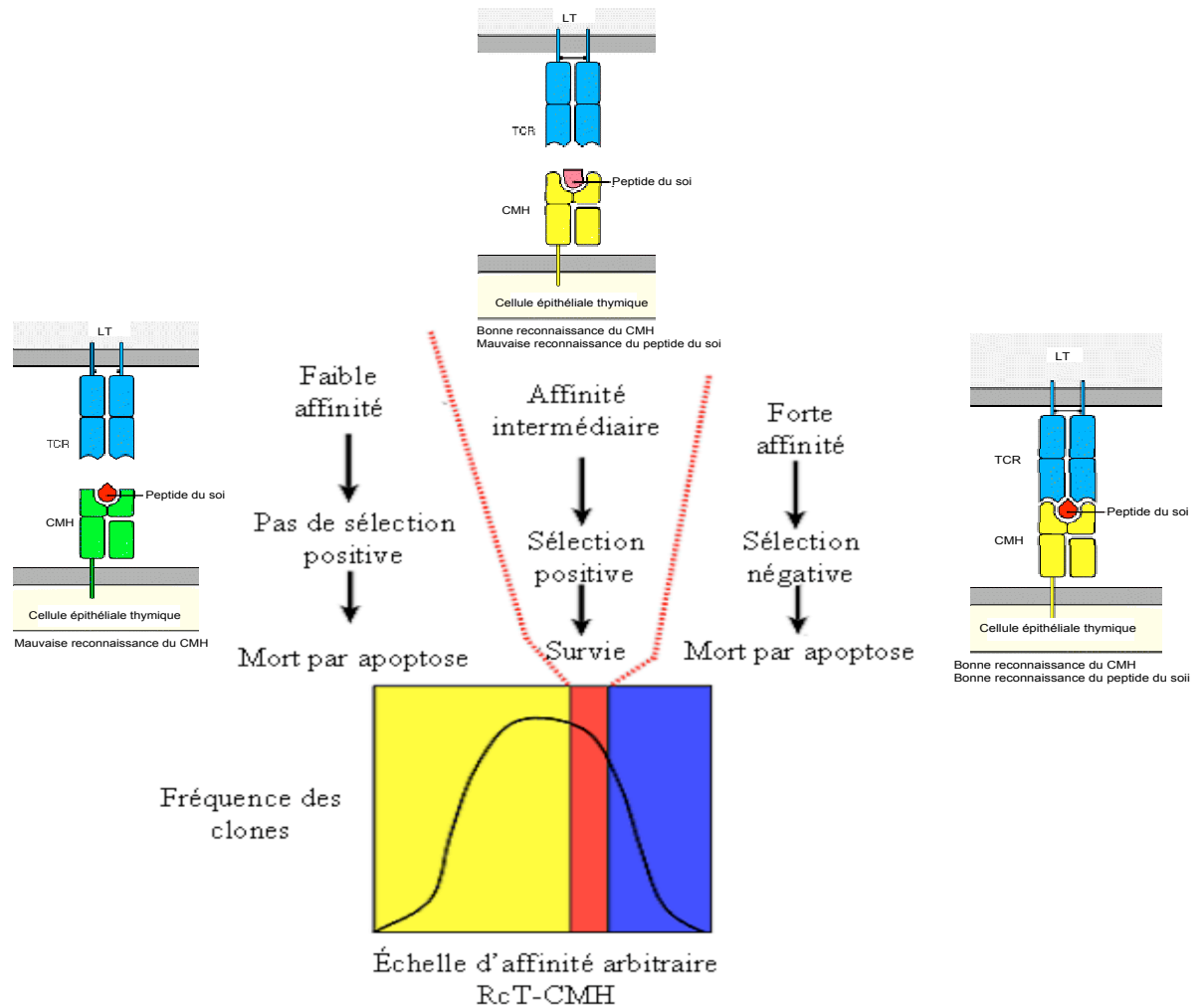


Figure 9 : Sélection thymique des lymphocytes T immatures.



**-Tolérance périphérique des lymphocytes T.** La tolérance périphérique est induite lorsque les lymphocytes T matures reconnaissent des antigènes du soi dans les tissus périphériques, entraînant leur inactivation fonctionnelle (ou *anergie*) due à l'absence de signaux adéquats de molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T naïfs (lymphocytes rencontrant pour la première fois son antigène spécifique) (Figure 10) ou leur contrôle par les lymphocytes T régulateurs (Figure 11). Dans la réponse immunitaire adaptative, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle central dans l'initiation et l'orchestration de la réponse immunitaire. Actuellement, il y a de plus en plus d'études démontrant leur importance également en tant que régulateurs négatifs de cette réponse périphérique et donc une implication dans le mécanisme de tolérance du système immunitaire. Notamment, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> exprimant le facteur de transcription Foxp3 et sécrétant de l'interleukine 10 et du TGFβ (T<sub>R</sub>) sont les lymphocytes T régulateurs les plus étudiés (Thompson and Powrie, 2004 ; Powrie and Maloy, 2003 ; Maloy and Powrie, 2001 ; O'Garra and Vieira, 2004 ; Kronenberg and Rudensky, 2005 ; Jordan *et al.*, 2001 ; Baecher-Allan and Hafler, 2006). Ces T<sub>R</sub> ont été identifiés en premier lieu pour leur capacité à prévenir des maladies auto-immunes chez des souris, il est maintenant clair que ces cellules jouent un rôle beaucoup plus général dans la régulation de la réponse immunitaire. Ainsi des études ont montré leur implication dans la tolérance à la flore intestinale (Singh *et al.*, 2001) ou post-transplantation (Wood and Sakaguchi, 2003) et dans la tolérance maternelle vis à vis du fœtus (Aluvihare *et al.*, 2004). Toutefois, l'activation des T<sub>R</sub> ne semble pas toujours bénéfique pour l'hôte. En effet, ces cellules peuvent bloquer une réponse anti-tumorale (Sakaguchi *et al.*, 2001) ou empêcher une réponse protectrice contre des pathogènes (Hisaeda *et al.*, 2004).

*INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*

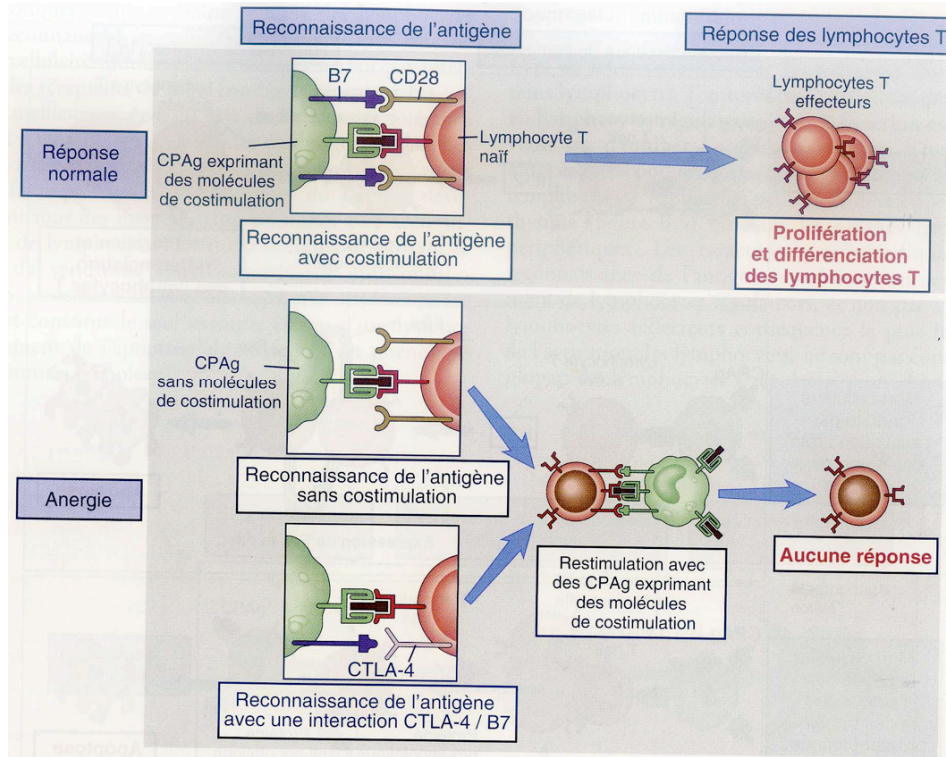
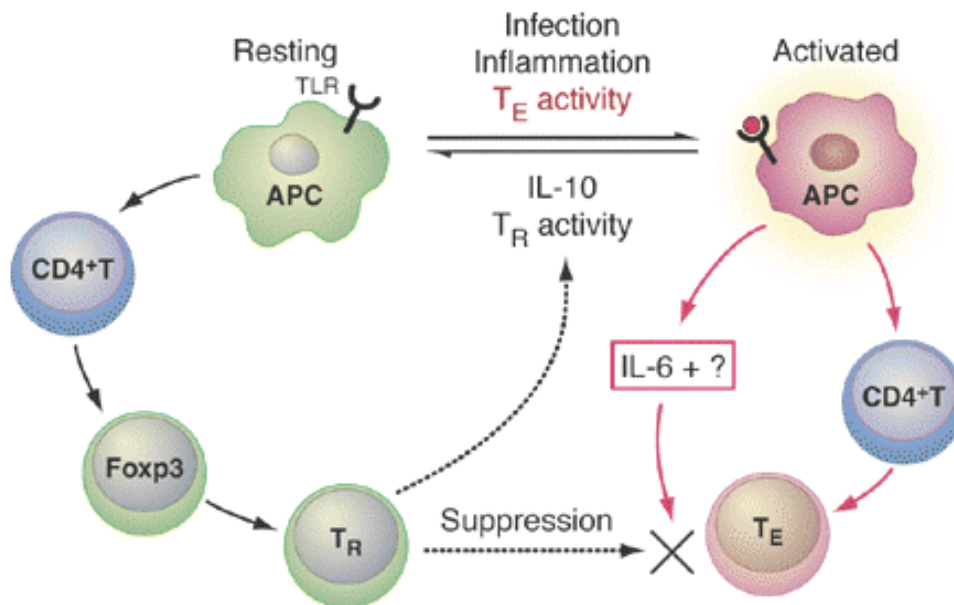


Figure 10 : Anergie des lymphocytes T.

(d'après « les bases de l'immunologie fondamentale et clinique » aux éditions Elsevier)



TR : lymphocyte T régulateur ; TE : lymphocyte T effecteur ; APC : cellule présentatrice de l'antigène.

Figure 11 : Notion de lymphocytes T régulateurs.

(d'après Powrie et al., 2003)

La tolérance des lymphocytes B

**-Tolérance centrale des lymphocytes B.** Lorsqu'un lymphocyte B interagit fortement avec un antigène du soi dans la moelle osseuse, soit il reçoit des signaux d'apoptose (sélection négative) soit il modifie la spécificité de son récepteur (Figure 12). Ainsi des lymphocytes B qui reconnaissent des antigènes du soi, sont capables de réactiver leur machinerie de recombinaison des gènes codant pour les immunoglobulines : ce processus porte le nom de « receptor editing » (ou correction du récepteur). La tolérance centrale des lymphocytes B est moins stricte que pour les lymphocytes T. On ne sait pas quels antigènes du soi présents dans la moelle osseuse déclenchent un processus d'apoptose ou de « receptor editing », pas plus qu'on ne sait pourquoi un lymphocyte B autoréactif donné subit l'un ou l'autre processus.

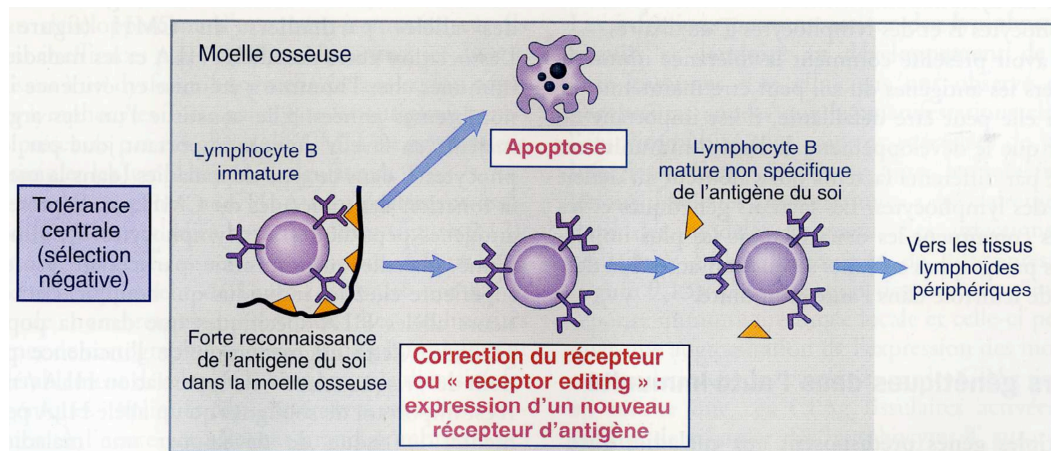


Figure 12 : Sélection négative et correction du récepteur des lymphocytes B immatures.

(d'après « les bases de l'immunologie fondamentale et clinique » aux éditions Elsevier)

**-Tolérance périphérique des lymphocytes B.** Les lymphocytes B matures qui rencontrent des antigènes du soi présents à fortes concentrations dans les tissus lymphoïdes périphériques deviennent anergiques et ne sont pas en mesure de répondre à nouveau à cet antigène. Une hypothèse postule que ces lymphocytes B pourraient devenir anergiques s'ils reconnaissent un antigène sans l'aide de lymphocytes T (car les lymphocytes T auxiliaires sont absents ou tolérants) (Figure 13). La production d'anticorps autoréactifs notamment lors du lupus érythémateux serait provoquée par un dysfonctionnement de la tolérance à la fois des lymphocytes B et des lymphocytes T auxiliaires (Melchers *et al.*, 2006 ; Kytтарis *et al.*, 2005).

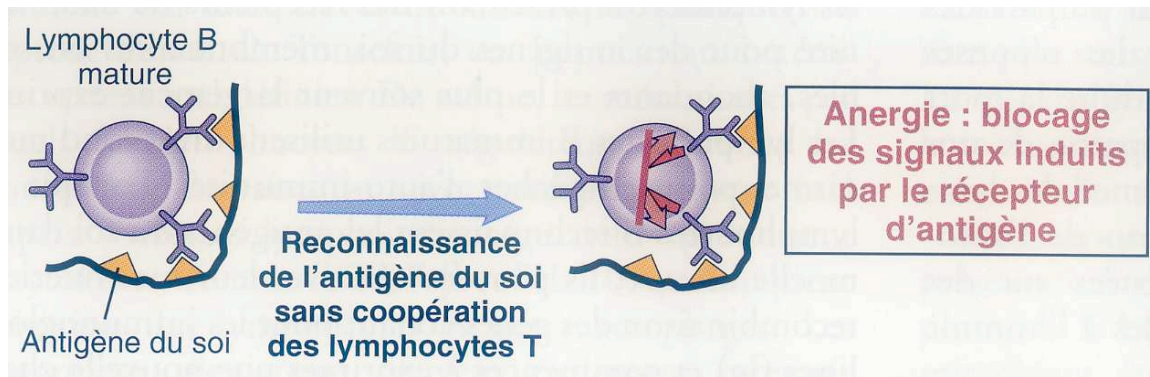


Figure 13 : Tolérance périphérique des lymphocytes B.

(d'après « les bases de l'immunologie fondamentale et clinique » aux éditions Elsevier)

I.1.3.3.2 Les essais d'immunothérapie active

De nombreux protocoles d'immunisation ont été testés pour essayer de rompre la tolérance naturelle à la PrPc essentiellement dans des modèles expérimentaux de souris (Tableau 4). Différents antigènes ont été étudiés : des protéines prions recombinantes (Koller *et al.*, 2002 ; Polymenidou *et al.*, 2004 ; Sigurdsson *et al.*, 2002), des polyprotéines PrP-PrP (Gilch *et al.*, 2003 ; Polymenidou *et al.*, 2004), des peptides synthétiques (Rosset *et al.*, 2004 ; Schwarz *et al.*, 2003 ; Souan *et al.*, 2001 ; Gregoire *et al.*, 2005), des polypeptides (Arbel *et al.*, 2003) ou encore des antigènes de PrP couplés à des protéines porteuses (Bainbridge *et al.*, 2004 ; Koller *et al.*, 2002 ; Schwarz *et al.*, 2003). L'utilisation de puissants adjuvants a également été étudiée: Freund's (Arbel *et al.*, 2003 ; Koller *et al.*, 2002 ; Polymenidou *et al.*, 2004 ; Sigurdsson *et al.*, 2002 ; Souan *et al.*, 2001), Montanide IMS-1313 (Schwarz *et al.*, 2003), TiterMax (Gilch *et al.*, 2003), bactériophage filamenteux (Arbel *et al.*, 2003), oligonucléotide CpG (Rosset *et al.*, 2004), toxine cholérique (Bade *et al.*, 2006) ou des combinaisons (Gilch *et al.*, 2003).

Ces études ont montré la faisabilité d'induire une réponse humorale anti-PrP chez des souris de type sauvage. Toutefois, les titres en anticorps anti-PrP reportés dans ces travaux sont faibles et surtout l'effet thérapeutique de ces anticorps *in vivo*, si évalué, est très modéré voire inexistant (Polymenidou *et al.*, 2004 ; Sigurdsson *et al.*, 2002 ; Souan *et al.*, 2001 ; Schwarz *et al.*, 2003). Or, deux études indépendantes ont montré que seuls les anticorps reconnaissant la PrPc native exprimée à la surface des cellules présentaient une efficacité thérapeutique (Heppner *et al.*, 2001 ; White *et al.*, 2001). Or, aucune étude d'immunisation active chez des souris de type sauvage n'avait pu satisfaire ce critère jusqu'à une période récente. En effet, les travaux de Nikles *et al.* ont pu mettre en évidence la production d'anticorps anti-PrPc native chez des souris de type sauvage après une vaccination intraveineuse par des particules rétrovirales recouvertes de PrP tronquée (Nikles *et al.*, 2005). Bien que cette réponse humorale était nettement plus faible que chez des souris invalidées pour le gène *Prnp* et que l'effet thérapeutique *in vivo* n'ait pas été évalué, cette étude ouvre la voie de nouvelles stratégies d'immunisation active moins classiques. Ainsi pour essayer d'augmenter la production d'anticorps dirigés contre une conformation native de l'antigène, deux protocoles d'immunisation génique ont été récemment étudiés (voir chapitre 3) (Fernandez-Borges *et al.*, 2006 ; Nitschke *et al.*,

*INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*

2007). Ces études étaient toutes les deux basées sur des injections d'ADN nu et n'ont pas permis d'obtenir des résultats concluant d'une part en terme de titre en anticorps dirigés contre la PrPc native et d'autre part en terme d'efficacité thérapeutique.

De plus, les travaux de Nikles renforcent l'idée que la difficulté à générer une réponse humorale spécifique et efficace due à la tolérance immunitaire à la PrPc, n'est probablement pas confinée à une tolérance des lymphocytes B mais est essentiellement liée à une tolérance périphérique des lymphocytes T CD4+, régulateurs cruciaux de la réponse anticorps.

*INTRODUCTION : La protéine prion et les maladies à prions*

Antigène/Adjuvant	Espèce immunisée	Mode d'injection	Immunisations/ intervalle(jours)	Mode d'inoculation	Effet thérapeutique	Référence
Peptides PrP restreint CMHII/CFA	Souris (NOD, C57BL/6, A/J)	patte arrière, sc	2/10	ip <sup>c</sup>	N	Souan, 2001
RecPrP23-230 /CFA	Souris (CD-1)	ip	8/14 <sup>a</sup> 6-7/30 <sup>b</sup>	ip	PrS	Sigurdsson, 2002
RecPrP23-230-DnaK/CFA	Souris (Balb/c)	ip	3/7-14	nd	nd	Koller, 2002
MAP (peptide de hélice 1)/FA	Souris (Balb/c)	ip	5/14	nd	nd	Arbel, 2003
RecPrP90-231 (monomère, dimère)/CFA	Souris (C57BL/6)	sc	3/21	nd	nd	Gilch, 2003
Peptides PrP-KLH/Montanide IMS 1313	Souris (NMRI)	ip	6/21-28	oral	PrS	Schwarz, 2003
Peptides PrP/CFA	Souris (C57BL/6)	patte arrière, sc	2/10	ic ou ip	PrS	Tal, 2003
RecPrP23-231 (monomère, dimère)/CFA ou IFA	Souris (F1)	sc et ip	3/14	ip	-	Polymenidou, 2004
Peptides PrP (30-mer)/CFA ou IFA+CpG	Souris (C57BL/6)	sc	2/10-14	nd	nd	Rosset, 2004
Peptides PrP (30-mer)/CpG	Souris (C57BL/6)	sc	2/10	nd	nd	Gregoire, 2005
Peptides PrP de hamster-KLH/CFA ou IFA	Hamster (Golden Syrian)	im, sc, id	3/9-11 <sup>a</sup> 5/19-24 <sup>b</sup>	ip	-	Magri, 2005
ADN-PrP bovine/Lipofectine	Souris (balb/c, BTPrp-TgM)	im et sc	3-4/17-195	oral	D	Muller, 2005
Retrovirus recouvert de PrP/CpG, CFA, IFA, Alum	Souris (C57BL/6)	iv et sc	2/14	nd	nd	Nikles, 2005
RecPrP25-242 bovine-KLH/CFA	Souris (Balb/c, NZB/NZWf1)	ip	3/14	nd	nd	Andrievskaia, 2006
ADN-PrP-LIMP-II/-	Souris (129/ola)	im	3/14	ic	PrS	Fernandez-Borges, 2006
RecPrP25-242 bovine/CFA ou IFA	Souris Balb/c	ip	5/14	ip	PrS	Ishibashi, 2006
Peptide PrP bovine/CFA ou IFA	Lapin	sc	3/35-42	nd	nd	Oboznaya, 2007
PrP (monomère, dimère)/Salmonelle, alum	Souris CD-1	ig	3/7-28	oral	A,P	Goni, 2005
RecPrP90-231/CT	Souris Balb/c	in	4/14-20	oral	A, PrS	Bade, 2006
RecPrP32-242 bovine-LTB/mLT	Souris Balb/c	in	3-6/14	nd	nd	Yamanaka, 2006

<sup>a</sup>avant inoculation, <sup>b</sup> après inoculation, <sup>c</sup> infection dans une tumeur, - aucun effet thérapeutique, A atténuation de la maladie, D accumulation de la PrPsc retardée, P protection contre la maladie, PrS prolongation de la durée de vie, sc subcutanée, ip intrapéritonéale, im intramusculaire, iv intraveineux, ig intragastrique, in intranasale, ic intracérébrale, CFA adjuvant de Freund complet, IFA adjuvant de Freund incomplet, FA adjuvant de Freund, BTPrp-TgM souris transgénique exprimant la PrP bovine, CT toxine cholérique, LIMP-II protéine lysosomale II, LTB partie ligande de l'enterotoxine, MAP peptide muti-antigénique

Tableau 4 : Liste des essais d'immunisation active contre les maladies à prions.

## I.2 Généralités sur l'immunothérapie

### I.2.1 Généralités sur les anticorps

Les anticorps ou immunoglobulines sont des glycoprotéines membranaires ou solubles produites par les lymphocytes B différenciés appelés plasmocytes. Les immunoglobulines (Ig) peuvent être classées en cinq groupes isotypiques qui se différencient par leur structure, leur taille, leur charge électrique et leur fonction: IgA, IgD, IgE, IgG et IgM (pour revue : Janeway *et al.*, Immunobiology, 2004).

#### I.2.1.1 Structure des anticorps

Dans les années 1950 et 1960, des expériences menées par R. Porter et G. Edelman ont permis d'élucider la structure de base d'un anticorps, ce qui leur a valu le prix Nobel en 1972. L'unité structurale de base d'un anticorps comporte 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes identiques (chaînes H pour *heavy*) et 2 chaînes légères identiques (chaînes L pour *light*) (Figure 14).

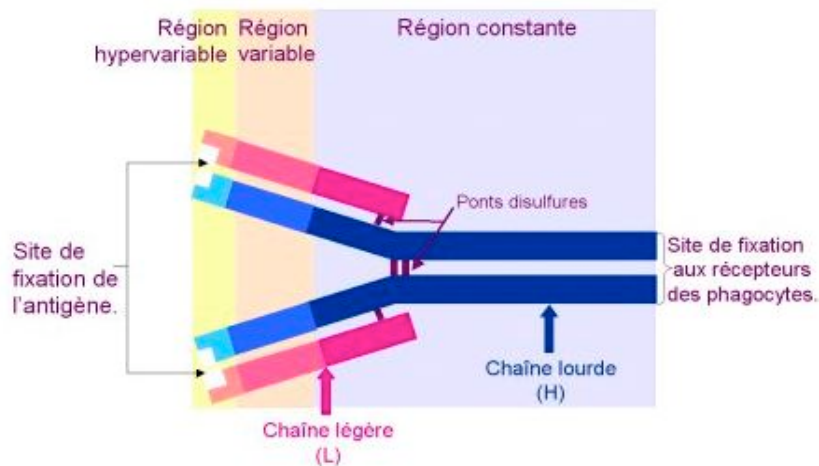


Figure 14 : Structure générale d'un anticorps



*I.2.1.1.1 Chaînes lourdes*

Elles varient selon les différentes classes ou isotypes d'immunoglobulines : la chaîne lourde g, a, m, d ou e pour les IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE, respectivement. Chaque chaîne lourde comporte une séquence d'environ 450 acides aminés (poids moléculaire : 50kD). Elles sont reliées entre elles par une ou plusieurs liaisons covalentes (ponts disulfures). Une zone flexible de la chaîne lourde située à mi-distance des extrémités de cette-dernière est appelée zone charnière. Cette zone charnière confère à l'anticorps une grande flexibilité, facilitant ainsi son interaction avec l'antigène.

*I.2.1.1.2 Chaînes légères*

Elles sont de deux types: kappa (k) ou lambda (l). Dans une molécule d'immunoglobuline donnée, les chaînes légères sont identiques, soit de type k, soit de type l. Ceci est dû au fait qu'un lymphocyte B donné produit soit des chaînes k, soit des chaînes l, mais pas les deux à la fois. On parle d'exclusion allélique. Les chaînes légères sont composées d'environ 220 acides aminés (poids moléculaire : 25 000 Da). Chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde par un pont disulfure. Environ les 2/3 des immunoglobulines ont des chaînes légères k et 1/3, des chaînes légères l.

*I.2.1.1.3 Domaines*

Outre les ponts disulfures intercaténaux qui unissent les chaînes lourdes entre elles et les chaînes légères aux chaînes lourdes, il existe des ponts disulfures intracaténaux sur chaque chaîne lourde et sur chaque chaîne légère. Ces ponts disulfures créent des régions d'environ 110 acides aminés, appelées domaines (Figure 15). Chaque chaîne lourde présente quatre domaines : VH, CH1, CH2 et CH3 (sauf les IgM qui en ont 5) et chaque chaîne légère deux domaines : VL et CL. Les domaines VL et VH sont appelés variables, ce sont eux qui lient l'antigène. Ils forment le paratope. Chaque domaine variable possède trois boucles hypervariables appelées CDRs (Complementary Determining

## INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie

Region) qui se caractérisent par une très grande variabilité en acides aminés d'un anticorps à un autre. Les CDRs sont directement impliqués dans la liaison antigène-anticorps. Les domaines CL, CH1, CH2 et CH3 sont appelés domaines constants et sont impliqués dans les fonctions effectrices des anticorps.

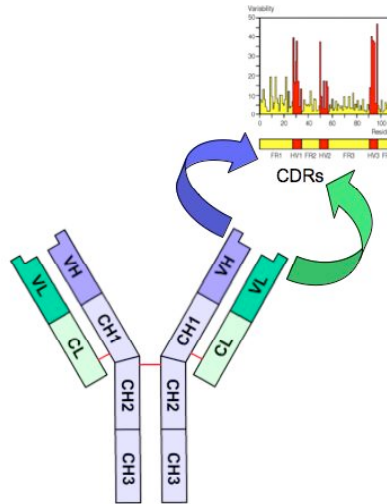


Figure 15 : Les différents domaines d'un anticorps

### I.2.1.2 Isotypes des anticorps et leur fonction

La nature des chaînes lourdes détermine la classe et la sous-classe des immunoglobulines. Chez tous les individus de la même espèce, les classes et les sous-classes possèdent des caractéristiques communes que l'on dénomme isotypie.

Chez l'homme, on distingue 5 classes d'immunoglobulines ayant chacune un type de chaîne lourde différent : gamma (g) pour les IgG, alpha (a) pour les IgA, mu (m) pour les IgM, delta (d) pour les IgD et epsilon (e) pour les IgE (Figure 16). Au sein d'une même classe d'immunoglobulines, il peut exister des sous-classes correspondant à des variations structurales de la chaîne lourde à l'intérieur d'une classe. Ainsi, il existe 4 sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) caractérisées, respectivement, par les chaînes lourdes g1, g2, g3 et g4, et 2 sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2) avec des chaînes lourdes a1 et a2.

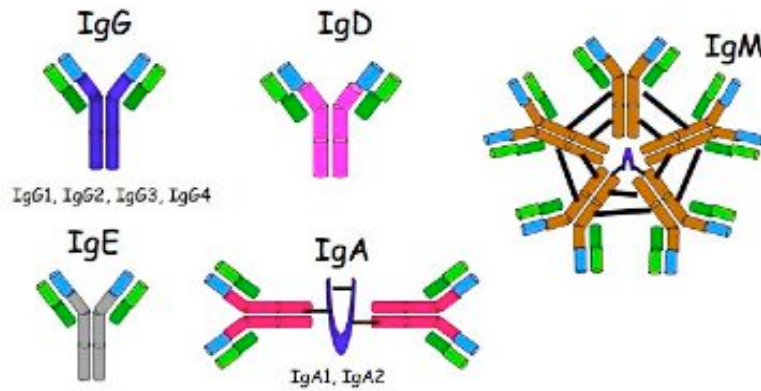


Figure 16 : Les cinq classes d'immunoglobulines

Les principales caractéristiques physio-chimiques des différents isotypes sont reportées dans le Tableau 5.

-Les **IgG** représentent, chez l'Homme, la principale classe d'immunoglobulines. Leur concentration sérique chez l'adulte varie de 8 à 16 g/L. Leur demi-vie plasmatique est d'environ 3 semaines.

-Les **IgA** constituent la deuxième classe d'immunoglobulines sériques, après les IgG, en terme de concentration (2 à 4 g/L). En revanche, elles représentent la classe prépondérante des immunoglobulines dans les sécrétions (sécrétions respiratoires, salivaires, digestives, lait, colostrum, larmes). Sur le plan structural, les IgA ont la particularité de se présenter sous plusieurs formes moléculaires :

*dans le sérum*, les IgA peuvent se présenter sous forme de monomères (forme prépondérante) ou sous forme de dimères associés à une chaîne J (chaîne de jonction). La chaîne J est un peptide riche en cystéine de 137 acides aminés (poids moléculaire : 15 kD), d'origine plasmocytaire ; la sous-classe IgA1 est prépondérante dans le sérum.

*dans les sécrétions*, les IgA, appelées IgA sécrétoires, sont sous forme de dimères, associées grâce à une chaîne J. Elles comportent également un composant sécrétoire. Les IgA produites par les lymphocytes B sont captées par les cellules épithéliales grâce à un récepteur polyIgR situé au pôle basal de la cellule. C'est pendant le transfert de l'IgA à travers la cellule épithéliale, vers le pôle apical de la cellule, que le composant sécrétoire (poids moléculaire : 70 kD), ou pièce sécrétoire, est ajouté. Le rôle de la pièce sécrétoire

## *INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie*

est de protéger les IgA sécrétoires vis-à-vis des enzymes protéolytiques présents dans les sécrétions.

-Les **IgM** peuvent se présenter, comme les IgA, sous deux formes moléculaires distinctes :

*une forme monomérique* : c'est la forme sous laquelle les IgM sont synthétisées et insérées dans la membrane du lymphocyte B.

*une forme pentamérique* : c'est la forme sous laquelle les IgM sont sécrétées. Les 5 monomères de bases sont reliés par des ponts disulfures. De plus une chaîne J relie l'extrémité de 2 monomères.

-Les **IgD** représentent moins de 1 % des immunoglobulines sériques. Elles sont habituellement coexprimées avec les IgM à la surface des lymphocytes B où elles semblent jouer un rôle de récepteur pour les antigènes.

-Les **IgE** ne sont présentes, chez un sujet sain, qu'à l'état de traces. Elles présentent une forte affinité pour les récepteurs Fcε exprimés à la surface des mastocytes et basophiles présents aux niveaux de la peau, des muqueuses et le long des vaisseaux sanguins des tissus conjonctifs. La fixation de l'antigène sur le paratope d'IgE spécifiques déclenche le relargage par les mastocytes de puissants médiateurs chimiques impliqués notamment dans l'allergie.

*INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie*

	<b>IgG</b>	<b>IgA</b>	<b>IgM</b>	<b>IgD</b>	<b>IgE</b>
<b>Chaînes lourdes</b>	γ	α	μ	δ	ε
<b>Sous-classes et chaînes lourdes associées</b>	IgG1 : γ1 IgG2 : γ2 IgG3 : γ3 IgG4 : γ4	IgA1 : α1 IgA2 : α2			
<b>Chaînes légères</b>	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ
<b>Nombre de monomères</b>	1	1 (sérique) 2 (sérique ou sécrétoire)	1 (membranaire) 5 (sérique)	1	1
<b>Poids moléculaire (kD)</b>	150	160 400	950 (sérique)	185	190
<b>Concentration sérique (g/l)</b>	8 à 16	2 à 4	0,5 à 2	0,05 à 0,4	0,0001 à 0,001
<b>Proportion sérique</b>	70 à 75%	15 à 20%	10%	Moins de 1%	Moins de 1%
<b>½vie plasmatique (j)</b>	21	6	5	4	2 à 3
<b>Caractéristiques principales</b>	-Le plus abondant -Base de la réponse secondaire -Traverse le placenta	-Le plus abondant dans les sécrétions -Traverse les cellules épithéliales	-Base de la réponse primaire -Faible affinité, forte avidité	-Récepteur des lymphocytes B matures	-Médiateur de l'allergie -Défence anti-helminthes
<b>Mode d'action</b>	-Neutralise -Active le complément -Opsonise -ADCC	-Neutralise -Active le complément	-Neutralise -Active le complément	-Activation cellulaire	-Neutralise les parasites -Fixe récepteur Fcε à la surface des mastocytes et basophiles

Tableau 5 : Caractéristiques des différents isotypes d'immunoglobulines humaines

### I.2.1.3 Les fonctions des anticorps

Les anticorps agissent principalement de deux manières : soit de façon directe en neutralisant le pathogène soit en coopération avec d'autres acteurs du système immunitaire (Figure 17). Ces deux types de fonctions effectrices sont régies par des parties distinctes de l'anticorps. Ainsi la partie variable de l'anticorps est impliquée dans l'interaction directe antigène-anticorps et sa partie constante assure l'interaction avec les protéines ou les cellules du système immunitaire.

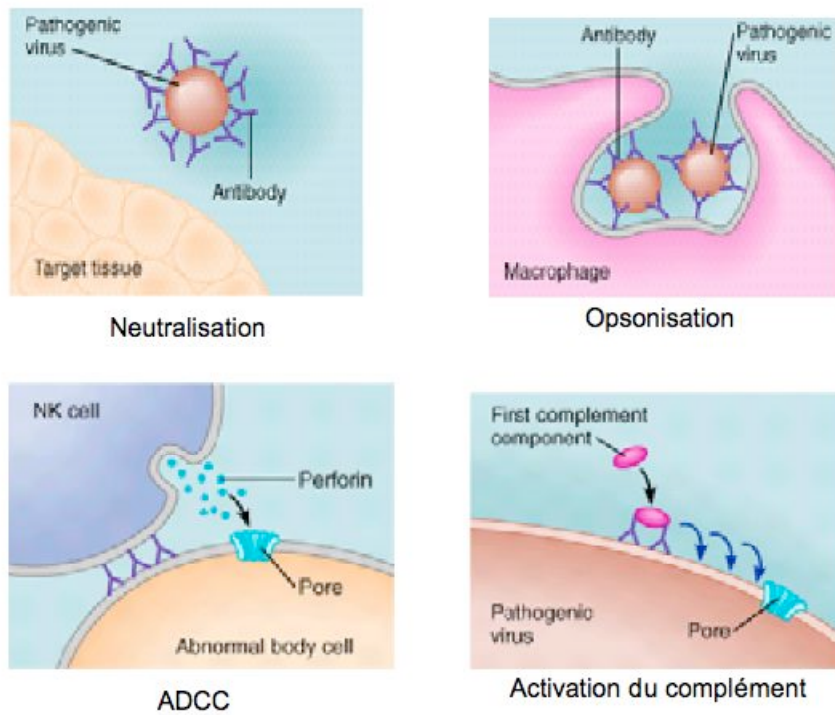


Figure 17 : Les fonctions effectrices des anticorps

**-Neutralisation de l'agent infectieux par fixation directe :** Le paratope de l'anticorps peut être, d'une part, spécifiquement dirigé contre un ligand spécifique d'un récepteur membranaire, une toxine, un antigène de surface bactérien ou viral. Dans ce cas, les fonctions neutralisantes de l'anticorps consistent à piéger un ligand pour qu'il n'atteigne pas sa cible. D'autre part, l'anticorps peut également se lier à un récepteur membranaire afin de perturber la transduction du signal ou de provoquer une

internalisation conduisant à une réduction de la densité à la surface cellulaire de ce récepteur.

**-Coopération avec d'autres acteurs de système immunitaire :** De nombreux anticorps peuvent également recouvrir le pathogène via une interaction directe de leur paratope. Ce phénomène appelé *opsonisation* va induire, d'une part, la phagocytose du pathogène et, d'autre part, une *cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps* (ADCC) par fixation de la partie constante des anticorps sur différents récepteurs Fc présents à la surface des macrophages, des cellules polynuclées (neutrophiles, basophiles et éosinophiles) ou des cellules NK. Cette interaction partie constante-récepteur Fc va engendrer le relargage de granules cytoplasmiques contenant des granzymes et perforines par les cellules de l'immunité impliquées dans l'interaction. Il existe plusieurs récepteurs Fc qui sont spécifiques, d'une part, de l'isotype de l'anticorps et, d'autre part, de la population cellulaire. Ainsi, les leucocytes polynuclés (neutrophiles, macrophages et éosinophiles) et les cellules NK expriment à leur surface différents récepteurs spécifiques des IgG : les Fc $\gamma$ RI ou CD64, Fc $\gamma$ RII-A ou CD32a et Fc $\gamma$ RIII-B ou CD16B pour les leucocytes polynuclés et uniquement le Fc $\gamma$ RIII-A ou CD16A pour les cellules NK. Tous ces récepteurs présentent une meilleure affinité pour les sous-classes IgG1 et IgG3. Cela explique, en partie, pourquoi les anticorps utilisés en immunothérapie passive (voir le paragraphe p55) sont principalement des IgG1. Il existe également deux types de récepteurs Fc spécifiques des IgE : Fc $\epsilon$ RI, récepteur de haute affinité, et CD23, récepteur de faible affinité. Ainsi, les mastocytes, basophiles et éosinophiles activés expriment à leur surface les récepteurs Fc $\epsilon$ RI impliqués dans les maladies allergiques ou les infections parasitaires. Alors que CD23, retrouvé à la surface de nombreuses cellules (notamment lymphocytes B et T activés, les monocytes ou les cellules dendritiques), semble être impliqué dans la régulation du niveau d'IgE lors d'une réponse immunitaire humorale.

Une autre fonction de la partie constante de l'anticorps est l'activation du complément (CDC pour *complement-dependent cytotoxicity*) après leur opsonisation sur la surface cible. Les IgG activent la voie classique du complément en se fixant à C1q par une région du domaine CH2. Cette fixation active la C3 convertase et entraîne le clivage de la protéine C3 dont le plus gros fragment C3b va se lier de façon covalente à la surface

membranaire de la cellule cible. Une cascade protéolytique va alors permettre l'assemblage des protéines C6 à C9 qui constituent le complexe d'attaque membranaire résultant en la formation d'un canal membranaire conduisant à la destruction de la cellule cible.

## **I.2.2 Les anticorps en immunothérapie et en imagerie**

Le terme « immunothérapie » désigne les méthodes de traitement utilisant un moyen immunitaire, naturel ou artificiel, pour traiter une maladie. C'est un axe de recherche important en thérapie anti-cancéreuse, contre les maladies auto-immunes, allergiques ou neurodégénératives (Schuster *et al.*, 2006 ; Nguyen *et al.*, 2006 ; Chatenoud, 2006 ; Passalacqua *et al.*, 2007 ; Féraudet *et al.*, 2005; Bade *et al.*, 2007). On distingue trois types d'immunothérapies : l'immunothérapie adoptive, active ou passive.

**-L'immunothérapie adoptive** consiste à apporter au patient des cellules extérieures immunologiquement compétentes. Pour éviter la réaction dite «du greffon contre l'hôte» qui peut être grave, des cellules immunitaires provenant du patient sont préparées en culture *in vitro*. Il s'agit le plus souvent de lymphocytes ou de cellules dendritiques qui sont prélevés, sélectionnés, dopés par divers traitements (par cytokines ou génie génétique), multipliés en culture pour en obtenir d'importantes quantités et réinjectés enfin au patient.

**-L'immunothérapie active** revient à stimuler spécifiquement le système immunitaire de l'hôte pour lutter contre une pathologie donnée.

**-L'immunothérapie passive** cherche à apporter au patient des éléments du système immunitaire spécifiques d'une pathologie. Il s'agit le plus communément d'anticorps.



### I.2.2.1 Histoire de l'immunothérapie

Dès le XI<sup>ème</sup> siècle, les Chinois pratiquaient la variolisation: il s'agissait d'inoculer une forme qu'on espérait peu virulente de la variole en mettant en contact la personne à immuniser avec le contenu de la substance suppurant des vésicules d'un malade. Le résultat restait cependant aléatoire et risqué, le taux de mortalité pouvait atteindre 1 ou 2 %. La pratique s'est progressivement diffusée le long de la route de la soie. Elle a été importée depuis Constantinople en Occident au début du XVIII<sup>ème</sup> siècle. En 1760, Daniel Bernoulli démontra que, malgré les risques, la généralisation de cette pratique permettrait de gagner un peu plus de trois ans d'espérance de vie à la naissance. Lui-même très favorable à la variolisation, le médecin anglais Edward Jenner s'est demandé s'il n'était pas possible de contourner ce danger (pour revue : Waldmann *et al.*, 2003). Il avait entendu parler d'un fait assez particulier. Ainsi les personnes vivant à proximité de vaches atteintes par la vaccine (ou variole des vaches) ne souffraient pas de la variole. Il inocula, le 14 mai 1796, à un enfant du pus prélevé sur la main d'une fermière infectée par la vaccine (présente sur les pis de la vache). Trois mois plus tard, il inocula la variole à l'enfant qui s'est révélé être immunisé. Cette nouvelle méthode de protection n'a pas été bien admise par ses contemporains mais Jenner reçut le soutien d'hommes politiques puissants et l'opinion publique se montra par la suite beaucoup plus favorable. Il faudra attendre un siècle pour que Louis Pasteur et ses collaborateurs Roux et Duclaux, suite aux travaux de Robert Koch, expliquent le principe d'action de la vaccination. C'est d'ailleurs Pasteur qui inventa le terme " vaccin " qui vient du latin *vacca* qui signifie *vache*, en souvenir et en l'honneur de Jenner. Sa première vaccination fut celle d'un troupeau de moutons contre le choléra le 5 mai 1881. La première vaccination humaine (hormis la vaccination au sens originel de Jenner) fut celle d'un enfant contre la rage le 6 juillet 1885, ce qui ouvrait la voie à l'immunothérapie active.

En 1888, à Paris, Émile Roux et Alexandre Yersin démontraient que le pouvoir pathogène du bacille diphtérique était dû à une toxine plutôt qu'à la bactérie elle-même (Roux et Metchnikoff, 1891). Cette observation fut rapidement étendue au cas du tétanos. Il fallut deux ans à Emil Von Behring à Berlin et à ses collègues Kitasato et Wernicke, à partir de 1890, pour montrer que le sang de sujets immunisés contre la diphtérie ou le

## INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie

tétanos contenait des substances capables de neutraliser la toxine, appelées à l'époque antitoxines, ce qui ouvrait la voie à la sérothérapie. En effet, des injections chez des animaux de faibles doses de toxine diphtérique ont permis l'obtention de sérum contenant des antitoxines, sérums qui ont été utilisés en immunothérapie passive pour traiter les patients contre la diphtérie. Paul Ehrlich va alors développer un protocole de standardisation des sérums diphtériques à partir de sérum de cheval. Cette sérothérapie fera tomber la mortalité de 40 % à 2 % en réponse à cette maladie. En 1908, ses travaux sur l'immunologie, et en particulier sa théorie de la réponse immunitaire centrée sur l'interaction entre les antigènes et les anticorps, vaudront à Paul Ehrlich le prix Nobel de médecine, en partage avec le russe Élie Metchnikov.

Les premiers essais en immunothérapie anti-cancéreuse ont été réalisés dans les années 1890 par les professeurs Richet et Héricourt, injectant des broyats de tumeurs à des animaux (ânes, chiens) puis recueillant quinze jours plus tard leur sérum pour l'injecter aux malades. Ces expériences ont donné peu de résultats et les recherches ont alors été abandonnées. En effet, ils n'ont jamais réussi à isoler des anticorps spécifiques, beaucoup de substances supposées telles ont été préparées chez l'animal dans des conditions qui ont entraîné des accidents toxiques. Il a fallu attendre 1975, année où Köhler et Milstein offraient à la communauté scientifique une nouvelle technique qui allait révolutionner l'immunothérapie (Köhler and Milstein, 1975). Grâce à la technique dite des hybridomes (voir le paragraphe p46), il devenait possible de produire de façon efficace des anticorps monoclonaux contre une très grande variété d'antigènes. En 1986, le premier anticorps monoclonal, muromomab-CD3 (Orthoclone OKT3), est approuvé pour sa mise sur le marché par la Food and Drugs Administration (FDA). Toutefois, les grands espoirs mis sur les anticorps monoclonaux furent rapidement remplacés par un scepticisme dans les années 1980. En effet, d'une part les patients recevant des traitements à base d'anticorps monoclonaux de souris développèrent d'importantes réponses immunitaires anti-anticorps de souris (réponse HAMA pour *human anti-mouse antibodies*). D'autre part, ces anticorps de souris n'étant pas capables de recruter les molécules du complément humain et de déclencher une réponse ADCC avec les monocytes humains, n'avaient que de faibles fonctions effectrices. Le développement de la biologie moléculaire et de l'ingénierie génétique dans les années 1990 a cependant donné un second souffle aux prédictions d'Ehrlich. En effet, grâce à ces techniques, il est

devenu possible de générer des anticorps monoclonaux chimériques souris-homme (voir le paragraphe p49). En 1997, le premier anticorps monoclonal humanisé (daclizumab, Zenapax) est approuvé par la FDA. Depuis les années 1990, les anticorps sont apparus comme une importante classe de médicaments (Kim *et al.*, 2005). En effet, 17 anticorps ont actuellement été approuvés pour une utilisation thérapeutique en Europe et aux Etats-Unis et plus de 150 sont actuellement en essais cliniques (voir le paragraphe p55) (Baty and Chames, 2006 ; Carter, 2006 ; Reichert *et al.*, 2005).

### **I.2.2.2 Intérêt des anticorps monoclonaux en immunothérapie**

L'introduction chez un individu d'un organisme étranger (virus, bactérie, parasite, champignon) ou de toute substance reconnue comme différente des molécules du "soi" conduit à la production par les lymphocytes B d'anticorps dirigés contre des motifs moléculaires (déterminants antigéniques ou épitopes) présents sur ces organismes ou ces substances. Ainsi, les lymphocytes B d'un animal immunisé vont produire des anticorps dirigés spécifiquement contre des déterminants antigéniques présents sur les molécules du "non soi". Le sérum de l'animal (ou immunsérum) contient alors de nombreux anticorps dont les propriétés biologiques et physico-chimiques peuvent varier, y compris pour ceux qui sont dirigés contre le même déterminant. L'immunogène va induire la stimulation et la prolifération de nombreux lymphocytes B, chacun donnant naissance à une population de cellules filles, identiques entre elles (un clone), qui vont se différencier en plasmocytes sécréteurs du même anticorps. L'immunsérum contient donc un mélange d'anticorps (différents isotypes d'IgG et d'IgM avec des affinités différentes) produits par ces clones de lymphocytes B : il s'agit de la réponse *anticorps polyclonale*. Les immunsérums ont depuis longtemps été utilisés comme outils en recherche, pour le diagnostic, mais aussi en immunothérapie. Cependant, leur utilisation pose différents problèmes. Le plus important est celui de la reproductibilité de leurs caractéristiques fonctionnelles. Un immunsérum n'est pas disponible en quantité illimitée, la qualité d'un immunsérum dépend de la réponse immunitaire que l'animal immunisé a développée, deux antisérums dirigés contre la même molécule, même produits chez deux individus de la même espèce, n'auront pas exactement les mêmes propriétés qualitatives et quantitatives. Les titres vont être différents, l'affinité des anticorps qui les composent

## INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie

pourra varier, et les quantités relatives des différents anticorps ne seront pas les mêmes. Afin de produire des lignées stables de cellules produisant l'anticorps d'intérêt, Köhler et Milstein (UK Medical Research Council's Laboratory of Molecular Biology de Cambridge) ont élaboré, en 1975, l'idée et la méthode de fusion de deux types de cellules (Köhler et Milstein, Nature 1975).

La technique dite « des hybridomes » repose sur la fusion de lymphocytes B (produisant les anticorps d'intérêt et incapables de se reproduire) avec des cellules de myélomes (cellules cancéreuses immortelles) résulte en un hybridome sécrétant à la fois des anticorps et ayant la propriété de se reproduire indéfiniment. Plusieurs étapes sont nécessaires pour l'obtention d'anticorps monoclonaux (Figure 18).

**-Immunisation:** Des souris sont immunisées avec l'antigène. L'animal est ensuite sacrifié et la rate prélevée.

**-Fusion :** Les lymphocytes B sont isolés à partir de la rate et fusionnés à des cellules de myélomes. Les hybridomes ainsi obtenus présentent les propriétés de multiplication rapide et d'immortalité des cellules cancéreuses.

**- Propagation, sélection et clonage:** Les cellules de myélomes utilisées pour la fusion ne produisent pas d'anticorps ou une des chaînes d'anticorps. De plus, ces cellules ont perdu (par sélection génétique) la faculté de produire une enzyme appelée *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (HGPRT). Cette enzyme est impliquée dans la synthèse des nucléotides, plus particulièrement dans la voie de sauvetage (par opposition à la voie *de novo*). La sélection des cellules fusionnées se fait avec les composés chimiques hypoxanthine, aminoptérine et thymidine (HAT). L'aminoptérine, en bloquant la synthèse *de novo* des nucléotides, oblige les cellules à utiliser la voie de sauvetage. Les myélomes parents n'ayant pas l'enzyme essentielle, seules les cellules fusionnées avec les splénocytes et l'ayant ainsi acquise pourront survivre. L'hypoxanthine et la thymidine sont les substrats de cette voie de sauvetage. Par ailleurs, les cellules B non-fusionnées, étant incapables de se reproduire, s'élimineront d'elles-mêmes. Suite à une période de sélection dans le milieu HAT, les hybridomes se développent en colonies. Ces lignées d'hybridomes sécrètent des anticorps tous différents. Afin de sélectionner notre anticorps d'intérêt, il faut d'abord isoler chacun des clones. Classiquement, cette sélection se fait par dilution limite pour permettre l'isolation de clones uniques. Chaque

clone est ensuite testé pour sa capacité à lier l'antigène utilisé pour l'immunisation.

**-Production:** On peut alors soit cultiver "industriellement" les cellules dans des bioréacteurs (la production d'anticorps est modeste (1 µg/ml)), soit les cultiver *in vivo*, en injectant l'hybridome dans la cavité péritonéale de la souris : une tumeur se développe et on prélève le liquide d'ascite, qui contient 1 à 10 mg/ml d'anticorps monoclonal, soit 1000 fois plus.

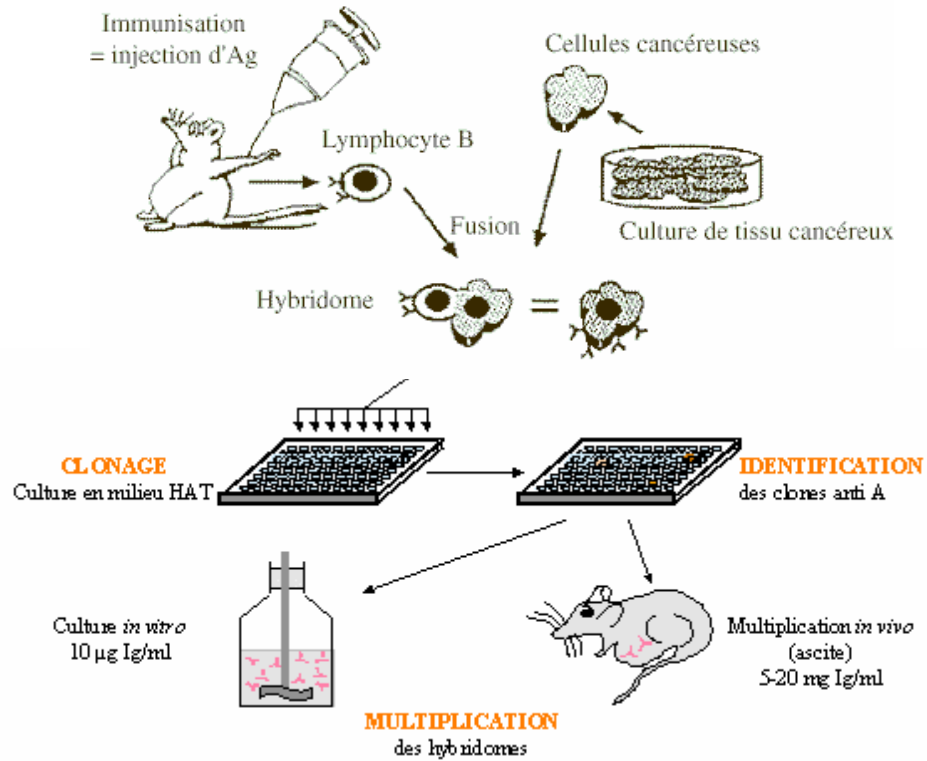


Figure 18 : Production des anticorps monoclonaux

## INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie

Depuis leur découverte, les anticorps monoclonaux se sont révélés être des outils indispensables, principalement pour l'analyse d'interactions de ligands avec leurs récepteurs, et la compréhension des mécanismes moléculaires (interactions protéiques), mais aussi pour le développement de systèmes de détection et de dosages spécifiques de molécules. Ils représentent actuellement les protéines recombinantes les plus étudiées. En revanche, l'utilisation *in vivo* d'anticorps monoclonaux à des fins diagnostiques (imagerie) et thérapeutiques a été considérablement freinée par la nature xénogénique des anticorps disponibles, qui sont essentiellement des anticorps de souris. Les principales raisons qui limitent l'utilisation d'anticorps murins en immunothérapie humaine sont : la faible fixation de ces anticorps sur les récepteurs Fc humains, et leur immunogénicité (à l'origine de syndromes humoraux humains dirigés contre les anticorps de souris : HAMA pour *Human Anti-Mouse Antibodies*), phénomène pouvant notamment s'accompagner de réactions d'hypersensibilité. De nombreux travaux d'ingénierie moléculaire ont été développés afin de résoudre les problèmes que peuvent poser les caractéristiques intrinsèques des anticorps monoclonaux, pour une utilisation *in vivo* (Morrison *et al.*, 1984 ; Boulianne *et al.*, 1984).

### I.2.2.3 Vers une humanisation des anticorps...

Les modifications des anticorps monoclonaux par génie génétique ont débuté peu après leur découverte et se sont accentuées avec l'apparition de la PCR. Il est devenu possible de manipuler les gènes des anticorps de façon à créer des anticorps hybrides souris-homme afin de réduire la réponse HAMA et d'augmenter la réponse ADCC ainsi que le recrutement des molécules du complément (Figure 19).

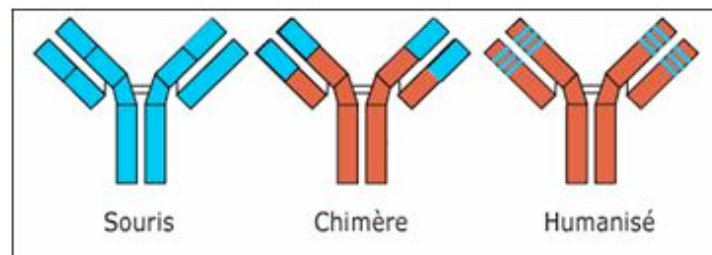


Figure 19 : Anticorps chimériques et anticorps humanisés

## INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie

La construction d'*anticorps chimériques* consiste à transférer des domaines variables murins sur une construction d'immunoglobuline humaine (Sandhu, 1992). Les anticorps chimériques conservent habituellement une spécificité et une affinité équivalentes à celles de l'anticorps d'origine. L'immunogénicité de ces anticorps est réduite (Lobuglio *et al.*, 1989) mais des réactions immunitaires contre les régions charpentes des domaines variables murins restent possibles (Bruggemann *et al.*, 1989 ; Khazaeli *et al.*, 1994).

On peut également envisager une transformation plus complète aboutissant à des *anticorps humanisés* en échangeant les boucles hypervariables (CDR) d'une immunoglobuline humaine par celles d'une immunoglobuline murine spécifique d'un antigène. Verhoeyen *et al.* (1988) ont démontré la faisabilité de ce procédé en conférant une spécificité anti-lysozyme d'un anticorps murin à un anticorps humain. Cette méthode peut s'avérer très performante (Hale *et al.*, 1988). Il est toutefois souvent nécessaire de muter plusieurs résidus de la charpente qui influent sur la conformation des boucles hypervariables, et cela afin d'optimiser l'affinité de l'anticorps ainsi modifié (Caldas *et al.*, 2003 ; Luo *et al.*, 2003). Ce travail peut être très long et repose toujours sur une analyse structurale et une modélisation élaborées. Les réponses de type HAMA vis à vis de ces molécules sont peu fréquentes (Hale *et al.*, 1988).

Une approche visant à l'obtention d'anticorps monoclonaux humains directement chez la souris a vu le jour grâce au développement des techniques de transgénèse. Cette approche consiste à remplacer les loci (ou une partie d'entre eux) des gènes d'immunoglobulines de souris par une partie des loci humains équivalents. La faisabilité de cette méthode a été démontrée en introduisant, à l'aide d'un chromosome artificiel de levure (YAC), un fragment d'origine humaine de 300 kb correspondant aux loci des segments Vk, Jk, Ck et VH, DH, JH, CH, permettant ainsi le transfert de la quasi-totalité du locus Ig humain (Bruggemann and Neuberger, 1996 ; Neuberger and Bruggemann., 1997). On peut également souligner l'approche développée au Japon qui consiste à introduire des fragments chromosomiques humains entiers (technologie "transchromosomique") (Tomisuka *et al.*, 2000). Celle-ci a permis de générer des souris contenant 100 % des gènes d'Ig humains. Toutefois, cette technologie reste très complexe, et aujourd'hui peu de laboratoires disposent de ces animaux transgéniques.

Ainsi, parmi les 17 anticorps autorisés par la « Food and Drug Administration » pour un usage thérapeutique, on retrouve cinq anticorps chimériques et huit anticorps

humanisés (voir le paragraphe p55) (Baty and Chames, 2006 ; Carter, 2006 ; Reichert *et al.*, 2005).

#### I.2.2.4 Les différents formats d'anticorps et leur pharmacocinétique

Si l'objectif poursuivi est de conserver simplement la fonction de reconnaissance d'un antigène non couplée aux fonctions effectrices portées par le Fc, il est possible de créer et de produire par voie protéolytique ou recombinante de nouveaux fragments d'anticorps. De plus, la réponse HAMA est essentiellement dirigée contre la partie constante de l'anticorps. Ces fragments peuvent être monovalents ou polyvalents. Leur intérêt s'est amplifié par la possibilité d'obtenir également des fragments bispécifiques (voire trispécifiques) mais aussi par la fusion possible à des protéines, comme des enzymes ou des toxines, apportant une deuxième fonctionnalité.

##### I.2.2.4.1 Coupure protéolytique

C'est l'étude des fragments obtenus après action d'enzymes protéolytiques sur les molécules d'immunoglobulines qui a permis d'élucider les relations existant entre la structure et la fonction de la molécule d'anticorps (Figure 20).

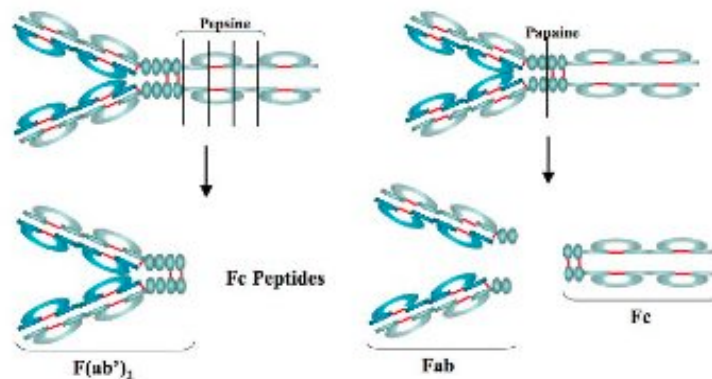


Figure 20 : Coupure d'un anticorps par la papaine et la pepsine



I.2.2.4.1.1 Action de la papaïne

Sous l'action de la papaïne, la molécule d'immunoglobuline est scindée en trois fragments de taille similaire (45kD): deux fragments Fab et un fragment Fc (Kilara and Shahani, 1977).

Les fragments Fab (ab pour *antigen binding*) correspondent à la moitié N-terminale de la molécule d'immunoglobuline, celle qui se fixe à l'antigène. Chaque fragment Fab est composé d'une chaîne légère entière et d'un fragment de la chaîne lourde contenant les domaines VH et CH1, les deux étant reliés par des ponts disulfures. Les fragments Fab ont la propriété de se lier avec l'antigène.

Le fragment Fc (c pour *crystallisable*) correspond aux domaines CH2 et CH3 des chaînes lourdes reliées par un ou plusieurs ponts disulfures. Le fragment Fc a des fonctions biologiques très importantes, notamment de liaison à des récepteurs spécifiques de chaque isotype et d'activation du complément.

I.2.2.4.1.2 Action de la pepsine

La pepsine coupe la molécule d'immunoglobuline en dessous du ou des ponts disulfures qui relie(nt) les deux chaînes lourdes. Après action de la pepsine, on obtient donc un gros fragment (Fab')<sub>2</sub> correspondant aux deux fragments Fab reliés par un ou plusieurs ponts disulfures, et des produits de dégradation du fragment Fc appelé pFc'.

I.2.2.4.2 *Ingénierie génétique*

L'élucidation de la structure des anticorps organisée en domaines et l'évolution des technologies de biologie moléculaire ont offert de nouvelles perspectives de développement. Depuis le début des années 1990, des fragments d'anticorps recombinants peuvent être obtenus par ingénierie moléculaire à partir d'ARN<sub>m</sub> d'hybridomes sécréteurs d'anticorps ou de banques combinatoires aléatoires d'ADNc codant les régions VH et VL d'anticorps. Le développement de la biologie moléculaire et

de l'ingénierie génétique ont aussi permis la construction de différents formats d'anticorps (Figure 21).

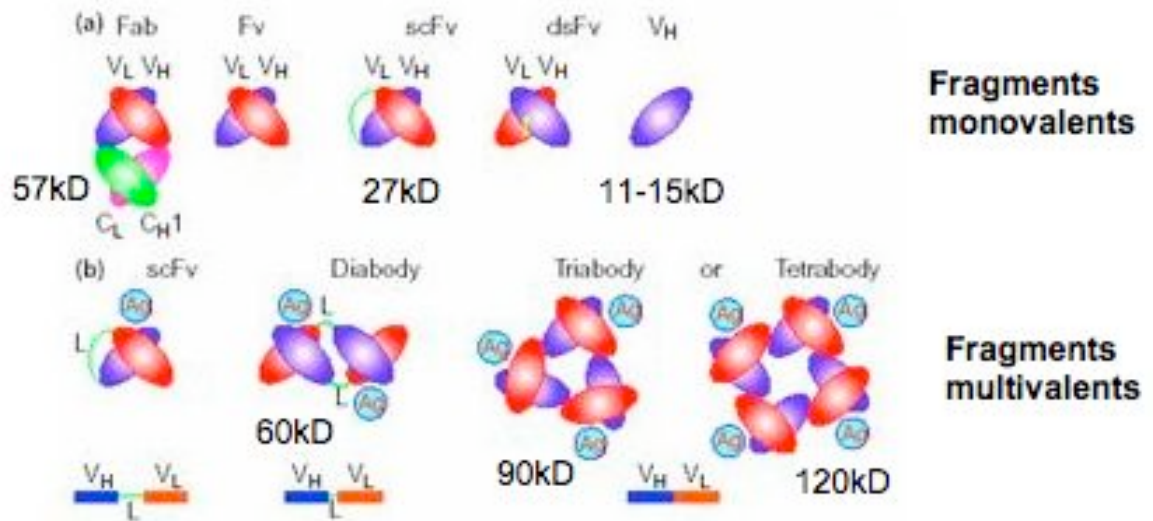


Figure 21 : Les différents formats d'anticorps

Le fragment Fab recombinant est un hétérodimère constitué de la chaîne légère et de la partie Fd de la chaîne lourde (VH-CH1) des anticorps. L'association s'effectue par la formation d'un pont disulfure entre les domaines CH1 et CL. Toutefois, la production de Fab recombinants est souvent délicate. La proportion de Fab formés actifs est parfois faible (Plucktun and Skerra, 1989 ; Thullier *et al.*, 1999).

Les fragments scFv (*single chain fragment variable*) sont l'une des structures minimales capables de lier un antigène (25kD). Les deux domaines variables VH et VL d'un anticorps sont associés de façon covalente par un lien peptidique. Ils peuvent être agencés dans l'orientation VL-VH ou VH-VL, l'extrémité C-terminale d'un domaine étant reliée à l'extrémité N-terminale de l'autre domaine par un lien peptidique qui maintient la cohésion des deux domaines variables sans perturber les contacts inter-domaines. Le lien doit être flexible, soluble et sa longueur supérieure à 12 résidus pour répondre aux caractéristiques structurales d'association des domaines VH et VL.

On peut aussi dériver à partir de scFv des formats variés dont certains peuvent conduire à des fragments d'anticorps mutispécifiques. Les formes dimériques (diabody), trimériques (triabody) et tétramériques (tétrabody) des scFv peuvent être produites. Pour

cela, la longueur du lien peptidique entre les deux domaines variables doit être réduite (Holliger *et al.* 1993). Un peptide court (11 résidus d'acides aminés ou moins) induit une multimérisation du fragment car des contraintes stériques empêchent l'association des domaines variables lourd et léger d'une même sous-unité. Plusieurs sous-unités peuvent alors s'associer, le domaine variable lourd d'une sous-unité s'appariant avec le domaine variable léger d'une autre sous-unité. La nature et le nombre de résidus d'acides aminés composant le bras, ainsi que l'agencement des deux domaines variables influencent la forme stable et les proportions des différents oligomères (Lawrence *et al.*, 1998 ; Blanco *et al.*, 2003 ; Kortt *et al.*, 2001 ; Dolezal *et al.*, 2000). Il est considéré qu'un lien peptidique de 3 à 12 résidus d'acides aminés permet l'obtention du diabody (bivalent) (Holliger *et al.*, 1993). La réduction du lien à moins de trois résidus favorise la formation du triabody (trivalent) et du tétrabody (tétravalent) (Dolezal *et al.*, 2000 ; Hudson et Kortt, 1999 ; Hudson et Souriau, 2003).

Le plus petit domaine capable de reconnaître un antigène avec de bonnes propriétés de spécificité et d'affinité est le V<sub>H</sub>H. Ce domaine est très similaire au fragment VH mais n'est pas associé à un domaine VL. Ce domaine particulier a été découvert chez les camélidés, chez qui il existe, en plus des anticorps conventionnels, des anticorps (appelés simple chaîne lourde) qui sont dépourvus de chaîne légère et de domaine CH1 (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). Ces fragments d'anticorps sont très faciles à produire dans la levure ou dans des bactéries et sont résistants à hautes températures (Dumoulin *et al.*, 2002). De par leur petite taille, ces fragments se lient souvent à des cavités et constituent une bonne source d'inhibiteurs d'enzymes (Lauwereys *et al.*, 1998). Les V<sub>H</sub>H ouvrent de nouvelles perspectives en biotechnologies.

#### *1.2.2.4.3 Biodistribution et pharmacocinétique des différents formats d'anticorps*

Pour de nombreuses applications thérapeutiques, notamment en immunothérapie anti-cancéreuse et anti-venin, les fragments Fab qui possèdent des caractéristiques pharmacocinétiques différentes de celles de l'anticorps entier, sont souvent mieux adaptées (Divgi and Larson, 1989 ; Gutierrez *et al.*, 2003). Les demi-vies de distribution et d'élimination, chez le rat, passent respectivement de 6-104 heures pour l'IgG à 0,3-23 heures pour le format Fab (Weir *et al.*, 2002). Or une clearance sanguine lente

augmente la fixation non spécifique notamment sur les cellules normales et donc diminue le ratio cellules tumorales/ cellules normales, important en radioimmunothérapie anticancéreuse (Buchsbaum, 1995). Toutefois, les Fab d'origine murine sont toujours immunogènes chez l'homme car ils présentent notamment le domaine CH1 de la partie constante. L'immunogénicité peut être réduite en chimérisant ou en humanisant le Fab.

L'immunogénicité des scFv est faible et ils présentent une grande capacité à diffuser dans les tissus (Gilliland *et al.*, 1999 ; Batra *et al.*, 2002). Toutefois, il semble que ces molécules aient une demi-vie très courte lorsqu'elles sont administrées à l'animal, leur élimination par voie rénale étant très rapide (Yokota *et al.*, 1992 ; Colcher *et al.*, 1999). Les fragments scFv peuvent également servir de module de base pour le développement de structures plus complexes (Rheinnecher *et al.*, 1996; Todorovska *et al.*, 2001). Ainsi, la multivalence peut être recherchée pour augmenter l'avidité d'un fragment d'anticorps pour un antigène, pour en accroître la taille, en moduler la demi-vie ou les caractéristiques pharmacocinétiques (Kortt *et al.*, 1997 ; Plückthun and Pack, 1997 ; Hudson et Kortt, 1999).

### **1.2.2.5 Anticorps ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché**

Voir pour revue : Baty and Chames, 2006 ; Carter, 2006 ; Reichert *et al.*, 2005.

#### *1.2.2.5.1 Anticorps utilisés en imagerie*

Dès le début des années 1970, plusieurs équipes ont utilisé des anticorps marqués avec des radio-isotopes pour localiser en imagerie des marqueurs tumoraux dans des modèles animaux (Primus *et al.*, 1973 ; Mach *et al.*, 1974). Avec l'avènement des anticorps monoclonaux dans les années 1980, ces études ont été étendues au diagnostic de tumeurs chez l'homme (Mach *et al.*, 1983). De nombreux anticorps ou fragments d'anticorps ont alors été développés. De nos jours ne subsistent sur le marché que trois anticorps entiers et trois fragments d'anticorps, tous d'origine murine (Tableau 6). Le plus ancien est une IgG entière, le satumomab radiomarqué à l'indium 111, dirigé contre la glycoprotéine TAG-72 et utilisé depuis 1992 pour le diagnostic des récurrences de

*INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie*

cancers colorectaux ou ovariens (Pinkas *et al.*, 1999). Ce faible développement d'anticorps pour l'imagerie est dû au fait que ces molécules conduisent souvent à de faibles contrastes entre le tissu sain et pathologique, sauf dans le cas de récidives de grande taille. De plus, l'immunoscintigraphie n'est jamais utilisée en première intention mais seulement dans le cas de récidives ou lorsque que les résultats des examens classiques (scanner, échographie) ne sont pas concluants. Or les coûts de développement des anticorps en imagerie étant proches de ceux des anticorps thérapeutiques, il est probable que les firmes pharmaceutiques préfèrent investir sur les produits thérapeutiques dont le marché est très nettement supérieur.

DCI	Spé. Pharma	Type	Antigène	Pathologie	Dates d'obtention AMM <sup>a</sup>	
					FDA	EMA
Satumomab	Oncoscint <sup>111</sup> In	Murin IgG	TAG-72	Cancer colorectal et ovaires	30-12-1992	NA
Arcitumomab <sup>b</sup>	CEA-Scan <sup>99m</sup> Tc	Murin F(ab') <sub>2</sub>	CEA	Cancer colorectal	28-6-1996	4-10-1996
Inciromab	Myoscint <sup>111</sup> In	Murin Fab	Myosin	Nécroses myocarde	3-7-1996	NA
Nofetumomab	Verluma <sup>99m</sup> Tc	Murin Fab	TAG-40	Cancer poumon à petites cellules	20-8-1996	NA
Capromab	Protascint <sup>111</sup> In	Murin IGg	PSMA	Cancer prostate	28-10-1996	NA
Sulesomab	LeukoScan <sup>99m</sup> Tc	Murin Fab'	NCA	Ostéomyélite	NA	14-2-1997
Fanolesomab <sup>c</sup>	NeuroSpec <sup>99m</sup> Tc	Murin IgM	CD15	Appendicite et ostéomyélite	2-7-2004	NA

<sup>a</sup> NA : non approuvé.

<sup>b</sup> AMM retirée le 27 septembre 2005 du marché européen.

<sup>c</sup> AMM retirée le 19 décembre 2005.

Tableau 6 : Anticorps utilisés en imagerie médicale

(d'après Baty and Chames, 2006)

I.2.2.5.2 Anticorps utilisés en thérapie

17 anticorps (16 anticorps entiers et un fragment Fab) présentent une autorisation de mise sur le marché en Europe et aux Etats-Unis (Tableau 7). Trois sont d'origine murine, cinq sont des anticorps chimériques, huit sont humanisés et un est humain. Huit sont utilisés en oncologie, trois pour les rejets de greffes, deux pour la polyarthrite rhumatoïde, un pour le psoriasis, un pour l'angioplastie, un pour le virus RSV (respiratory syncytial virus) et un pour l'asthme. Il faut rajouter, en plus de ces 17 anticorps, deux molécules chimériques dont le fragment Fc d'une IgG humaine est fusionné à une protéine. L'une est utilisée pour la polyarthrite rhumatoïde et l'autre pour le psoriasis. Le plus ancien anticorps thérapeutique, le muromomab, plus connu sur le nom OKT3, est dirigé contre l'antigène CD3 et a obtenu une autorisation d'utilisation clinique en 1986. Il est toujours utilisé dans la prévention du rejet aigu de greffes rénales (Goldstein, 1987).

L'utilisation *in vivo* d'anticorps monoclonaux de souris aussi bien pour la thérapie que pour l'imagerie s'est très vite confrontée à la production d'anticorps humains dirigés contre ces anticorps de souris chez les patients (réponse HAMA). D'autre part, les fonctions effectrices des anticorps de souris injectés chez l'homme ne sont pas optimales. Pour ces raisons des anticorps chimériques, humanisés voire humains ont été développés. Il a donc fallu attendre huit années pour qu'un deuxième anticorps, l'abciximab, un fragment Fab chimérique, obtienne une autorisation de mise sur le marché (Simoons *et al.*, 1994).

INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie

DCI	Spéc. Pharma	Type	Antigène	Pathologie	Dates d'obtention AMM	
					FDA	EMA*
Muridomab	Orthoclone	Murin IgG2a	CD3	Rejet de greffe	19-6-1986	NA
Abciximab <sup>b</sup>	ReoPro	Chimérique, IgG1	GP1Ib/IIIa r	Angioplastie	22-12-1994	NA
Rituximab <sup>c</sup>	Rituxan	Chimérique, IgG1	CD20	Lymphome cellules B (non Hodgkinien)	26-11-1997	2-6-1998
Daclizumab	Zenapax	Humanisé, IgG1	CD25 (II2r)	Rejet de greffe	10-12-1997	26-2-1999
Basiliximab	Simulect	Chimérique, IgG1	CD25 (II2r)	Rejet de greffe	12-5-1998	9-10-1998
Palivizumab	Synagis	Humanisé, IgG1	Protéine F	Virus RSV	19-6-1998	13-8-1999
Infliximab	Remicade	Chimérique, IgG1	TNF $\alpha$	Maladie de Crohn	24-8-1998	13-8-1999
Trastuzumab	Herceptin	Humanisé, IgG1	HER-2Neu	Cancer du sein métastatique	25-9-1998	28-8-200
Etanercept <sup>d</sup>	Enbrel	huFc $\gamma$ 1/TNFr	TNF $\alpha$ et $\beta$	Spondylarthrite ankylosante et polyarthrite rhumatoïde	21-11-1998	3-2-2000
Gemtuzumab <sup>e</sup>	Mylotarg	Humanisé, IgG4	CD33	Leucémie myéloïde	17-5-2000	NA
Alemtuzumab <sup>f</sup>	Campath	Humanisé, IgG1	CD52	Leucémie chronique, lymphome cellules B	7-5-2001	6-7-2001
Ibritomomab <sup>g</sup>	Zevalin <sup>90</sup> Y	Murin, IgG1	CD20	Lymphome non-Hodgkinien	19-2-2002	16-12004
Adalimumab	Humira	Humain, IgG1	TNF $\alpha$	Polyarthrite rhumatoïde	31-12-2002	1-9-2003
Alefacept <sup>d</sup>	Anevive	huFc $\gamma$ 1/LFA-3	CD2	Psoriasis	30-1-2003	NA
Omalizumab	Xolair	Humanisé, IgG1	IgE	Asthme	20-6-2003	25-10-2005
Tositumomab <sup>h</sup>	Bexxar <sup>131</sup> I	Murin IgG2a	CD20	Lymphome non-Hodgkinien	27-6-2003	NA
Efalizumab	Raptiva	Humanisé, IgG1	CD11a	Psoriasis	27-10-2003	20-9-2004
Cetuximab	Erbix	Chimérique, IgG1	EGFr	Cancer métastatique du colon et rectum	12-2-2003	29-6-2004
Bevacizumab	Avastin	Humanisé, IgG1	VEGF	Cancer métastatique du colon et rectum	26-2-2004	12-1-2005
Natalizumab <sup>i</sup>	Tysabri	Humanisé, IgG4	intégrin $\alpha$ 4	Sclérose multiple	23-11-2004	NA

<sup>a</sup> NA : non approuvé en Europe.

<sup>b</sup> L'abciximab est actuellement le seul anticorps thérapeutique sous un format Fab.

<sup>c</sup> Le rituximab est aussi connu sous le nom de Mabthera®.

<sup>d</sup> L'etanercept et l'alefacept sont des protéines fusionnées (respectivement le récepteur au TNF et le domaine de l'antigène 3 leucocytaire liant le CD2) au fragment Fc d'une IgG1.

<sup>e</sup> Le gemtuzumab ozogamicine est une immunotoxine. Anticorps couplé à l'agent de chimiothérapie la calicheamicine.

<sup>f</sup> L'alemtuzumab est aussi connu sous le nom de Mabcampath®.

<sup>g</sup> L'ibritomomab tituxetan et le tositumomab sont couplés à des radiosotopes.

<sup>h</sup> Tous les anticorps de ce tableau possèdent une chaîne légère de type kappa excepté le tositumomab qui possède une chaîne de type lamda.

<sup>i</sup> Le natalizumab a été retiré du marché le 28 février 2005. Une nouvelle demande d'AMM a été déposée à la FDA et à l'EMA.

Tableau 7 : Anticorps utilisés en immunothérapie

(d'après Baty and Chames, 2006)

## INTRODUCTION : Généralités sur l'immunothérapie

Si le chiffre de 17 anticorps ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché par la FDA et l'EMA peut paraître décevant, cela est dû à la complexité et au coût de production des anticorps mais également à la complexité d'utilisation des anticorps thérapeutiques (périodicités d'administration et doses très strictes). Toutefois, plus de 150 anticorps recombinants thérapeutiques sont en phase clinique (Reichert *et al.*, 2005): environ 60 en phase I, environ 80 en phase II et environ 15 en phase III (Figure 22). L'obtention d'anticorps monoclonaux humains à partir de souris transgéniques va certainement augmenter ce chiffre dans les deux prochaines années.

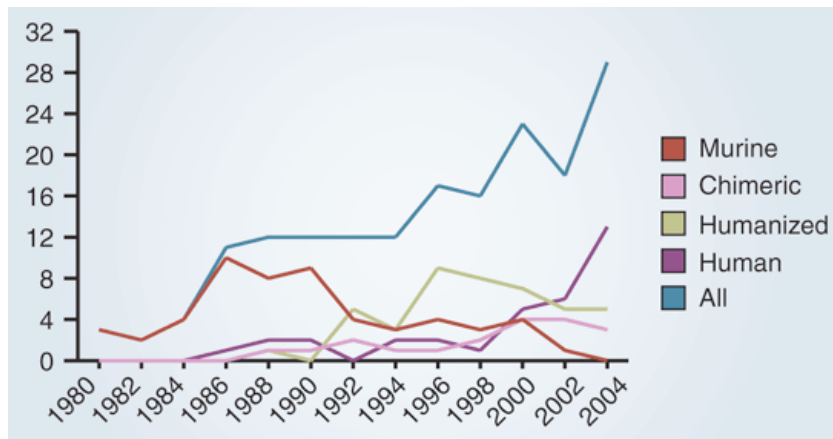


Figure 22 : Anticorps monoclonaux thérapeutiques entrant en phase clinique

(d'après Reichert *et al.*, 2005)



### **I.3 Généralités sur l'immunisation génique**

#### **I.3.1 Introduction à l'immunisation génique**

##### **I.3.1.1 Historique**

Depuis les premières études au début des années 50 (Stasney *et al.*, 1950), une période d'environ 40 ans s'est écoulée avant que Will *et al.* (Will *et al.*, 1982), Dubensky *et al.* (Dubensky *et al.*, 1984) et Wolff *et al.* (Wolff *et al.*, 1990) démontrent que l'administration d'ADN recombinant à un animal entraîne l'expression *in vivo* de la protéine codée par ce plasmide. Peu de temps après, Tang *et al.* (Tang *et al.*, 1992) montrent que l'expression d'une protéine du non soi codée par un plasmide déclenche une réponse immunitaire humorale spécifique de cet antigène. Au même moment, Ulmer *et al.* (Ulmer *et al.*, 1993), Fynan *et al.* (Fynan *et al.*, 1993) et Wang *et al.* (Wang *et al.*, 1994) établissent qu'une vaccination ADN peut induire une réponse immunitaire spécifique et protectrice chez des souris.

Depuis, plus de 1000 articles ont montré la capacité de la vaccination ADN à induire une forte réponse immunitaire contre de nombreux pathogènes tels que agents infectieux de la malaria (Hoffman *et al.*, 1997 ; Kalinna, 1997 ; Wang *et al.*, 1998), tuberculosis (Strugnell *et al.*, 1997 ; Kaufmann, 1995 ; Lowrie *et al.*, 1997), le virus de l'hépatite B (Davis *et al.*, 1994 ; Tacket *et al.*, 1999), le virus ébola (Xu *et al.*, 1998) et le VIH (Boyer *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1993 ; Boyer *et al.*, 1997). Toutefois, si les vaccins ADN sont bien tolérés par les patients lors de premiers essais cliniques, leur immunogénicité semble insuffisante et des améliorations doivent être envisagées. Ainsi, différents outils pour améliorer le transfert de gène et l'expression du transgène *in vivo* ont été développés ces dernières années (voir le paragraphe p65).

### I.3.1.2 Mécanisme d'induction de la réponse immunitaire

L'immunisation génique consiste à injecter directement dans le muscle squelettique ou la peau, les gènes codant des protéines. L'organisme hôte produit lui-même l'antigène qui va induire une réaction immunitaire cellulaire et humorale. Le mécanisme exact aboutissant à la stimulation de système immunitaire après transfert de gène dans le tissu cible n'est pas entièrement élucidé

Lorsqu'un ADN plasmidique codant pour un antigène est injecté par voie intra-musculaire ou par voie intra-dermique, les myocytes ou kératinocytes peuvent être directement transfectés et les fragments d'antigène présentés par des molécules du CMH de classe I (Figure 23A). Toutefois, ces cellules ne peuvent pas directement stimuler les lymphocytes T CD8+ (cytotoxiques) naïfs mais elles peuvent être reconnues par les lymphocytes T CD8+ activées par la voie des cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Il est donc nécessaire que des cellules dendritiques ou macrophages aient été initialement activées et initient la réponse immune en présentant l'antigène sur leurs molécules de CMH de classe I et II.

Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la présentation de l'antigène par les CPA :

**-Transfection directe des CPA.** Plusieurs études indépendantes suggèrent que des cellules dendritiques ou macrophages présents au site d'injection sont directement transfectées par le plasmide. Ainsi Weeratna *et al.* ont comparé l'injection intramusculaire d'un plasmide codant pour un antigène de surface de l'hépatite B sous contrôle d'un promoteur spécifique du muscle (promoteur de la créatine kinase) ou sous contrôle d'un promoteur non spécifique CMV. Une réponse immunitaire n'a pu être mise en évidence qu'avec le promoteur CMV suggérant fortement qu'en absence de transfection directe des CPA, la réponse immune ne peut pas être initiée (Weeratna *et al.*, 2001). De plus, l'ADN plasmidique a été isolé à partir de cellules dendritiques provenant de ganglion lymphatiques locaux et de la peau après des injection intra-musculaire ou intra-dermique (Casares *et al.*, 1997). Torres *et al.* ont également montré qu'une réponse immune pouvait être maintenue même si le site d'injection était prélevé 10 minutes après l'administration de l'ADN plasmidique, suggérant que des cellules

### INTRODUCTION : Généralités sur l'immunisation génique

distantes de ce site d'injection devaient avoir été transfectées (Torres *et al.*, 1997). Ces observations supportent l'hypothèse que des CPA résidentes au site d'injection sont directement transfectées, présentent l'antigène sur leurs molécules de CMH de classe I et II puis migrent au niveau des organes lymphoïdes secondaires où ils activent les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> naïfs respectivement (Figure 23B) (Condon *et al.*, 1996 ; Chattergoon *et al.*, 1998 ; Timares *et al.*, 1998). De plus, la transfection directe de ces CPA par le plasmide permet la stimulation du récepteur TLR9 (Toll like receptor) présent à la surface de l'endosome des cellules de l'immunité par les motifs CpG plasmidiques ou séquences immunostimulatrices (séquences basées sur un motif 5' Purine-Purine-CpG-Pyrimidine-Pyrimidine 3' dont la cytosine n'est pas méthylée, plus fréquentes chez les procaryotes que chez les eucaryotes) (Sato *et al.*, 1996 ; Colot and Rossignol, 1999 ; Yasuda *et al.*, 2006 ; Krieg, 2006). Cette voie de transduction aboutit au déclenchement d'une réponse innée de type inflammatoire permettant l'attraction de nouvelles CPA par chimiotactisme.

**-Présentation croisée.** Des études ont également montré que les cellules du site d'injection telles que les myocytes ou les kératinocytes sont directement impliquées dans la stimulation de la réponse immunitaire (Dupuis *et al.*, 2000). Ces cellules seraient capables de libérer l'antigène ou des fragments peptidiques qu'elles expriment, qui seraient ensuite phagocytés par des CPA permettant leur présentation : on parle de « cross-priming » (Figure 23C). Notamment on peut supposer que les signaux de « danger » causés par l'injection et la présence d'ADN d'origine bactérienne entraînent un environnement inflammatoire induisant 1) l'attraction de CPA au niveau du site d'injection, 2) la maturation des cellules dendritiques et 3) l'apoptose de certaines cellules transfectées générant des débris cellulaires et la libération de l'antigène (ou de fragments d'antigène) endocytés par les CPA qui vont ensuite être capables de le présenter à leur tour sur des molécules CMH de classe I (Ulmer *et al.*, 1997 ; Ulmer *et al.*, 1996 ; Rovere *et al.*, 1998 ; Heath *et al.*, 2004). Par ailleurs, si l'antigène présente un signal de sécrétion, il peut être directement phagocyté par les CPA permettant sa présentation sur les molécules de CMH de classe II induisant une réponse immunitaire de type humoral (Boyle *et al.*, 1997).

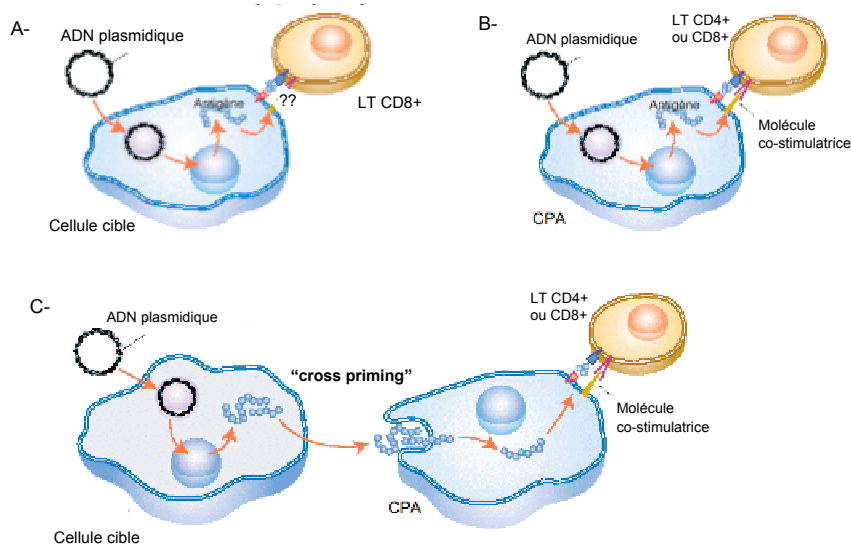


Figure 23 : Mécanismes hypothétiques de la présentation de l'antigène après une immunisation génique

(d'après Liu *et al.*, 2003)

### I.3.1.3 Avantages et inconvénients de l'immunisation génique

L'immunisation génique présente de nombreux **avantages** par rapport à des protocoles d'immunisation plus classiques. Ainsi contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse *in vivo* de la protéine codée par le plasmide devrait permettre l'expression de l'antigène dans sa conformation native, correctement glycosylé et ayant subi des modifications post-traductionnelles similaires à celles subies par l'agent infectieux naturel dans le cadre de pathogènes eucaryotes. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces. De plus, l'immunisation génique peut induire à la fois une réponse immunitaire de type humoral et cellulaire. Par ailleurs, la simplicité de la préparation du plasmide par rapport aux vaccins protéiques est remarquable. Ainsi toute molécule pouvant être fabriquée par recombinaison peut être utilisée pour la vaccination à ADN. Le coût de production est donc inférieur à celui des vaccins protéiques. De plus, les vaccins à ADN n'ont pas besoin de chaîne du froid pour conserver leur efficacité. Cette perspective devrait permettre d'envisager un essor de ce type de vaccination dans les pays où, d'une part, la

## *INTRODUCTION : Généralités sur l'immunisation génique*

température pourrait dégrader la qualité des vaccins protéiques et, d'autre part, les ressources financières ne permettent pas l'installation et la maintenance de chaînes du froid.

Toutefois, il existe des **risques** associés à l'inoculation de vecteurs plasmidiques. Le premier est qu'ils peuvent entraîner la stimulation de lymphocytes B auto-réactifs et ainsi engendrer la sécrétion d'auto-anticorps anti-ADN (Katsumi *et al.*, 1994). Cependant, la quantité et la durée de production de tels anticorps n'apparaît pas suffisante pour déclencher une maladie auto-immune chez un animal sain ou même d'accélérer une maladie auto-immune chez un animal susceptible (annexe 1 : Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications, FDA, 2005). L'hypothèse de l'intégration du vecteur plasmidique dans l'ADN de la cellule transfectée est inquiétante (Nichols *et al.*, 1995). Une telle intégration pourrait notamment mener à la transformation cancéreuse de la cellule transfectée au cas où elle se ferait dans ou à proximité d'une séquence de suppresseurs de tumeur ou d'oncogènes (annexe 1 : Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications, FDA, 2005). Cependant de nombreux travaux ont estimé que ce risque d'intégration était mille fois moins important que le taux de mutations spontanées du génome (Nichols *et al.*, 1995 ; Ledwith *et al.*, 2000). Par précaution, les vecteurs utilisés lors d'immunisations géniques ne doivent pas présenter de séquences homologues avec le génome humain pour éviter toutes recombinaisons.

### **I.3.2 Les outils de transfert de gènes**

La principale limite de l'immunisation génique réside dans le développement de système de transfert de gènes. En effet, pour parvenir au noyau de la cellule transfectée, l'ADN plasmidique doit surmonter plusieurs barrières biologiques. Or, en raison de leur caractère hydrophobe, les membranes cellulaires sont peu perméables aux structures polyanioniques que sont les acides nucléiques. Ainsi l'utilisation de vecteurs permettant un transport efficace du gène d'intérêt est nécessaire pour permettre une expression protéique suffisante et le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace.

#### **I.3.2.1 Vecteurs viraux**

De part leurs propriétés naturelles, les virus ont été les premiers vecteurs à avoir été utilisés. Ils reposent sur l'utilisation du matériel génétique des virus pour le transport de l'ADN d'intérêt au sein de la cellule cible permettant une pénétration intracellulaire efficace ainsi que la persistance du matériel génétique (Kay *et al.*, 2001). Cependant, le génome viral est modifié afin de supprimer les séquences responsables de sa réplication et de sa virulence. Le virus ainsi modifié conserve ses propriétés de pénétration au sein des cellules permettant l'expression de la protéine d'intérêt mais sans production de particules virales. Les principaux types de vecteurs viraux utilisés sont représentés dans le Tableau 8.

Toutefois, même si ces vecteurs sont très immunogènes, ils posent des problèmes de toxicité notamment d'intégration dans le génome de la cellule transfectée. Cette complication a été rencontrée par l'équipe d'Alain Fisher lors de l'utilisation d'un rétrovirus dérivé du MLV (Murine Leukemia Virus) chez des enfants atteints d'immunodéficience sévère liée au chromosome X (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Les rétrovirus utilisés se sont intégrés préférentiellement à proximité d'une région d'activation d'un proto-oncogène (LMO2 qui code un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de l'hématopoïèse). Cette intégration a entraîné la surexpression de LMO2 chez les patients les plus jeunes, engendrant une leucémie. Ces problèmes ont conduit à l'arrêt de cet essai et ont incité les chercheurs à développer des vecteurs non viraux plus sûrs.

*INTRODUCTION : Généralités sur l'immunisation génique*

Nom	Description	Taille de l'insert	Intégration dans le génome	Avantages	Inconvénients
Oncorétrovirus	Constitués d'ARN transcrit dans le cytoplasme en ADN <sup>1</sup>	-	-	⇒Les premiers utilisés en recherche <sup>2</sup> puis ayant donné lieu à un essai clinique <sup>3</sup> ⇒Expression à long terme	⇒Doivent attendre la mitose pour pénétrer dans le noyau ⇒Intégration non contrôlée dans le génome de l'hôte <sup>5</sup>
Lentivirus	Rétrovirus dérivés du Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH)	7kb	Oui	⇒Infectent les cellules quiescentes <sup>4</sup> ⇒Expression à long terme	⇒Immunogènes (gènes du VIH encore présents) ⇒Difficultés à produire en grande quantité
Adénovirus	ADN double brin qui reste en position épisomale	5-8kb	Non	⇒Infectent les cellules quiescentes ⇒Très forte efficacité de transfection dans beaucoup de tissus	⇒Expression transitoire du gène ⇒Forte immunogénéicité (pouvant être réduite <sup>6</sup> )
Virus associés aux adénovirus (AAV)	ADN simple brin Nécessité de les associer aux adénovirus pour les propriétés d'encapsidation	4kb	?	⇒Non immunogènes	⇒Taille du gène limitée
Herpes Simplex HSV-1	ADN double brin qui devient circulaire dans le noyau	35kb	Non	⇒Large capacité (40kb) ⇒Transfectent les cellules en division ou non	⇒Tropisme naturel pour les neurones <sup>6</sup> ⇒Induit une toxicité cellulaire

<sup>1</sup>Barquirero et al., 2004, <sup>2</sup> Cone et al., 1984, <sup>3</sup>Rosenberg et al., 1990, <sup>4</sup>Uchida et al., 1998, <sup>5</sup>Hacein-Bey-Abina et al., 2003, <sup>6</sup>Thomas et al., 2003

Tableau 8 : Vecteurs viraux utilisés en immunisation génique

### I.3.2.2 Vecteurs non-viraux

L'utilisation de vecteurs non-viraux impose de trouver un équilibre entre faible cytotoxicité et forte efficacité du vecteur. Ainsi, l'ADN doit atteindre le noyau et être exprimé de façon efficace, sans provoquer de trop importants dommages dans la cellule. Ces méthodes sont actuellement en plein essor et depuis l'injection d'ADN plasmidique nu, de nombreuses méthodes chimiques et physiques se sont développées.

**-ADN nu.** L'injection d'ADN nu plasmidique est le système d'administration le plus simple et le moins cher. En 1990, Wolff *et al.* ont montré que l'injection intra-musculaire d'ADN nu chez la souris permet l'expression efficace du transgène et ce pendant plusieurs mois. Puis, Tang *et al.* montrent que l'expression d'une protéine du non soi codée par un plasmide déclenche une réponse immunitaire spécifique (Tang *et al.*, 1992). Ces découvertes ouvrent la voie à de nombreuses applications notamment en thérapie génique et en vaccination. Si l'immunisation génique a permis l'obtention de résultats très encourageants chez des animaux expérimentaux de petite taille comme la souris, la réponse immune induite par des injections d'ADN nu chez des animaux de plus grande taille et notamment chez l'homme a été très décevante. En effet, la faible perméabilité des membranes cellulaires aux acides nucléiques ainsi qu'une dégradation très rapide de l'ADN nu par les nucléases limitent la transfection de cellules cibles par le plasmide (Mahato *et al.*, 1997). Il est donc nécessaire de le protéger de la dégradation et d'augmenter son temps de circulation, ceci pouvant être réalisé à l'aide de vecteurs chimiques.

**-Les lipides cationiques et polymères cationiques.** *Les lipides cationiques* sont des molécules monomériques composées de trois domaines : 1) une tête cationique permettant la liaison à l'ADN par des interactions électrostatiques, 2) un bras espaceur dont la composition détermine la biodégradabilité de la molécule et 3) une queue hydrophobe. Les complexes formés avec l'ADN sont appelés lipoplexes. Les lipides cationiques les plus fréquemment utilisés sont le DOTMA (chlorhydrate de N-(2,3-dioléxyloxypropyl)-N,N,N-triméthylammonium), le DOSPA (2,3-dioléxyloxy-N-2-(sperminecarboxyamido)-éthyl-N,N-diméthyl-propanammonium) et la DOGS (dioctadécylamidoglycylspermine). *Les polymères cationiques* sont des molécules riches en amines, en lysines ou en arginines, groupements



## INTRODUCTION : Généralités sur l'immunisation génique

protonés à pH physiologique. Cette constitution leur confère, dans des conditions physiologiques, des propriétés d'interactions électrostatiques avec l'ADN chargé négativement. Les complexes formés avec l'ADN sont appelés polyplexes. On peut citer parmi les polymères cationiques le PEI (polyéthylèneimine) connu pour ses propriétés de transfection *ex vivo* intéressantes. Les lipoplexes ou polyplexes chargés positivement favorisent le transfert d'ADN à l'intérieur de la cellule (Scherman *et al.*, 1998 ; Pietersz *et al.*, 2006). Les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus (Figure 24). Deux hypothèses sont proposées 1) la voie de l'endocytose et 2) le complexe fusionne avec la membrane plasmique libérant l'ADN dans le cytoplasme (Labat-Moleur *et al.*, 1996 ; Zabner *et al.*, 1995). Ainsi, l'efficacité de transfection engendrée par les lipides ou polymères cationiques est dépendante du rapport entre la charge ADN et les charges positives. Toutefois, si les lipoplexes ou polyplexes présentent une bonne efficacité *ex vivo*, leur injection dans la circulation systémique est décevante. En effet, ils activent souvent le complément et sont donc rapidement dégradés (Plank *et al.*, 1996). De plus, les charges positives présentes à la surface des complexes interagissent également avec les protéines du sérum entraînant la formation d'agrégats pouvant conduire à une embolisation. Ainsi, l'efficacité *in vivo* des lipoplexes et polyplexes est donc un compromis entre leur quantité en lipides ou polymères cationiques permettant un niveau de transfection intéressant et leur toxicité.

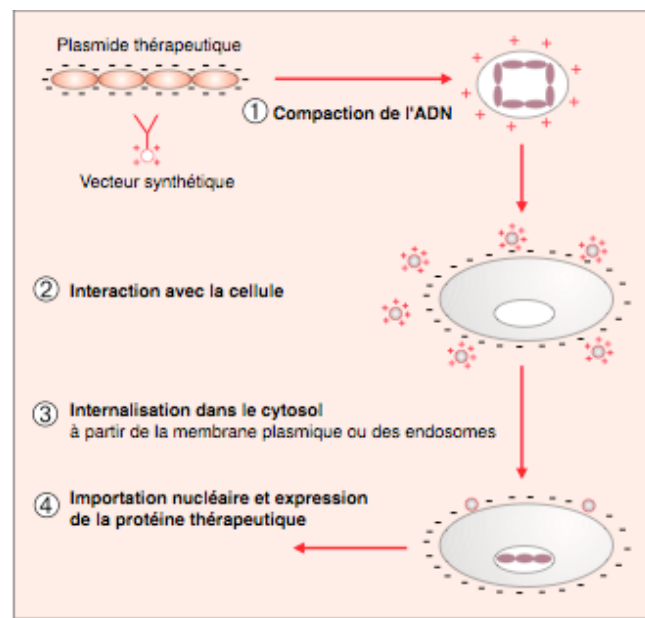


Figure 24 : Principales fonctions des lipides et polymères cationiques

(d'après Kreiss *et al.*, 1999)

**-Les co-polymères amphiphiles.** L'un des buts essentiels du développement de nouveaux vecteurs consiste à trouver une structure qui permette à ces derniers de résister aux contraintes des milieux intra et extra-cellulaire. Récemment, les polymères amphiphiles non-ioniques ont montré leur efficacité en tant que transporteur d'ADN *in vivo* au niveau de différents tissus comme les muscles, l'oeil, le coeur ou les poumons (Lemieux *et al.*, 2000 ; Liaw *et al.*, 2001 ; Pitard *et al.*, 2002 ; Designaux *et al.*, 2005). Ces polymères sont obtenus par polymérisation de plusieurs types de monomères dont typiquement un est hydrophobe et l'autre hydrophile, entraînant la formation de micelles (Letchford *et al.*, 2007). Cette molécule est donc composée de régions ayant des affinités opposées pour un solvant aqueux. Cette structure unique lui confère le nom de surfactant. La formation de micelles permet 1) de compacter l'ADN, 2) d'augmenter son temps de circulation et 3) de diminuer les interactions toxiques avec des molécules de l'organisme comme le complément et les protéines sériques.

### I.3.2.3 Outils physiques

Les méthodes physiques de transfert de gène sont actuellement en plein essor (voir pour revue : Wells *et al.*, 2004).

**-Le transfert de gène hydrodynamique.** Cette méthode repose sur l'injection d'un grand volume (équivalent au volume sanguin total) d'une solution plasmidique dans la veine de la queue d'un rongeur entraînant une transfection efficace essentiellement dans le foie. En effet, cette injection engendre une baisse transitoire de la fonction cardiaque et une augmentation rapide de la pression des veines, notamment du foie, entraînant d'une part une hydroporation (apparition transitoire de pores au niveau de la membrane plasmique) et d'autre part une hyperméabilité des hépatocytes (Zhang *et al.*, 2004 ; Andrianaivo *et al.*, 2004 ; Kobayashi *et al.*, 2004). Cette technique, difficilement applicable chez l'homme, est actuellement utilisée pour transférer le gène de la dystrophine dans un modèle canin de dystrophie musculaire (Braun *et al.*, 2004).

**-Les ultrasons.** Cette méthode repose sur l'utilisation d'ultrasons de faible ou forte intensité permettant la transfection du muscle squelettique, de l'artère carotidienne ou du coeur (Taniyama *et al.*, 2002 ; Schratzberger *et al.*, 2002 ; Danialou *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*,

2003 ; Chen *et al.*, 2003 ; Bekeredjian *et al.*, 2003). En effet, l'application localisée d'ultrasons résulte en une désorganisation tissulaire et une augmentation transitoire de la perméabilité membranaire. Cette méthode a pour avantage d'être non invasive.

**-Laser et champs magnétiques.** Un *laser* femtoseconde à infrarouge a permis de transférer des cellules musculaires murines (Zeira *et al.*, 2003 ; Zeira *et al.*, 2007). Le laser, focalisé sur une zone de 2mm de profondeur, permet une expression efficace et à long terme de la protéine d'intérêt, sans induire de dommages musculaires. Le mécanisme expliquant cette transfection n'est pas encore connu mais il semblerait que le laser entraîne une désorganisation de la membrane plasmique musculaire augmentant sa perméabilité. Un *champ magnétique* peut être utilisé pour transférer un ADN couplé à des nanoparticules paramagnétiques. Ce procédé appelé magnétofection, a permis d'augmenter l'expression du transgène au niveau du tractus gastro-intestinal et la vasculature de l'oreille (Scherer *et al.*, 2002). Ces deux procédés sont encore très récents et nécessitent des études complémentaires.

**-Canon à ADN ou « gene gun ».** Cette technique, utilisée depuis les années 90, consiste à bombarder un tissu, généralement l'épiderme, ou des cellules cibles avec des billes d'or de 1 à 5 µm revêtues par de l'ADN (Tang *et al.*, 1992). L'ADN pénètre ainsi directement dans les cellules de la peau et n'est pas dilué dans le milieu extracellulaire. Cette technique nécessite donc des quantités en ADN plus faibles pour générer une réponse immunitaire équivalente (Fynan *et al.*, 1995 ; Fuller *et al.*, 2006).

**-L'électrotransfert.** Cette méthode est basée sur des études antérieures mettant en évidence la possibilité de transférer des cellules *ex vivo* en appliquant une série d'impulsions électriques (Neumann *et al.*, 1982). Ces chocs électriques auraient deux effets : 1) ils engendreraient une désorganisation membranaire permettant une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique et 2) le champ électrique ainsi formé permettrait la migration de l'ADN chargé du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire par migration électrophorétique. L'électroperméabilisation peut aussi être utilisée pour administrer des drogues aux cellules : c'est l'électrochimiothérapie. En 1991, le premier essai clinique utilisant ces propriétés a été autorisé pour faciliter l'entrée de la bléomycine dans les cellules tumorales (Mir *et al.*, 1991). Historiquement, l'électroporation *in vivo* de l'ADN a été utilisée en premier lieu pour le transfert de gène dans la peau et le foie au début des années 90

### *INTRODUCTION : Généralités sur l'immunisation génique*

(Titomirov *et al.*, 1991 ; Heller *et al.*, 1996). Depuis, cette technique, qui permet une augmentation de l'expression du transgène de 100 à 1000 fois en comparaison avec des injections d'ADN nu, est en plein essor. Cette méthode est principalement utilisée pour le transfert de gène dans le muscle squelettique ou les tumeurs (Rols *et al.*, 2000; Bettan *et al.*, 2000 ; Rizzuto *et al.*, 1999 ; Mir *et al.*, 1999 ; Mathiesen, 1999) mais également dans les artères (Matsumoto *et al.*, 2001), la peau (Maruyama *et al.*, 2001), le foie (Heller *et al.*, 2000), le tendon (Jayankura *et al.*, 2003), la vessie (Harimoto *et al.*, 1998), la cornée (Blair-Parks *et al.*, 2002), les cellules rétiniennes (Dezawa *et al.*, 2002), la moelle épinière (Lin *et al.*, 2002) et le cerveau (Inoue and Krumlauf, 2001). L'électrotransfert est également utilisé en vaccination génique. De nombreuses études montrent que cette technique augmente l'amplitude de la réponse immunitaire contre de nombreux antigènes (Tollefsen *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2003 ; Scheerlinck *et al.*, 2004). Même si l'électroporation *in vivo* semble augmenter le risque d'intégration de l'ADN plasmidique dans le génome de l'hôte, cet événement reste toujours en dessous du niveau de mutations spontanées de ce même génome (Wang *et al.*, 2004).

### I.3.3 Essais thérapeutiques

#### I.3.3.1 En thérapie génique

Depuis le premier essai clinique en 1989, plus de 1300 essais ont été ou sont en cours de réalisation à travers le monde (Figure 25). L'essentiel de ces essais se trouve en phase I (Figure 26).

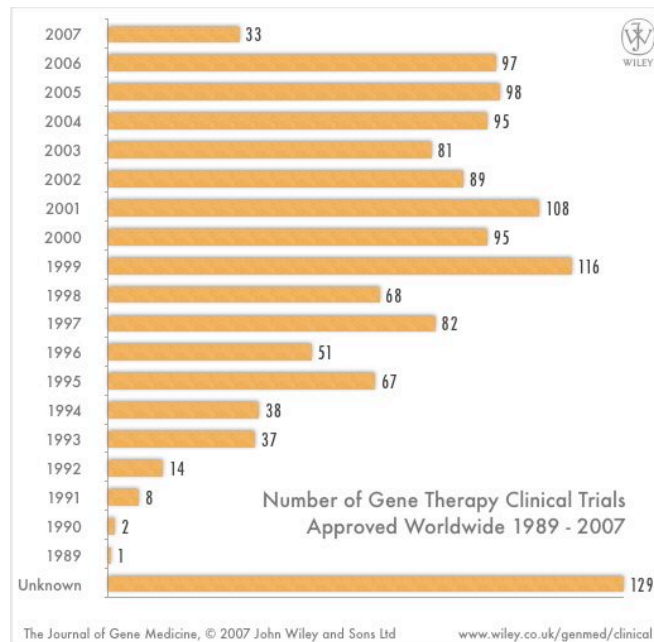


Figure 25 : Répartition des essais cliniques selon leur année d'initiation.

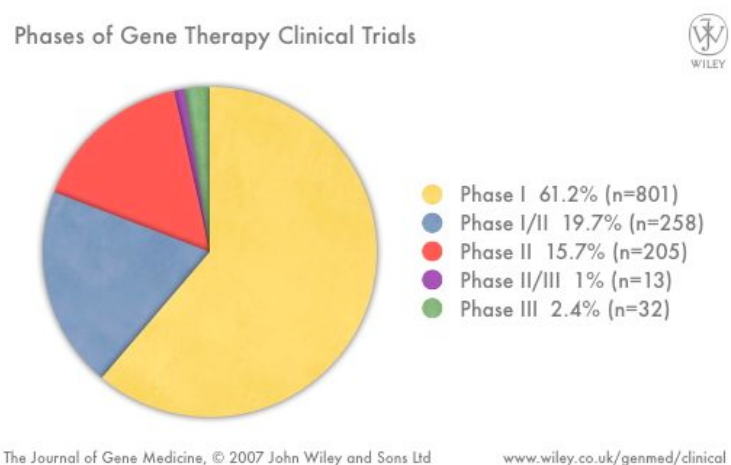


Figure 26 : Répartition des essais cliniques en fonction des phases.

## INTRODUCTION : Généralités sur l'immunisation génique

Le pays leader en nombre d'essais cliniques est les Etats-Unis avec plus de 66% des tests réalisés (Figure 27). Cette différence est essentiellement due à une législation plus souple et des moyens plus importants.

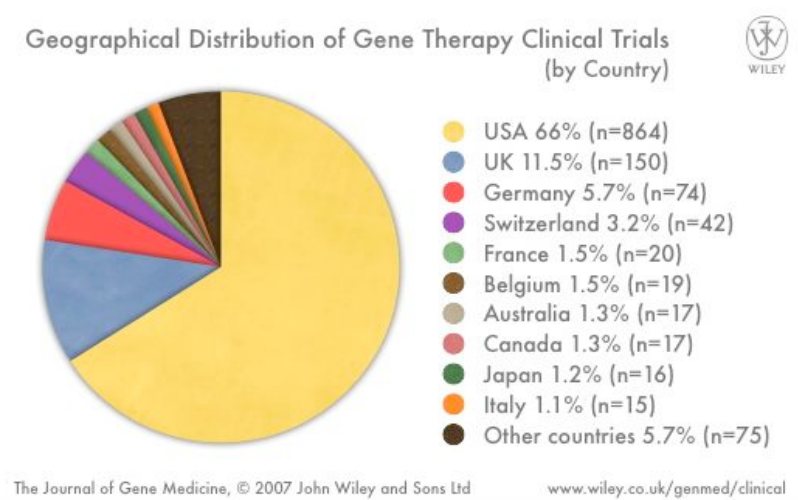


Figure 27 : Répartition des essais selon les pays.

Si à l'origine la thérapie génique s'adressait plutôt aux traitements des maladies monogéniques héréditaires, la tendance a bien évolué puisque qu'aujourd'hui 66% des essais visent le traitement des cancers, contre moins de 10% pour les maladies monogéniques (Figure 28). Les autres domaines d'application principaux sont les maladies vasculaires et infectieuses.

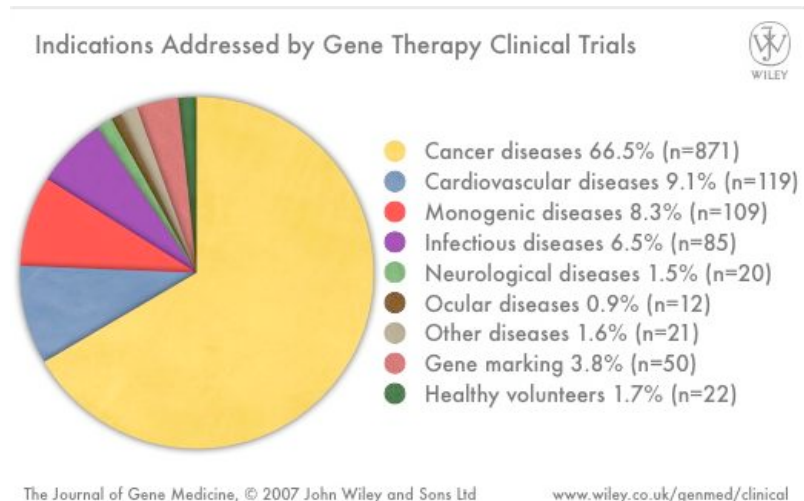


Figure 28 : Répartition des essais cliniques selon le type de maladie

### I.3.3.2 En vaccination génique

La première étude basée sur la vaccination génique réalisée chez l'homme a été effectuée en 1998 contre le VIH (virus d'immunodéficience humaine) (MacGregor *et al.*, 1998 ; voir pour revue : Ulmer *et al.*, 2006). Actuellement, de nombreux essais cliniques sont en cours. Ils concernent essentiellement des maladies virales (VIH, virus de l'hépatite B, dengue, influenza) et cancéreuses (papillomavirus humain, mélanome, cancer ovarien ou rénal). Tous ces essais sont répertoriés sur le site : [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov). En 2005, deux vaccins à ADN ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché : l'un est dirigé contre le WNV (West Nile virus) chez le cheval et l'autre contre le IHNV (infectious hematopoietic necrosis virus) chez le saumon (Powell, 2004 ; Lorenzen and LaPatra, 2005). Ces licences constituent un vrai pas en avant pour la vaccination génique. En effet, les bonnes réponses immunitaires obtenues chez le cheval démontrent que l'immunisation génique peut également être efficace chez des animaux de grande taille contrairement aux premières hypothèses avancées et qu'une expression *in vivo* efficace de l'antigène représente un élément important pour une bonne réponse au vaccin.

Les recommandations de la FDA aux industries pour le développement de vaccins géniques est répertorié dans l'annexe 1.

## **II. OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THÈSE**



Les maladies à prions ou encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) sont des maladies neurodégénératives fatales. La transconformation de la protéine prion cellulaire (PrP<sub>c</sub>) en une isoforme pathogène (PrP<sub>sc</sub>) semble être l'élément central de la pathogenèse. Globalement, l'incidence des ESST humaines est faible. De plus, depuis que des tests-diagnostiques *post-mortem* sont obligatoires sur tous les bovins abattus en Europe (2000), les risques de transmission de la maladie des bovins vers l'homme sont désormais considérés comme négligeables. Toutefois, de par la longue période d'incubation de la maladie chez l'homme et l'apparition de nouveaux risques de transmission de ces maladies par transfusion sanguine et greffe d'organes, les ESST représentent toujours un véritable problème de santé publique nécessitant le développement de traitements prophylactiques et/ou thérapeutiques. En raison des perspectives peu encourageantes offertes par les traitements reposant sur l'utilisation de composés chimiques, la recherche s'est orientée vers des stratégies immunologiques (ou immunothérapie) et, plus particulièrement, vers l'utilisation d'anticorps dirigés contre la PrP<sub>c</sub>.

Depuis le développement de la technique des hybridomes par Köhler et Milstein, les anticorps sont apparus comme une classe importante de médicaments dans de nombreux domaines tels que l'oncologie, les maladies infectieuses et inflammatoires. Toutefois, les défis majeurs de l'immunothérapie passive humaine sont, d'une part, la génération d'anticorps protecteurs dirigés contre une conformation native de protéines humaines et, d'autre part, leur optimisation par ingénierie moléculaire pour une utilisation efficace *in vivo*.

L'immunisation génique qui consiste à injecter l'ADNc codant la protéine cible présente les avantages, d'une part, de ne nécessiter aucune purification de la protéine antigénique (étape pouvant être particulièrement délicate selon l'antigène étudié) et, d'autre part, de permettre la synthèse de l'antigène *in situ* sous sa conformation native. Ainsi, une telle méthode d'immunisation devrait permettre de favoriser la production d'anticorps protecteurs dirigés contre la conformation native de l'immunogène.

Ce travail de thèse a donc pour objectifs :

- 1) de développer de nouveaux outils pour l'*immunothérapie passive* par un protocole d'immunisation génique permettant la production d'anticorps à visée thérapeutique dirigés contre la conformation native de la PrP<sub>c</sub> humaine et, plus généralement, contre une conformation native d'une protéine humaine faiblement immunogène chez des souris de type sauvage.

2) d'évaluer rapidement le potentiel thérapeutique des fragments bivalents ou monovalents *ex vivo*, permettant la sélection des anticorps monoclonaux à cloner en vue d'une éventuelle utilisation *in vivo*.

3) de développer de nouvelles méthodes d'*immunothérapie active* permettant de rompre la tolérance contre une protéine du soi chez des souris de type sauvage.

Dans un souci d'une meilleure compréhension des résultats, nous avons choisi de présenter, dans une première partie consacrée à l'immunothérapie passive, l'étude de l'effet thérapeutique *ex vivo* de fragments Fab dérivés d'anticorps monoclonaux anti-PrPc, puis, celle de différents protocoles d'immunisation génique pour le développement de nouveaux anticorps thérapeutiques. Dans une seconde partie consacrée à l'immunothérapie active, nous allons exposer nos résultats concernant de l'étude de différents protocoles d'immunisation pour produire des anticorps dirigés contre une protéine du soi chez des souris de type sauvage.

### **III. RESULTATS**

### **III.1 Immunothérapie passive**

#### **III.1.1 Evaluation de l'effet curatif *ex vivo* de fragments Fab dérivés d'anticorps monoclonaux anti-PrP**

Au cours de ces dernières années de nombreuses études ont rapporté l'effet antagoniste des anticorps anti-PrP sur l'accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans différentes lignées de cellules chroniquement infectées (Beringue *et al.*, 2004 ; Enari *et al.*, 2001 ; Gilch *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2004 ; Perrier *et al.*, 2004 ; Féraudet *et al.*, 2005). Toutefois, même si les mécanismes d'action de ces anticorps sont toujours controversés, il semblerait qu'ils exercent essentiellement un effet protecteur impliquant une interaction directe paratope-épitope de l'anticorps sur la PrP<sup>c</sup> plutôt qu'un effet effecteur impliquant la partie Fc de l'anticorps conduisant à la mort cellulaire (Peretz *et al.*, 2001).

Dans le but, d'une part, de sélectionner les anticorps thérapeutiques candidats à cloner pour une étude *in vivo* et, d'autre part, d'analyser l'importance ou non de la bivalence de ces anticorps recombinants dans l'exercice d'une activité thérapeutique, nous avons comparé l'effet de cinq anticorps monoclonaux et de leur dérivé Fab pour leur capacité à inhiber la réplication de la PrP<sup>sc</sup> dans un modèle cellulaire murin chroniquement infecté.

Ces travaux s'articulent en trois volets. Dans un premier lieu, nous avons sélectionné les anticorps candidats en fonction du criblage de 145 anticorps réalisé dans notre laboratoire (Féraudet *et al.*, 2005). Puis, nous avons produit les Fab correspondants et nous avons vérifié la fonctionnalité de leur paratope par des dosages immunométriques par compétition et de cytométrie en flux afin de comparer leurs effets pharmacologiques *ex vivo* sur des cellules de neuroblastomes murin (N2a) infectées.

Ce travail fait l'objet d'une publication sous forme d'un article en cours de rédaction.

### III.1.1.1 Détermination des anticorps candidats

Une partie du travail de doctorat de Cécile Féraudet a consisté à étudier l'effet de 145 anticorps monoclonaux, produits au laboratoire, sur la réplication de la PrPsc dans différents modèles de cellules infectées. Ces 145 anticorps monoclonaux anti-PrP sont issus de campagnes d'immunisation de souris invalidées pour le gène *Prnp* par différents immunogènes (peptides de PrP, PrP recombinante ou agrégats de PrPsc (Scrapie Associated Fibrils ou SAF)). Ils reconnaissent, pour la plupart, la PrP dénaturée, la PrPc et/ou les SAF. Mais aucun n'a été identifié comme spécifique de la PrPsc. Tous les anticorps monoclonaux utilisés ont été purifiés à partir d'ascites murins soit par précipitation à l'acide caprylique (Reik *et al.*, 1987) soit par chromatographie d'affinité sur colonne de protéines A. L'identification de leur épitope a été réalisée par la méthode de synthèse peptidique Spot (Frank, 2002) modifiée par Molina *et al.* (Molina *et al.*, 1996) au moyen de peptides de PrP de 20 acides aminés, décalés les uns des autres d'un résidu et synthétisés sur une membrane de cellulose (Abimed, Langelfed, Allemagne). Cette méthode a pour avantage de permettre une présentation de tous les peptides dans la même orientation (liaison des peptides à la membrane par leur résidu C-terminal). La réactivité des anticorps pour chaque peptide est alors révélée au moyen d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à une phosphatase.

Parmi ces 145 anticorps, nous avons choisi cinq anticorps ayant les caractéristiques suivantes :

1) ces anticorps sont capables d'inhiber au moins 70% de l'accumulation de la PrPsc à 10µg/ml dans les conditions expérimentales utilisées (voir le paragraphe Résultats ; 1.1.4.2 *Le principe du dosage de la PrPsc dans des cellules chroniquement infectées*).

2) ces anticorps reconnaissent, pour la plupart, des épitopes différents. Les anticorps que nous avons sélectionnés pour cette étude sont : Bar223, Bar233, Bar236, SAF34 et Sha31 (Figure 29).

3) ces anticorps reconnaissent la PrPc murine et la PrPc humaine.

A-

Anticorps	Isotype	Immunogène	Epitope reconnu sur la PrP
Bar223	IgG2a	PrP recombinante ovine	Conformationnel
Bar233	IgG2b		141-FGSDYEDRYR-151
Bar236	IgG2c		Conformationnel
SAF34	IgG2a	SAF de hamster Syrien traités à la PK et dénaturés en acide formique	59-QPHGGGW(x4)-89
Sha31	IgG1	SAF de hamster Syrien traités à la PK et non dénaturés	145-YEDRYR-152

B-

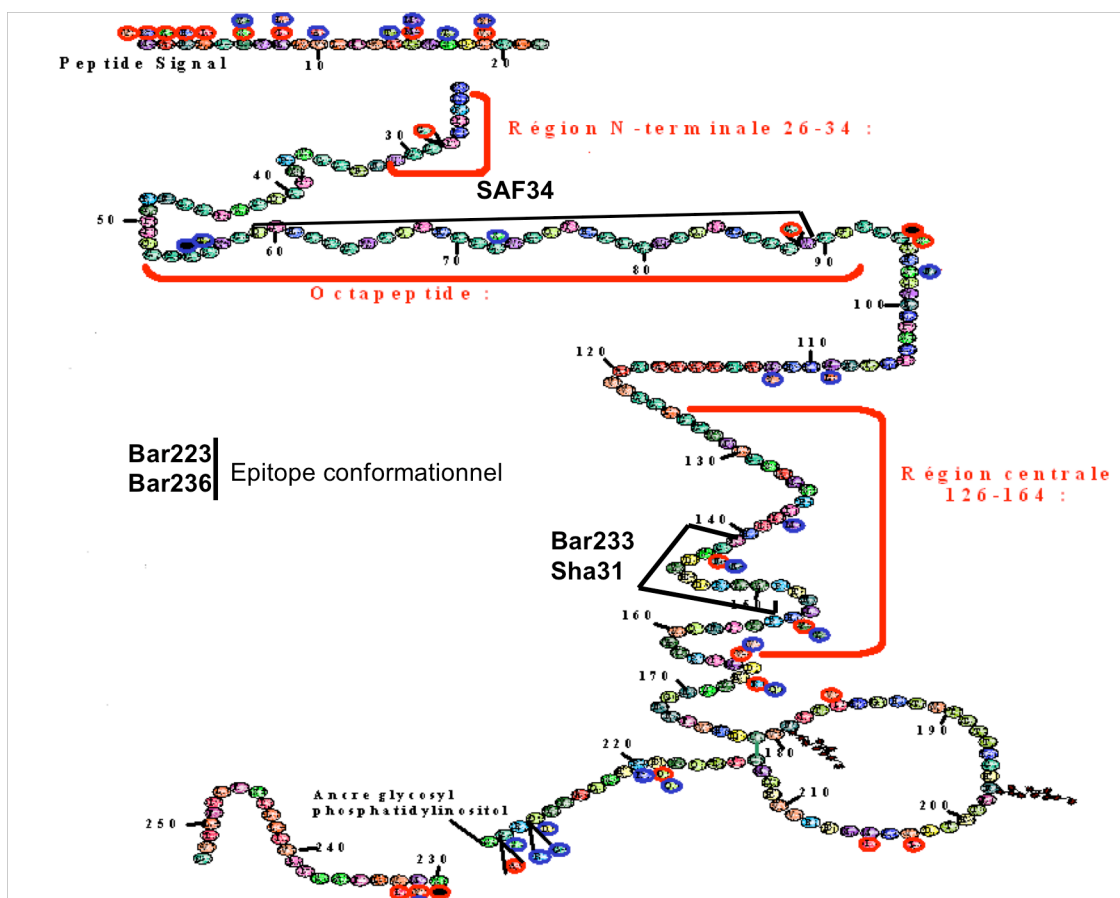


Figure 29 : Liste des cinq anticorps monoclonaux utilisés dans cette étude.

### III.1.1.2 Production et vérification de la fonctionnalité des fragments Fab

Les fragments Fab sont des dérivés monomériques d'anticorps ayant la propriété de se lier avec l'antigène. Ils sont composés d'une chaîne légère entière et d'un fragment de la chaîne lourde contenant les domaines VH et CH1, les deux étant reliés par des ponts disulfures (voir la partie Introduction bibliographique : *Introduction à l'immunothérapie*).

#### III.1.1.2.1 Production des Fab

Les fragments Fab sont obtenus par coupure à la papaïne de l'anticorps entier au-dessus de la région charnière. La préparation est délicate et le rendement est dépendant de la sous-classe de l'anticorps. Cependant, dans tous les cas, il est nécessaire d'utiliser des solutions très concentrées en anticorps (au moins 3mg/ml) pour obtenir un bon rendement de coupure. La papaïne est une thiol protéase dont l'action nécessite la présence d'un cofacteur réduisant les ponts disulfures, la cystéine (Adamczyk *et al.*, 2000). Afin de mieux contrôler la réaction de coupure de l'anticorps, la papaïne est couplée à un gel de sépharose (Kilara *et al.*, 1977).

#### Protocole :

*Un gramme de gel de sépharose activé (activated CH Sepharose 4B, Pharmacia) est mis à gonfler dans 25ml d'HCL 1mM par agitation pendant 30min à température ambiante. Le gel est ensuite déposé sur un beckner sous vide et on y ajoute 10ml de tampon borate (0,1M, pH 8). Le gel est récupéré et on y ajoute 6mg de papaïne (sigma) repris dans 15ml de tampon carbonate (0,1M, pH 8) puis on agite 2 heures à température ambiante. Le pH 8 est le pH optimum pour associer la papaïne au gel de sépharose. Après agitation, le gel est rincé avec 200ml de tampon carbonate (0,1M, pH 8) puis avec 100ml de tampon Tris-HCl (0,1M, pH 8). Le gel est enfin repris dans 15ml d tampon Tris-HCl (0,1M, pH 8) par agitation pendant 3 heures à température ambiante. Puis il est rincé avec du tampon phosphate (0,1M, pH 7,4), et peut être ainsi stocké pendant plusieurs semaines à 4°C en présence de 0,01% d'azide de sodium.*

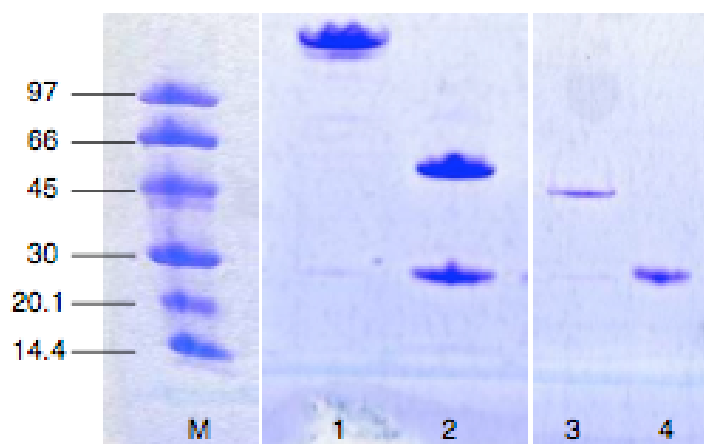
*Dans le protocole standardisé, 500µg d'anticorps sont ajoutés à 1mM final d'EDTA (ethylene diamine tetra acetique acide) et 10mM final de cystéine dans du tampon*

*RESULTATS : Immunothérapie passive*

*phosphate de sodium (50mM, pH 7). Le gel de papaine est ajouté au mélange anticorps-cystéine-EDTA. La réaction est menée 5 heures à 37°C sous agitation puis elle est arrêtée par centrifugation (5min, 13000rpm) permettant la séparation du gel de papaine des fragments d'anticorps après addition de 2,5mg d'iodoacétamide. Les anticorps non coupés sont éliminés par passage des échantillons sur colonne de protéines A. La cystéine résiduelle est neutralisée en incubant les Fab avec du NEM (N-ethylmaleimide, 0,5M) 20min à 20°C puis éliminé par dialyse sur la nuit contre du Tris-HCl (0,1M, pH 8). La pureté est vérifiée sur un gel d'électrophorèse (phast system, Pharmacia) et leur quantité est évaluée par lecture au spectrophotomètre à 280nm.*

La pureté et l'intégrité des anticorps et de leur dérivé Fab ont été vérifiées par électrophorèse. La Figure 30 représente le résultat que nous avons obtenu avec l'anticorps SAF34 et son dérivé Fab SAF34. Une unique bande de 150kD a pu être mise en évidence pour l'anticorps entier SAF34 dans des conditions non réductrices (ligne 1), confirmant la pureté de l'anticorps monoclonal utilisé pour la production des Fab. Comme attendues, deux bandes de 50kD et 25kD ont été obtenues pour l'anticorps entier dans des conditions réductrices correspondant aux chaînes lourdes et légères respectivement (ligne 2). Concernant les fragments Fab, une bande caractéristique de 45kD a pu être mise en évidence dans des conditions non réductrices (ligne 3) et de 25kD dans des conditions réductrices (ligne 4). Des résultats similaires ont été obtenus avec les 4 autres anticorps montrant la pureté des cinq anticorps et de leur dérivé Fab.





Migration protéique sur un gel 10-15% (PhastGel™) et révélée par une coloration au bleu de Coomassie. *Ligne M* : marqueur de poids moléculaire LMW (Amersham) ; *Ligne 1* : anticorps SAF34 purifié non réduit ; *ligne 2* : anticorps SAF34 purifié réduit ; *ligne 3* : Fab SAF34 purifié non réduit ; *ligne 4* : Fab SAF34 purifié réduit.

Figure 30 : Pureté des anticorps monoclonaux et de leur dérivé Fab : *exemple du SAF34*

La quantité en Fab produit est déterminée par spectrométrie à 280nm. Les concentrations obtenues sont récapitulées dans Tableau 9.

<b>Fab</b>	<b>Absorption à 280nm</b>	<b>Concentration (µM)</b>
Fab Bar223	1,33	20
Fab Bar233	0,52	7,9
Fab Bar236	0,42	6,4
Fab SAF34	0,57	8,6
Fab Sha31	0,90	13

Tableau 9 : Concentrations obtenues pour les cinq Fab étudiés.

### III.1.1.2.2 Vérification de leur fonctionnalité

#### III.1.1.2.2.1 Par un dosage immunométrique par compétition

Dans le but de vérifier la fonctionnalité des fragments Fab produits, nous avons évalué l'affinité apparente de chaque anticorps et de leur Fab correspondant pour la PrP murine et humaine par un dosage enzymo-immunométrique par compétition. Les anticorps ou les Fab sont immobilisés sur des plaques de microtitrage, ce qui nous permet de considérer chaque site de fixation de l'anticorps comme indépendant. Ainsi, leur affinité apparente est mesurée indépendamment du phénomène d'avidité.

#### Protocole (Figure 31) :

*Un anticorps de capture anti-souris (Affinipure goat antibodies anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch) à 10µg/ml en tampon phosphate 50mM est immobilisé sur la phase solide 96-puits (Immunoplate, Maxisorp, Nunc) par incubation une nuit à température ambiante. Les sites non spécifiques sont ensuite saturés en BSA (tampon EIA : 0,1M tampon phosphate pH 7,4 contenant 0.1% de BSA, 0,15M NaCl et 0,01% d'azide de sodium). Les plaques sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.*

*100µl des différents anticorps ou Fab à 20nM en tampon EIA sont incubés 2 heures à température ambiante. On a utilisé comme témoins isotypiques des anticorps dirigés contre l'I12 (IgG2a) ou la substance P (IgG1) produits au laboratoire. Après 3 lavages, 100µl/puits de PrP murine ou humaine recombinante biotinylée à 10µg/ml en tampon EIA sont incubés une nuit à 4°C en présence ou non de PrP murine ou humaine non marquée à différentes concentrations (de 0,8nM à 500nM). Après 3 lavages, 100µl/puits de streptavidine couplé à l'acétylcholinestérase (AChE) à 1 unité/µl en tampon EIA sont ajoutés pendant 2 heures à température ambiante. Puis, après 6 lavages, en présence de 200µl/puits de réactif d'Ellman contenant de l'acétylcholine et de l'acide dithio-bis-nitrobenzoïde (DTNB oxydé) (Grassi et al., 1989), l'AChE liée à la phase solide hydrolyse l'acétylcholine en libérant un acide carboxylique et de la thiocholine. Cette thiocholine réduit le DTNB qui revêt alors une couleur jaune. L'intensité de la coloration jaune étant proportionnelle à la quantité d'AChE, la mesure de l'absorbance à 414nm à*

30min permet d'évaluer directement la quantité de PrP murine ou humaine marquée liée aux anticorps ou Fab.

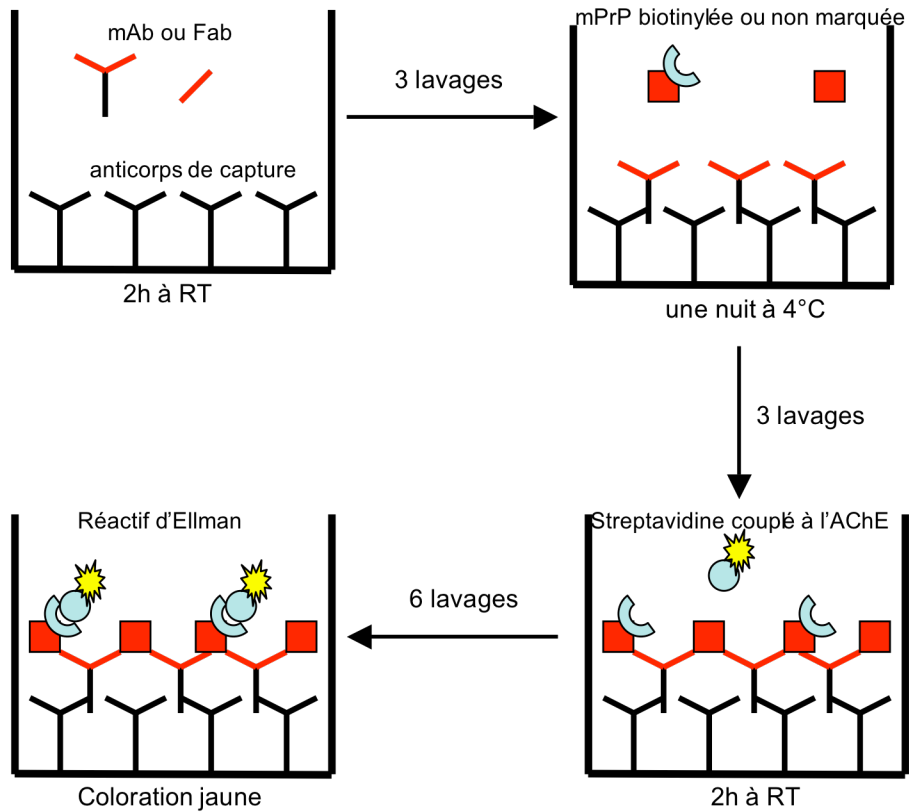
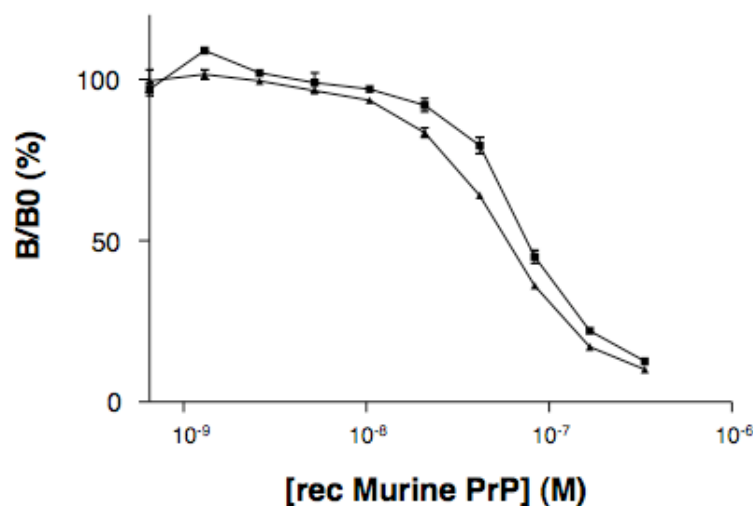


Figure 31 : Dosage enzymo-immométrique par compétition

L'affinité apparente (ou  $K_D$ ) représente la concentration en PrP murine ou humaine non marquée pour laquelle on atteint 50% du  $B/B_0$ . B et  $B_0$  constituent l'activité enzymatique en présence d'une concentration donnée ou en absence de compétiteur respectivement. La Figure 32 illustre les résultats obtenus pour le couple Bar236 vis à vis de la PrP murine.



Les résultats sont donnés en terme de  $(B/B_0) \times 100$  en fonction de la concentration en PrP murine non marquée (compétiteur). B et B<sub>0</sub> représentent l'activité enzymatique pour l'anticorps entier Bar236 (carrés) ou le Fab Bar236 (triangles) en présence ou en absence de compétiteur respectivement. L'affinité apparente est définie comme étant  $(B/B_0)_{50\%}$ .

Figure 32 : Détermination de l'affinité apparente par un dosage immunométrique par compétition : *exemple du couple Bar236 pour la PrP murine.*

D'après le Tableau 10, on observe que tous les couples anticorps entiers-Fab présentent un K<sub>D</sub> apparent similaire compris entre 1nM à 80nM pour la PrP murine et la PrP humaine. Il semblerait donc que conformation des paratopes de l'anticorps entier et de son Fab correspondant soit très similaire. Ainsi, ces résultats indiquent que la fonctionnalité du paratope des Fab est maintenue après digestion de l'anticorps par la papaïne.

	Bar223		Bar233		Bar236		SAF34		Sha31	
	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab
<b>K<sub>D</sub> apparent pour la PrP murine (nM)</b>	60	40	60	25	80	50	1	0,8	60	30
<b>K<sub>D</sub> apparent pour la PrP humaine (nM)</b>	60	10	30	5	40	20	10	2	10	30

Tableau 10 : Affinités apparentes des anticorps entiers et des Fab pour la PrP murine et la PrP humaine.

III.1.1.2.2.2 Par cytométrie en flux

Nous avons également évalué la reconnaissance des anticorps entiers et des Fab pour la conformation native de la PrP murine et humaine exprimée à la surface des cellules par des techniques de cytométrie en flux. Dans ce but, nous avons utilisé, d'une part, des cellules de neuroblastomes murins surexprimant la PrP murine et, d'autre part, des cellules embryonnaires humaines surexprimant la PrP humaine.

**→ Les lignées cellulaires utilisées**

a) Les cellules de neuroblastomes murins (N2a58)

Les cellules N2a (ATCC CCL131), fournies par Sylvain Lehmann (CNRS, Montpellier), correspondent à un sous-clone du neuroblastome murin C1300 qui est apparu dans une tumeur spontanée de la moelle épinière d'une souris A/J en 1940 (Augusti-Tocco and Sato, 1969). Les cellules utilisées dans cette étude, N2a58, ont été transfectées en stable par un plasmide codant le gène *Prnp* et le gène de résistance à la généticine (Lehmann and Harris, 1995).

b) Les cellules embryonnaires humaines surexprimant la PrP humaine (HEK-hPrP)

Nous avons transfecté en stable des cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) par un vecteur d'expression eucaryote codant la protéine prion humaine entière (p3-PrP1-253). Le protocole de transfection est décrit dans l'article Padiolleau-Lefèvre *et al.*, 2007.

Les deux types cellulaires, N2a58 et HEK-hPrP, sont cultivés sur flasque Corning Costar®, à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, en milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium* avec L'glutamine) contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté et 1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen). Une fois par semaine, 600µg/ml de généticine sont ajoutés au milieu pour maintenir la pression de sélection et donc la surexpression de PrP. Les cellules sont repiquées tous les 3 à 4 jours.

**→ Les résultats obtenus**

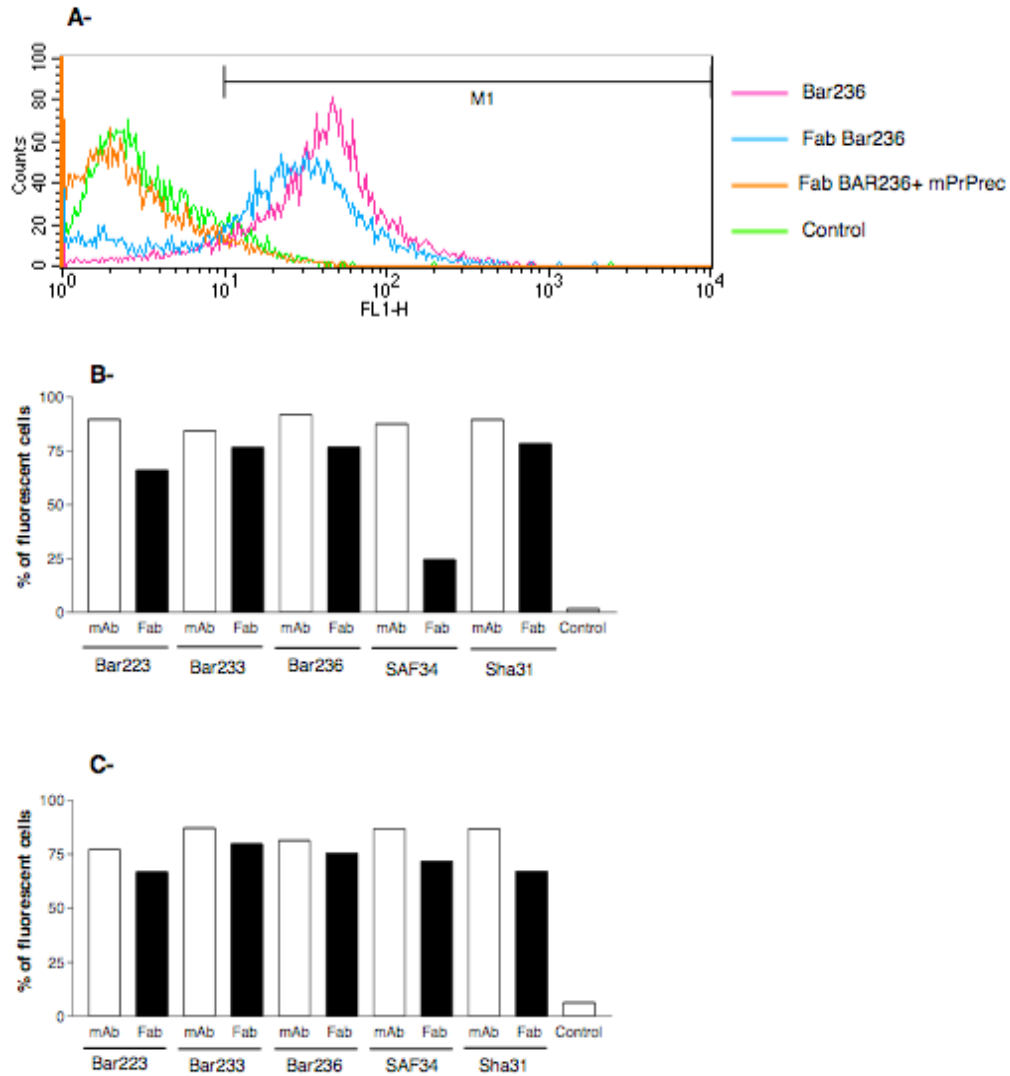
Protocole :

*Des cellules N2a58 ou HEK-hPrP sont cultivées à confluence puis décollées au moyen d'une solution de dissociation sans trypsine (Sigma) 5min à 37°C afin de ne pas dégrader la PrP en surface des cellules. Les cellules sont centrifugées à 1500rpm à 4°C pendant 5 min. Après deux lavages en PBS, les cellules sont incubées 2h à 4°C avec 100µl de tampon PBS/0,1% BSA/20% de sérum normal de chèvre contenant les anticorps entiers ou les Fab à différentes concentrations (de 10nM à 1000nM). Nous avons utilisé comme témoins isotypiques des anticorps dirigés contre l'IL2 (IgG2a) ou la substance P (IgG1) produits au laboratoire. Après deux lavages en PBS/0,1% BSA/1% de sérum normal de chèvre, les cellules sont incubées 1h à 4°C dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire (Fluorescein-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch). Après deux lavages en PBS/0,1% BSA/1% de sérum normal de chèvre, elles sont reprises dans 500µl de Facs Flow (Becton Dickinson). La fluorescence de 10 000 cellules/tube est mesurée à l'aide du FACS-Calibur flow cytofluorometer (Becton Dickinson). L'iodure de propidium est utilisé pour détecter les cellules endommagées dont on ne tient pas compte pour l'analyse.*

D'après la Figure 33, les cinq anticorps et Fab étudiés sont capables de reconnaître les protéines prion murine et humaine dans leur conformation native exprimée à la surface des cellules. La spécificité de cette liaison a été vérifiée en mettant en compétition la fixation des anticorps ou Fab sur les cellules N2a surexprimant la PrPcmurine ou les cellules HEK surexprimant la PrPc humaine avec la protéine prion recombinante correspondante. Un exemple de cette compétition est reporté sur la Figure 33A et la Figure 33B (courbe orange). D'après la Figure 33C et la Figure 33D, à l'exception de la reconnaissance des cellules N2a par le couple SAF34, tous les couples d'anticorps étudiés reconnaissent de façon similaire la PrPc murine ou humaine exprimée à la surface des cellules qu'ils soient dans un format bivalent ou monovalent.

Ces expériences de cytométrie en flux permettent, d'une part, de vérifier la fonctionnalité des fragments Fab produits. D'autre part, elles sont une étape préliminaire

pour étudier l'effet thérapeutique des couples d'anticorps puisque la reconnaissance de la PrPc native semble être un prérequis.



L'anticorps Bar236 (rose) et le Fab Bar236 (bleu) sont incubés à 50nM. La spécificité de la liaison est vérifiée par compétition (Fab Bar236 + PrPrec, orange) du Fab Bar236 (50nM) et de la protéine prion recombinante (200µg/ml). Le contrôle (Control, vert) représente une incubation des cellules avec un anticorps contrôle de même isotype.

A- Résultat de cytométrie en flux obtenu pour les cellules N2a surexprimant la PrP murine. La spécificité de la liaison a été vérifiée en utilisant comme compétiteur la PrP murine recombinante (orange)..

B- Pourcentage de cellules N2a fluorescentes après incubation des différents couples d'anticorps. Tous les anticorps et Fab sont incubés à 50nM.

C- Pourcentage de cellules HEK fluorescentes après incubation des différents couples d'anticorps. Tous les anticorps et Fab sont incubés à 50nM.

Figure 33 : Reconnaissance des PrPc murine et humaine natives par les anticorps entiers et leur dérivé Fab.

### III.1.1.3 Etude de l'effet curatif des fragments Fab sur un modèle cellulaire de maladies à prions

Dans le but d'étudier l'intérêt de dérivés d'anticorps monovalents pour une application thérapeutique, nous avons comparé l'efficacité des anticorps entiers et de leur dérivé Fab concernant l'accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans des cellules N2a chroniquement infectées.

#### III.1.1.3.1 Le principe du dosage de la PrP<sup>sc</sup> dans des cellules chroniquement infectées

Le dosage de PrP<sup>sc</sup> utilisé dans cette étude a été mis au point dans notre laboratoire.

#### **→ La lignée cellulaire utilisée**

Le sous-clone, N2a58, décrit précédemment, a été infecté de façon chronique et stable par la souche de tremblante murinisée 22L (Nishida *et al.*, 2000). Ces cellules N2a22L sont parmi les cellules les plus utilisées à ce jour en tant que modèles des ESST car bien caractérisées. Toutefois, elles présentent un certain nombre d'inconvénients : cellules peu différenciées, infectables uniquement par des souches de prions expérimentalement adaptées aux rongeurs et facilement curables.

#### **→ Les étapes du dosage**

Protocole (Figure 34) :

*Les cellules infectées, N2a22L, sont cultivées jusqu'à confluence (3 jours) en présence de différentes concentrations en anticorps entiers ou Fab (de 0,01nM à 1000nM) dans un milieu complet DMEM dont le sérum de veau foetal a été déplété en PrP. On a utilisé comme témoins isotypiques des anticorps dirigés contre l'Il2 (IgG2a) ou la substance P (IgG1) produits au laboratoire. Les cellules non infectées, N2a58, sont cultivées en parallèle. Aucun effet toxique des anticorps sur les cellules n'a pu être observé. Après un lavage en PBS, les cellules sont ensuite grattées et récupérées. Les cellules sont lysées en tampon Triton-DOC (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0,5% Triton X-100, 0,5% sodium deoxycholate, pH 7,5). La concentration en protéine totale des*



extraits cellulaires est déterminée par un dosage colorimétrique BCA (bicinchoninic acid assay, Pierce).

Le dosage de la PrPsc, réalisé ensuite, découle d'une méthode de purification développée au CEA (JP Deslys, brevet CEA) et maintenant commercialisé par la société Bio-Rad (kit de purification TeSeE®, Bio-Rad). Brièvement, 40µg de protéines totales sont repris dans 200µl final de PBS et incubés avec 200µl de tampon A contenant 10µg de protéinase K/mg de protéines totales pendant 15min à 37°C. Puis, 200µl de tampon B sont ajoutés pour précipiter la PrPsc. Après centrifugation (10min, 20 000g, 4°C), le culot est repris dans 25µl d'urée 4M pendant 10min à 100°C. Après incubation, la PrPres dénaturée est reprise dans 400µl de tampon EIA.

La PrPres dénaturée est alors mesurée au moyen du dosage immunométrique suivant : l'anticorps monoclonal anti-PrP purifié, 11C6, (10µg/ml, tampon phosphate 50nM pH 7,4) est immobilisé une nuit sur des plaques de microtitrage 96-puits (Immunoplate, Maxisorp, Nunc). Les plaques sont saturées en tampon EIA puis stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation. 100µl des différents échantillons sont incubés 2h à température ambiante. Après 3 lavages, 100µl/puits d'un anticorps monoclonal anti-PrP purifié, SAF83, couplé à l'AChE (4unités/ml) sont incubés une nuit à 4°C. Après 6 lavages, l'activité de l'AChE est mesurée par la méthode colorimétrique d'Ellman, comme décrit précédemment (Grassi et al., 1989).

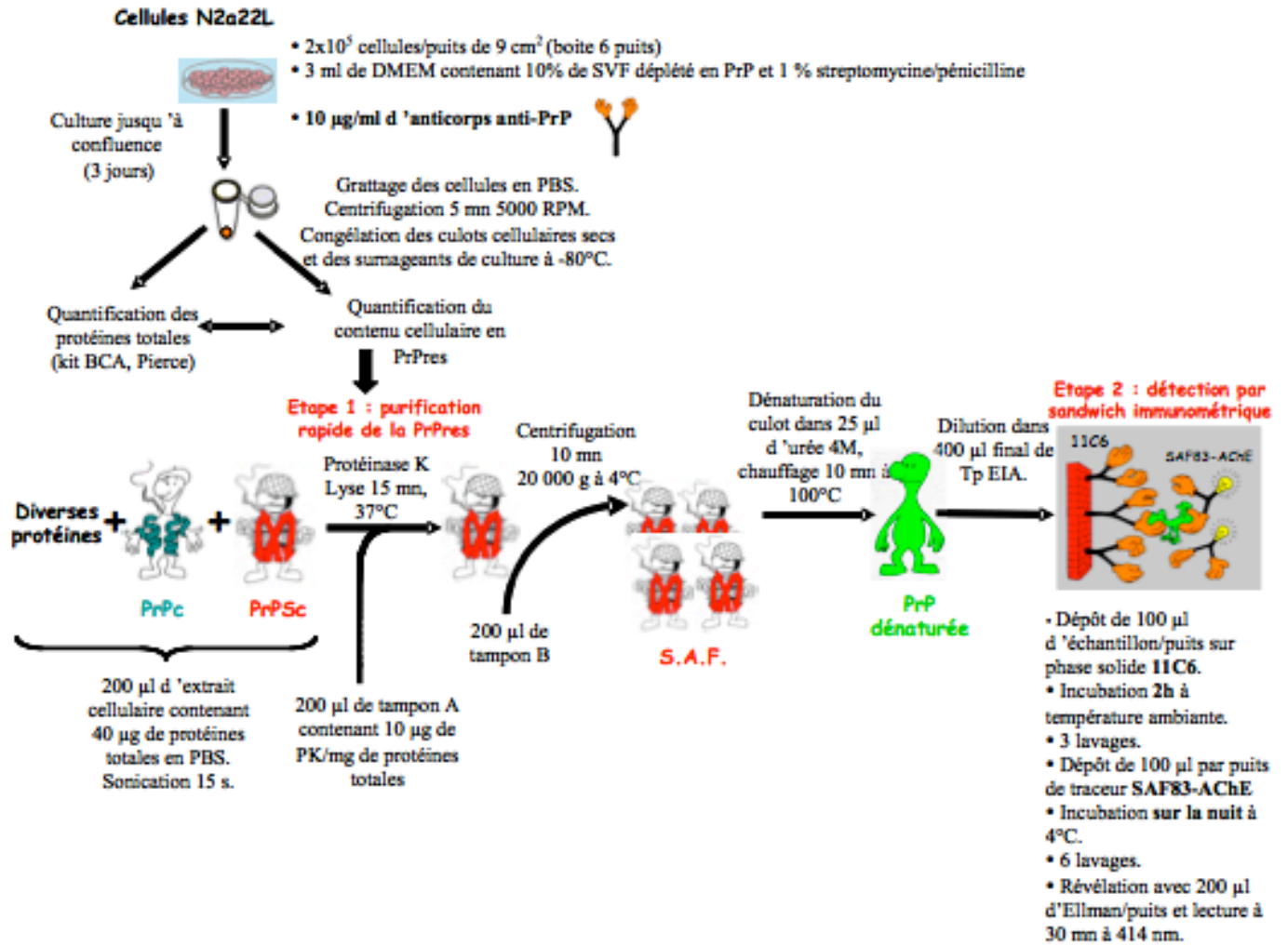
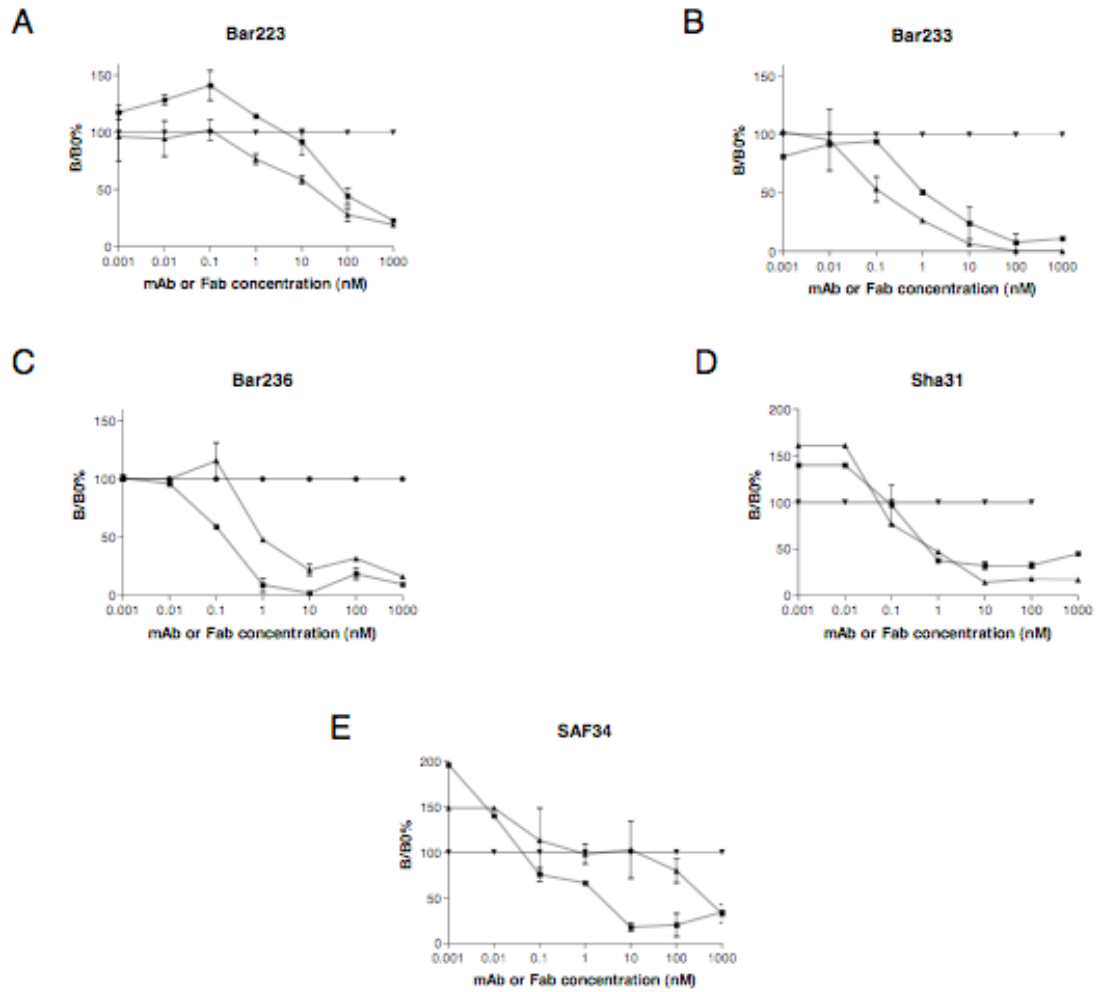


Figure 34 : Dosage de la PrPsc dans des cellules N2a

## III.1.1.3.2 Les résultats obtenus

Les cellules infectées traitées avec des anticorps témoins ne présentent pas de réduction de leur niveau en PrPsc quelle que soit la concentration utilisée. On observe que les cinq anticorps entiers étudiés ainsi que leur dérivé Fab sont efficaces pour réduire de façon dose dépendante le contenu en PrPsc des cellules infectées (Figure 35). Nous avons déterminé les  $IC_{50}$  pour chaque condition qui correspondent à la concentration en anticorps ou Fab qui réduisent de moitié de contenu en PrPsc. Ces valeurs sont reportées dans le Tableau 11. Les  $IC_{50}$  obtenues pour les anticorps entiers sont compris entre de 0,7nM et 80nM et sont en accord avec les résultats obtenus par Féraudet *et al.* (Féraudet *et al.*, 2005). Concernant les Fab, les  $IC_{50}$  sont compris entre 0,1nM et 400nM selon le Fab étudié. Comme le montrent la Figure 35A et la Figure 35F, deux Fab (Fab Bar223 et Fab Bar233) présentent une meilleure capacité d'inhibition de la réplication de la PrPsc que leur anticorps entier correspondant, ce qui est montrée par une  $IC_{50}$  10 fois plus faible. Par ailleurs, le couple Sha31 montre une même capacité d'inhibition (Figure 35D). Cependant, deux Fab, Fab Bar236 et surtout Fab SAF34, sont moins efficaces que leur anticorps entier correspondant pour inhiber la réplication de la PrPsc. Alors que le rapport  $IC_{50}Fab/IC_{50}mAb$  est de 10 pour le couple Bar236, il est de 200 pour le couple SAF34. Ainsi, ces résultats montrent que 4 des 5 Fab étudiés présentent toujours des effets thérapeutiques *ex vivo* intéressants par comparaison avec les anticorps entiers.

Nous avons également étudié une éventuelle synergie d'action des couples présentant, d'une part, les effets curatifs *ex vivo* les plus intéressants et, d'autre part, des épitopes éloignés sur la PrPc : soient Sha31-Bar236 et Bar233-Bar236. Cependant, que soit après incubation avec les couples d'anticorps entiers ou de Fab, nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet additif de ces molécules sur l'inhibition de la réplication de la PrPsc.



Les cellules N2a22L infectées sont incubées avec différentes concentrations (de 0,01nM à 1000nM) d'anticorps (carrés) ou de Fab (triangles) pendant 3 jours. A confluence, les cellules sont lysées et la PrPsc dosée comme décrit précédemment. Les résultats sont donnés en pourcentage de PrPsc où 100% représente le contenu en PrPsc de cellules infectées non traitées et 0% le contenu en PrPsc de cellules non infectées. Les résultats donnés sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

Figure 35 : Effet dose des couples d'anticorps anti-PrP sur l'accumulation de la PrPsc dans les cellules N2a22L

	Bar223		Bar233		Bar236		SAF34		Sha31	
	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab
<b>Dosage PrPsc IC<sub>50</sub> (nM)</b>	80	19	1	0,1	0,1	1	2	440	0,7	1

Tableau 11 : Effet curatif *ex vivo* des anticorps entiers et des Fab

### III.1.1.4 Discussion

Dans cette étude, nous avons comparé l'effet curatif *ex vivo* de cinq anticorps monoclonaux et de leur dérivé Fab, tous produits dans notre laboratoire sur un modèle de cellules murines infectées. L'objectif de ces travaux est d'évaluer le potentiel thérapeutique des fragments monovalents Fab versus anticorps entier en vue leur utilisation en immunothérapie passive sous forme d'anticorps recombinants.

Nos résultats indiquent qu'un effet curatif intéressant peut-être obtenu par utilisation aussi bien d'anticorps que de Fab anti-PrPc, confirmant qu'il est efficace de cibler la PrPc pour inhiber la réplication de la PrPsc (Peretz *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2004 ; Perrier *et al.*, 2004). Le mécanisme d'inhibition semble être épitope-indépendant puisque les anticorps et Fab utilisés dans cette étude sont tous capables d'inhiber la réplication de la PrPsc et reconnaissent des épitopes différents et distants de la PrPc (Figure 29). Ces résultats suggèrent un mécanisme d'action commun de ces molécules nécessitant, entre autre, la reconnaissance de la PrPc native exprimée à la surface des cellules pour exercer un effet thérapeutique (Polymenidou *et al.*, 2004 ; Nikles *et al.*, 2005). Toutefois, nos résultats montrent que, s'il s'agit d'une condition nécessaire comme le montre le Fab SAF34, cela ne semble pas être une condition suffisante. Ainsi, pour le couple Bar223, l'anticorps entier présente une meilleure reconnaissance de la PrPc murine native que son dérivé Fab (Figure 33). Cependant, le Fab Bar223 inhibe plus efficacement la réplication de la PrPsc que l'anticorps entier Bar223 (Figure 35). Une telle observation a déjà été faite dans notre laboratoire avec l'étude de l'anticorps monoclonal anti-PrPc, Bar224, capable de reconnaître la PrPc native exprimée à la surface des cellules mais n'exerçant aucun effet sur la réplication de la PrPsc, utilisant le même modèle cellulaire. De plus amples études sont nécessaires pour comprendre plus en détail leurs mécanismes d'action.

Ces travaux mettent en avant l'intérêt de l'utilisation de dérivés monovalents d'anticorps en immunothérapie passive contre les maladies à prions. En effet, tous les Fab étudiés sont capables d'inhiber la réplication de la PrPsc dans les conditions expérimentales utilisées. En comparaison avec les travaux menés par Peretz *et al.*, 3 des 5 Fab analysés dans notre étude (Fab Bar233, Fab Bar236 et Fab Sha31) présentent des effets curatifs meilleurs que leur Fab de référence, D18, montré par des  $IC_{50}$  10 à 100 fois

inférieur (Peretz *et al.*, 2001). Plus précisément, ces travaux mettent en avant l'intérêt de l'anticorps Bar233 et plus particulièrement de son utilisation dans un format monovalent tel qu'un Fab ou un ScFv recombinants comme candidat à une étude *in vivo*. En effet, le Fab Bar233 présente un effet curatif sur notre modèle cellulaire similaire à l'anticorps entier Bar236 (IC<sub>50</sub> de 0,1nM). Or, de façon intéressante, une étude menée récemment par Solforosi *et al.* a montré que le pontage de la PrPc *in vivo* par des anticorps monoclonaux injectés par voie intra-cérébrale augmentait l'apoptose des neurones contrairement à l'utilisation de Fab (Solforosi *et al.*, 2004). Ainsi, l'utilisation de fragments monovalents en immunothérapie passive contre les maladies à prions présente de nombreux avantages : une plus faible immunogénicité et une meilleure biodistribution qui devrait leur permettre une meilleure pénétration des agrégats de type  $\beta$ -amyloïde.

Cette étude est donc une étape préliminaire intéressante pour la sélection des anticorps présentant un potentiel intérêt thérapeutique avant d'entreprendre les lourds processus de clonage. De plus, elle permet d'étudier leur potentialité thérapeutique quand ils sont utilisés sous un format monovalent et donc donne une indication concernant leur format d'utilisation sous forme d'anticorps recombinants.

Toutefois, il est à noter que cette étude *ex vivo* ne permet pas d'analyser l'importance de la partie Fc dans le mécanisme d'action de ces anticorps ainsi que l'effet d'une clearance différentielle des différents formats d'anticorps sur l'activité thérapeutique *in vivo*. Il s'agit donc d'une étude préliminaire nécessitant par la suite une optimisation de leur utilisation *in vivo* (Siberil *et al.*, 2006 ; Presta *et al.*, 2006).

### III.1.2 Obtention d'anticorps anti-PrPc humaine à visée thérapeutique par immunisation génique chez des souris de type sauvage

Comme nous l'avons exposé dans la première partie de l'introduction bibliographique, les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives dont l'évolution est toujours mortelle. Actuellement, aucun traitement thérapeutique ou prophylactique efficace n'a pu être développé contre ces maladies. Cependant, au cours de ces dix dernières années, de nombreux travaux ont montré que des anticorps dirigés contre la PrPc pouvaient être efficaces pour prévenir voire soigner les maladies à prions (Enari *et al.*, 2001; Peretz *et al.*, 2001 ; White *et al.*, 2003 ; Rosset *et al.*, 2004 ; Sirgurdsson *et al.*, 2003). Comme nous l'avons montré dans la première partie de ce travail, des anticorps dirigés contre la PrPc murine native exprimée à la surface des cellules sont capables d'inhiber la réplication de la PrPsc dans un modèle murin de cellules infectées. Or, il est important de noter que les anticorps actuellement étudiés en immunothérapie passive ont tous été obtenus après immunisation de souris invalidées pour le gène *Prnp* (voir pour revue : Bade and Frey, 2007). Cette approche lourde qui nécessite l'établissement d'une lignée de souris invalidées pour le gène *Prnp* est imposée par la tolérance immunitaire à la PrPc endogène qui rend difficile la production d'anticorps d'intérêt chez des souris de type sauvage. De plus, il a été observé une différence de spécificité fine entre les anticorps anti-PrPc obtenus chez des souris de type sauvage et ceux obtenus chez des souris invalidées pour le gène *Prnp* (Heppner and Aguzzi, 2004 ; Polymenidou *et al.*, 2004). En effet, en utilisant le même protocole d'immunisation, ces auteurs ont montré que les souris de type sauvage produisent exclusivement des anticorps dirigés contre des épitopes linéaires la PrPc recombinante immobilisée sur une plaque de microtitrage alors que des souris invalidées pour le gène *Prnp* produisent essentiellement des anticorps dirigés contre la conformation native de la PrPc exprimée à la surface des cellules. Cette différence de spécificité peut s'expliquer par la tolérance à la PrPc chez les souris de type sauvage. Cependant, l'hypothèse que nous posons est que, dans certaines conditions expérimentales, la rupture de la tolérance chez des souris de type sauvage permette également l'obtention d'anticorps dirigés contre une conformation native de la PrPc et possédant, en plus, une spécificité fine

différente de celle des anticorps obtenus classiquement chez des souris invalidées pour le gène *Prnp*. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'essayer de produire de nouveaux anticorps à visée thérapeutique dirigés contre la conformation native de la PrPc humaine chez des souris de type sauvage. Nous avons choisi donc l'immunisation génique, une technique connue pour favoriser la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de la protéine d'intérêt par l'injection de son ADN complémentaire.

Cette étude s'articule en trois volets. Dans un premier temps, nous avons cloné la protéine prion humaine puis construit les vecteurs d'expression eucaryotes nécessaires à l'immunisation génique. Dans un second temps, nous avons comparé différents protocoles d'immunisation génique : ADN nu, électrotransfert *in vivo* et différentes formulations d'ADN (lipides cationiques et block copolymers) en terme de niveau d'expression protéique *in vivo*. Puis, nous avons étudié la réponse humorale spécifique induite par ces différents protocoles d'immunisation génique et nous l'avons comparé à celle induite par différents protocoles d'immunisation protéique.

L'intérêt de cette étude est donc double. D'une part, il pourrait permettre de développer à terme de nouveaux outils en immunothérapie passive des maladies à prions chez l'homme. D'autre part, il devrait permettre de développer une méthode générale de production d'anticorps dirigés contre une conformation native de protéines humaines faiblement immunogènes chez des souris de type sauvage. Ce travail fait l'objet d'une publication sous forme d'un article en cours de rédaction.

### III.1.2.1 Description des constructions plasmidiques utilisées

Pour les immunisations géniques, nous avons utilisé le plasmide pcDNA3.1(+) (Invitrogen) comme vecteur d'expression eucaryote. En effet, celui-ci contient tous les éléments essentiels pour l'immunisation génique (Figure 36) :

- Un **site de sous-clonage multiple** dans lequel est inséré l'ADNc d'intérêt.
- Un **promoteur CMV** (« human cytomegalovirus immediate-early enhancer »), promoteur viral situé en amont du site d'insertion de l'ADNc d'intérêt et permettant sa forte expression transitoire dans un grand nombre de cellules eucaryotes.



-Un **gène codant la  $\beta$ -lactamase** conférant aux bactéries transformées une résistance à l'ampicilline. Celui-ci permet la sélection des clones transformés durant l'étape d'amplification bactérienne. D'autre part, sa séquence riche en CpG joue un rôle dans la stimulation de la réponse immunitaire.

-Un **signal de polyadénylation** (BGH pA) de l'hormone de croissance bovine assurant la terminaison transcriptionnelle appropriée de l'ARNm d'intérêt.

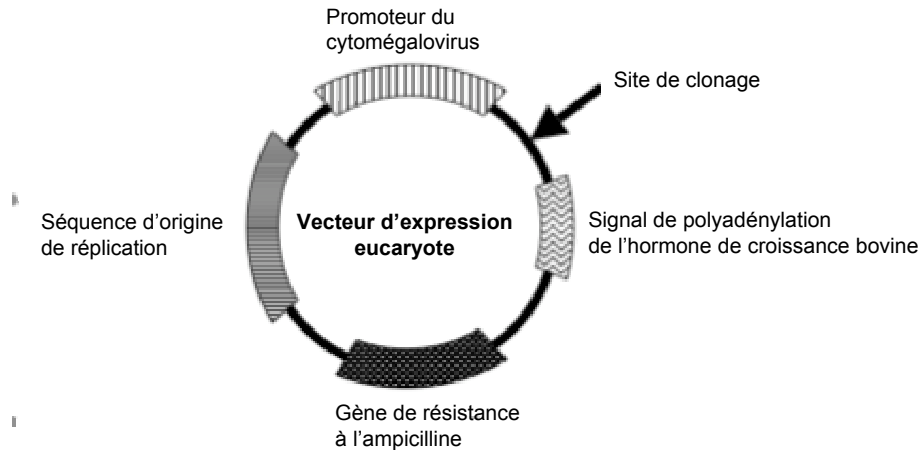


Figure 36 : Schéma d'un vecteur d'expression eucaryote illustrant ses principales caractéristiques.

### III.1.2.1.1 Caractéristiques de la séquence de la protéine prion utilisée et constructions plasmidiques

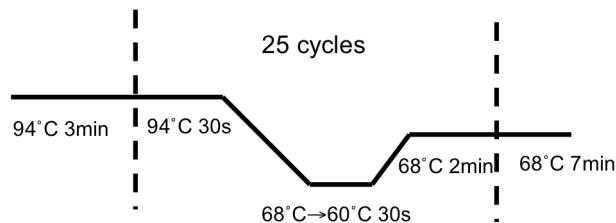
La protéine prion humaine entière (PrP1-253) a été clonée par PCR (« Polymerase Chain Reaction ») au laboratoire, à partir d'ADN génomique provenant de PMBC (« Peripheral Blood Mononuclear Cells ») (Padiolleau-Lefèvre *et al.*, 2007). Après vérification de la séquence amplifiée, la PrP1-253 a été sous-clonée dans le vecteur pcDNA3.1 (p3-PrP1-253).

Pour favoriser, d'une part, la rencontre entre l'antigène et les lymphocytes B circulants et, d'autre part, la présentation, après endocytose, des peptides antigéniques par le CMHII présent à la surface des CPAs et ainsi stimuler une réponse immunitaire spécifique humorale, notre stratégie est d'utiliser comme immunogène la protéine prion

humaine (PrP1-229) dépourvue de son ancre GPI (Figure 37) ainsi la PrPc sera libérée dans le milieu extracellulaire. Nous avons inséré la séquence codant pour la PrP1-229 dans le vecteur pcDNA3.1 selon le protocole suivant :

Protocole (Figure 37) :

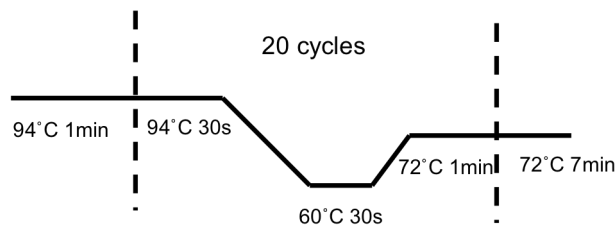
**-Clonage de la PrP1-229 à partir du vecteur p3-PrP1-253.** Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification PCR présente les séquences suivantes 1) Primer for : 5'-GTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTGCTCGGATCCCG-3' et 2) Primer PrP229 : 5'-GCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGTCATCATCCTCTCTGGTAATAGGCCTGAGATTCC-3'. Les conditions suivantes ont été utilisées pour un volume réactionnel de 50 $\mu$ l : 1 $\mu$ l de p3-PrP1-253 à 1,5ng/ $\mu$ l, 5 $\mu$ l de tampon 10X Accutaq, 2,5 $\mu$ l dNTP à 10mM, 0,5 $\mu$ l de chaque amorce à 100pmol/ $\mu$ l et 0,5 $\mu$ l d'Accutaq 5u/ $\mu$ l (Sigma). Deux concentrations en MgCl<sub>2</sub> ont été testées : 2,5mM et 4,5mM. Les paramètres du cycle de PCR sont :



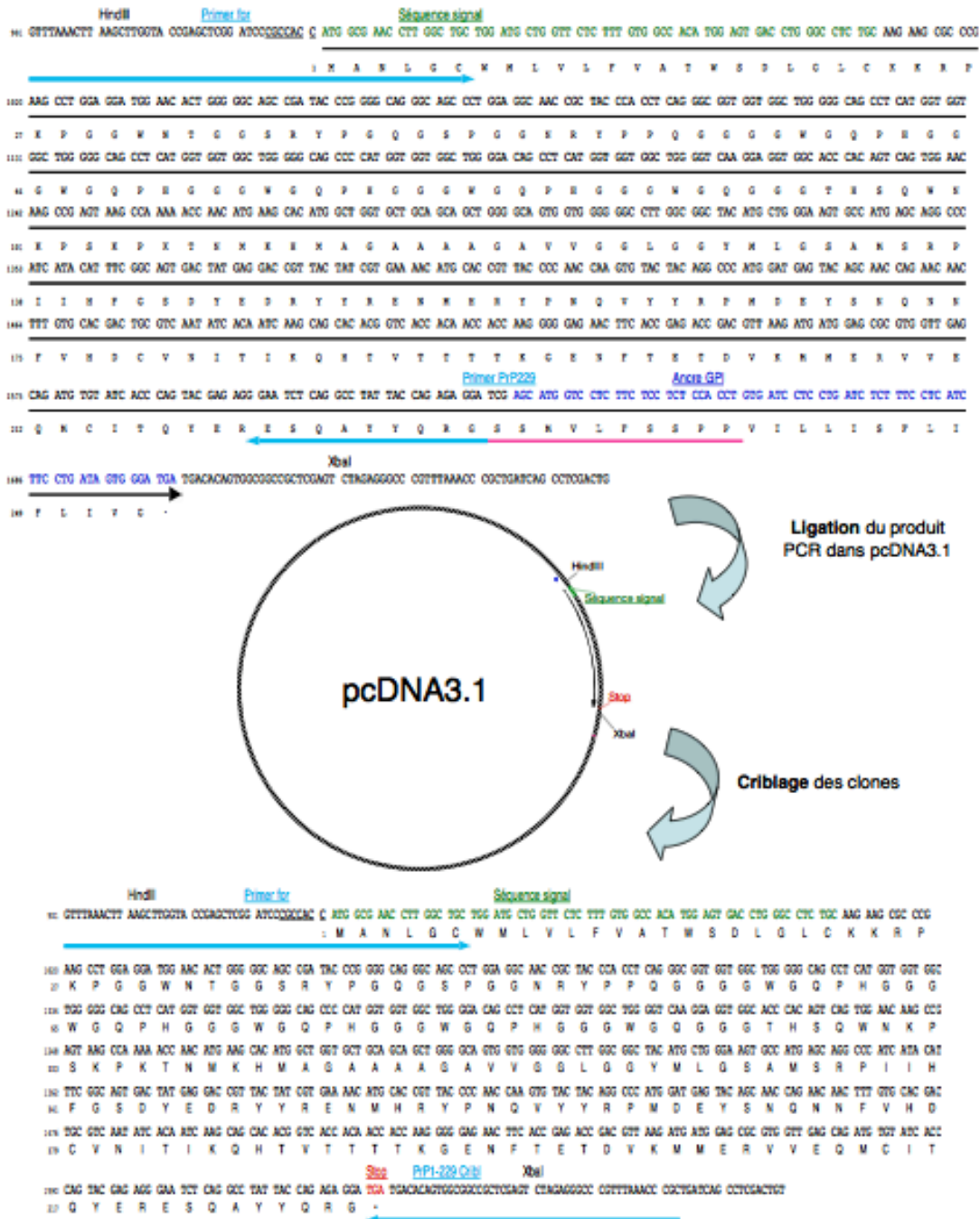
Les produits de chaque condition d'amplification PCR sont visualisés sur gel d'agarose 1%. Le produit d'une des conditions (MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, température d'hybridation 68°C) est purifié sur système Ultra-Free DA (Millipore) puis par extraction phénol/chloroforme et précipité au NaCl 0,4M une nuit à -20°C.

**-Insertion du produit d'amplification PCR dans le vecteur pcDNA3.1.** Le produit PCR purifié ainsi que le vecteur pcDNA3.1 sont digérés par HindIII et XbaI (Biolabs, New England) 5h à 37°C. Le vecteur pcDNA3.1 linéarisé est ensuite déphosphorylé à ses extrémités 5' (CIP, ...). Le produit PCR digéré y est inséré en présence de 1 $\mu$ l de T4 ligase 400unités/ $\mu$ l (Biolabs) 1h à 20°C. Le produit de ligation est précipité au NaCl 0,4M une nuit à -20°C puis repris dans 10 $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O. Des bactéries DH5 $\alpha$  électrocompétentes sont transformées par 2 $\mu$ l du produit de ligation et sont étalées sur milieu sélectif contenant de l'ampicilline (pour laquelle le plasmide pcDNA3.1 possède le gène de résistance).

**-Criblage des plasmides contenant la PrP1-229.** Les clones sont cultivés 6h en milieu liquide LB (Luria Broth, Sigma) sélectif et directement criblés par PCR. Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification PCR présente les séquences suivantes 1) Primer for : 5'-GTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTGCTCGGATCCCG-3' et 2) Primer PrP229 cribl : 5'GCGGGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGTCATCA-3'. Les conditions suivantes ont été utilisées pour un volume réactionnel de 50 $\mu$ l : 5 $\mu$ l de culture bactérienne, 5 $\mu$ l de tampon 10X Redtaq, 2,5 $\mu$ l dNTP à 10mM, 4 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 $\mu$ l de chaque amorce à 100pmol/ $\mu$ l et 2,5 $\mu$ l de RedTaq 1u/ $\mu$ l (Sigma). Les paramètres du cycle de PCR sont :



Les produits PCR sont ensuite visualisés sur un gel d'agarose 2%. L'ADN plasmidique des clones positifs est purifié avec le kit MiniPrep (BioRad) puis séquencé.

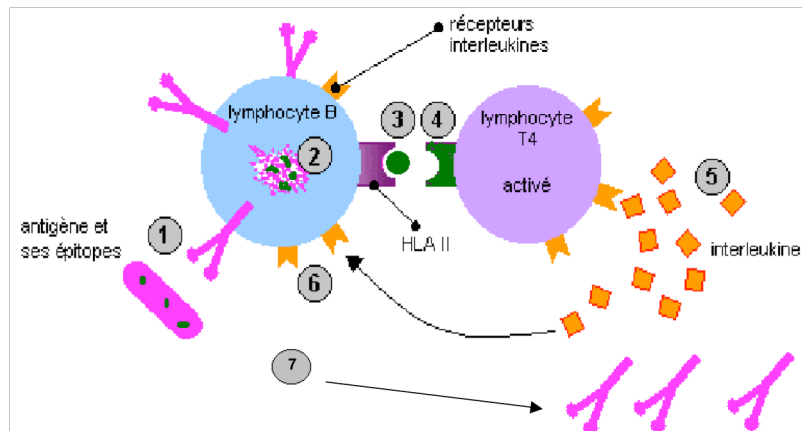


La séquence du haut représente la séquence entière de la protéine prion humaine (PrP1-253). La séquence du bas représente la séquence de la protéine prion humaine sans son ancre GPI (PrP1-229). La séquence signal permettant la sécrétion de la protéine est représentée en vert. L'ancre GPI permettant l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique est représentée en bleu foncé. La séquence hybridante des primers est représentée par une flèche bleu clair et la non hybridante en rose.

Figure 37 : Construction du vecteur p3-PrP1-229.

Par visualisation des produits PCR sur gel d'agarose, nous avons obtenu de nombreux clones positifs. Les ADN plasmidiques de deux d'entre eux ont été purifiés et envoyés au séquençage (p3-PrP1-229 clone D3 et p3-PrP1-229 clone D5). Aucune mutation nucléotidique, même silencieuse, n'a été mise en évidence (annexe 2). Ces deux constructions vont donc être testées pour leur fonctionnalité *ex vivo*.

Une des difficultés de ce modèle d'étude est que la protéine d'intérêt est faiblement immunogène car présentant 90% d'homologie de séquence avec une protéine ubiquiste. Pour pallier ce problème, notre équipe a développé, ces dernières années, une stratégie qui consiste à fusionner la séquence d'une protéine faiblement immunogène à celle d'un épitope T « universel » (Tymciu *et al*, 2004). La séquence codant cet épitope T fusionnée avec celle de l'ADNc d'intérêt joue un rôle équivalent à une protéine porteuse (comme la BSA ou la KLH) lors d'une immunisation protéique (Figure 38). Une étude menée par Kumar *et al*. a montré que le fragment 829-844 de la toxine tétanique (de séquence IQYIKANSKFIGITEL) est capable de stimuler la réponse immunitaire, lors d'une immunisation peptidique, chez plusieurs souches de souris (Kumar *et al.*, 1992). En effet, ce fragment est présenté par le CMHII d'une grande variété d'haplotypes de souris (H-2<sup>s</sup>, H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>b</sup>) : il s'agit donc d'un épitope T dit « universel » car capable de stimuler la réponse immunitaire indépendamment de la restriction génique des CPA. De plus, ce fragment n'engendre pas d'effet secondaire et de réponse immunitaire spécifique lorsqu'il est couplé à la protéine d'intérêt.



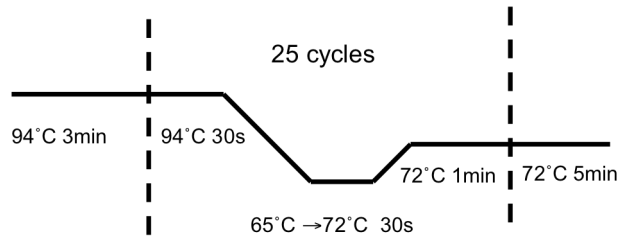
1 :Antigène (Ag) composé d'épitopes B (rose) et d'épitope T (vert). Reconnaissance de l'Ag par les Ig présents à la surface du LB. 2 :internalisation et fragmentation de l'Ag reconnu. 3-4 : présentation des épitopes T au LT CD4<sup>+</sup> via le CMHII (ou HLAII). 5 : Activation du LT CD4<sup>+</sup> entraînant la sécrétion d'interleukines. 6 :Activation paracrine des LB par les interleukines. 7 : Différenciation des LB en plasmocytes et sécrétion d'anticorps circulants spécifiques de l'Ag.

Figure 38 : Coopération lymphocytes T et lymphocytes B.

Nous avons donc inséré la séquence codant la toxine tétanique 829-844 dans le vecteur p3-PrP1-229 par double amplification PCR selon le protocole suivant :

Protocole (Figure 39) :

**-Première amplification PCR.** Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification PCR présente les séquences suivantes 1) Primer for : 5'-GTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTGCTCGGATCCCG-3' et 2) Primer TT2 : 5'-GGTGATACCGATGAATTTGGAGTTAGCCTTGATGTACTGGATTCTCTCTGGTAATAGGCC-3'. Les conditions suivantes ont été utilisées pour un volume réactionnel de 50µl : 1µl de p3-PrP1-253 à 1,5ng/µl, 5µl de tampon 10X DyNAzyme EXT, 1µl dNTP à 10mM, 0,5µl de chaque amorce à 100pmol/µl et 2,5µl de DyNAzyme EXT 1u/µl (Sigma). Deux concentrations en MgCl<sub>2</sub> ont été testées : 2,5mM et 4,5mM. Les paramètres du cycle de PCR sont :



Les produits de chaque condition d'amplification PCR sont visualisés sur gel d'agarose 1%. Le produit d'une des conditions ( $MgCl_2$  2,5mM, température d'hybridation 72°C) est utilisé comme matrice pour la deuxième PCR.

**-Deuxième amplification PCR.** Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification PCR présente les séquences suivantes 1) Primer for : 5'-GTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTGCTCGGATCCCG-3' et 2) Primer TTI : 5'-CGGGCCCTCTAGACTCGAGCGTCACAGTTCGGTGATACCGATGAATTTGG-3'. Les conditions de PCR utilisées sont les mêmes que pour la première PCR. Les produits de chaque condition d'amplification PCR sont visualisés sur gel d'agarose 1%. Le produit d'une des conditions ( $MgCl_2$  2,5mM, température d'hybridation 68°C) est purifié sur système Ultra-Free DA (Millipore) puis par extraction phénol/chloroforme et précipité au NaCl 0,4M une nuit à -20°C.

**-Insertion du produit d'amplification PCR dans le vecteur pcDNA3.1.** Le produit PCR purifié ainsi que le vecteur pcDNA3.1 sont digérés par HindIII et XbaI (Biolabs, New England) 5h à 37°C. Le vecteur pcDNA3.1 linéarisé est ensuite déphosphorylé à ses extrémités 5' (CIP, ...). Le produit PCR digéré y est inséré en présence de 1µl de T4 ligase 400unités/µl (Biolabs) 1h à 20°C. Le produit de ligation est précipité au NaCl 0,4M une nuit à -20°C puis repris dans 10µl d'H<sub>2</sub>O. Des bactéries DH<sub>5</sub>α électrocompétentes sont transformées par 2µl du produit de ligation et sont étalées sur milieu sélectif contenant de l'ampicilline (pour laquelle le plasmide pcDNA3.1 possède le gène de résistance).

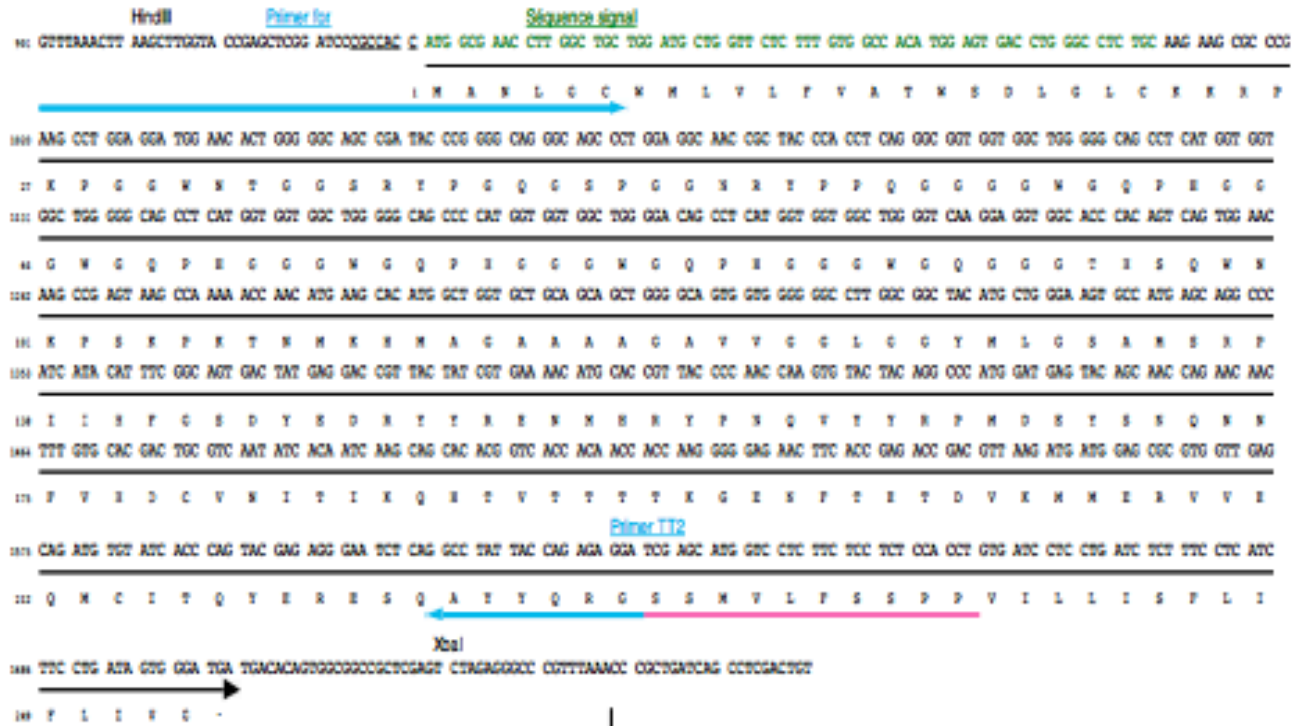
**-Criblage des plasmides contenant la PrPI-229-TT.** Les clones sont cultivés 6h en milieu liquide LB (Luria Broth, Sigma) sélectif et directement criblés par PCR. Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification PCR présente les séquences suivantes 1) Primer for : 5'-GTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTGCTCGGATCCCG-3' et 2) Primer TTI : 5'-CGGGCCCTCTAGACTCGAGCGTCACAGTTCGGTGATACCGATGAATTTGG-3'. Les conditions suivantes ont été

*utilisées pour un volume réactionnel de 50µl : 5µl de culture bactérienne, 5µl de tampon 10X Redtaq, 2,5µl dNTP à 10mM, 4µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µl de chaque amorce à 100pmol/µl et 2,5µl de RedTaq 1u/µl (Sigma). Les paramètres du cycle de PCR sont les mêmes que ceux utilisés pour le criblage de la construction p3-PrP1-229. Les produits PCR sont ensuite visualisés sur un gel d'agarose 2%. L'ADN plasmidique des clones positifs est purifié avec le kit MiniPrep (BioRad) puis séquencé.*

Par visualisation des produits PCR sur gel d'agarose, nous avons obtenu de nombreux clones positifs. L'ADN plasmidique de deux d'entre eux a été purifié et envoyé au séquençage (p3-PrP1-229-TT clone C4 et p3-PrP1-229-TT clone D5). La construction p3-PrP1-229-TT clone C4 présente une délétion d'un acide aminé alors que la construction p3-PrP1-229-TT clone D5 ne présente aucune mutation protéique (annexe 2). Toutefois, deux mutations nucléotidiques silencieuses ont été observées pour la construction p3-PrP1-229-TT clone D5. Ces deux constructions vont être testées pour leur fonctionnalité *ex vivo*.



**Première PCR**



**Deuxième PCR**

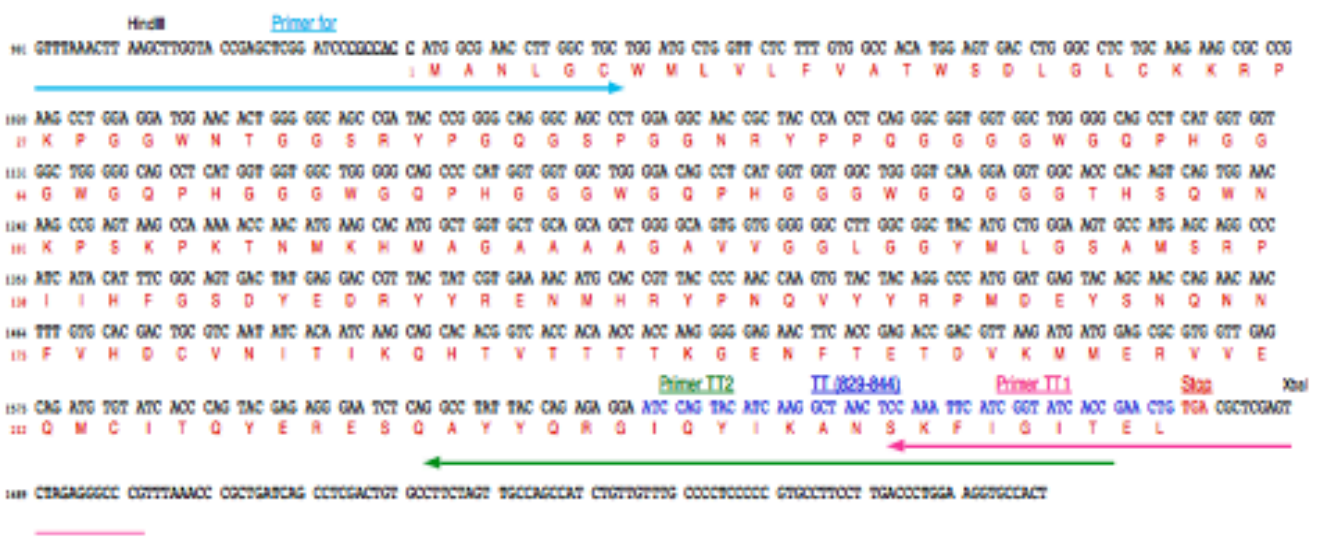


Figure 39 : Construction du vecteur p3-PrP1-229-TT

### III.1.2.1.2 Fonctionnalité des constructions plasmidiques *ex vivo*

Afin de sélectionner les constructions à utiliser pour l'immunisation génique, nous avons vérifié la fonctionnalité *ex vivo* des deux constructions p3-PrP1-229 (clone D3 et clone D5) ainsi que celles p3-PrP1-229-TT (clone C4 et clone D5). Pour cela, nous avons testé l'expression de la protéine prion humaine dans le surnageant de culture et le culot cellulaire par un dosage immunométrique et par immuno-transfert trois jours après transfection transitoire de cellules COS par les différentes constructions.

#### III.1.2.1.2.1 Dosage immunométrique

Pour doser spécifiquement la protéine prion humaine, nous avons utilisé comme anticorps de révélation l'anticorps monoclonal Pri308 couplé à l'AChE. Cet anticorps a été obtenu par immunisation du peptide synthétique 106-126 de la protéine prion humaine chez des souris invalidées pour le gène *Prnp*.

#### Protocole (Figure 40) :

Trois jours après la transfection de cellules COS par les différentes constructions, les surnageants de culture sont prélevés. Après un lavage en PBS, les cellules sont ensuite récupérées et comptées. Elles sont ensuite lysées en tampon Triton-DOC (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0,5% Triton X-100, 0,5% sodium deoxycholate, pH 7,5). La concentration en protéine totale du surnageant de culture et des extraits cellulaires est déterminée par un dosage colorimétrique BCA (bicinchoninic acid assay, Pierce). La protéine prion humaine est ensuite dosée par le dosage immunométrique suivant : l'anticorps monoclonal SAF34, produit au laboratoire, à 10µg/ml en tampon phosphate 50mM, est immobilisé sur la phase solide 96-puits (Immunoplate, Maxisorp, Nunc) par incubation une nuit à température ambiante, puis les sites non spécifiques sont saturés en BSA (tampon EIA : 0,1M tampon phosphate pH 7,4 contenant 0.1% de BSA, 0,15M NaCl et 0,01% d'azide de sodium). Les plaques sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. 100µl des différents surnageants de culture et culots cellulaires (à 100ng/µl et 50ng/µl) en tampon EIA sont incubés une nuit à 4°C. Après 3 lavages, 100µl/puits de

Pri308 couplé à l'acétylcholinestérase (AChE) à 5 unit/ $\mu$ l en tampon EIA sont incubés pendant 2 heures à température ambiante. Après 6 lavages, l'activité de l'AChE est mesurée par la méthode colorimétrique d'Ellman, comme décrit précédemment (Grassi et al., 1989). La mesure de l'absorbance à 414nm à 15min permet d'évaluer directement la quantité de PrP humaine présente dans les différents échantillons testés. Les résultats sont donnés en DO/ $10^6$  cellules.

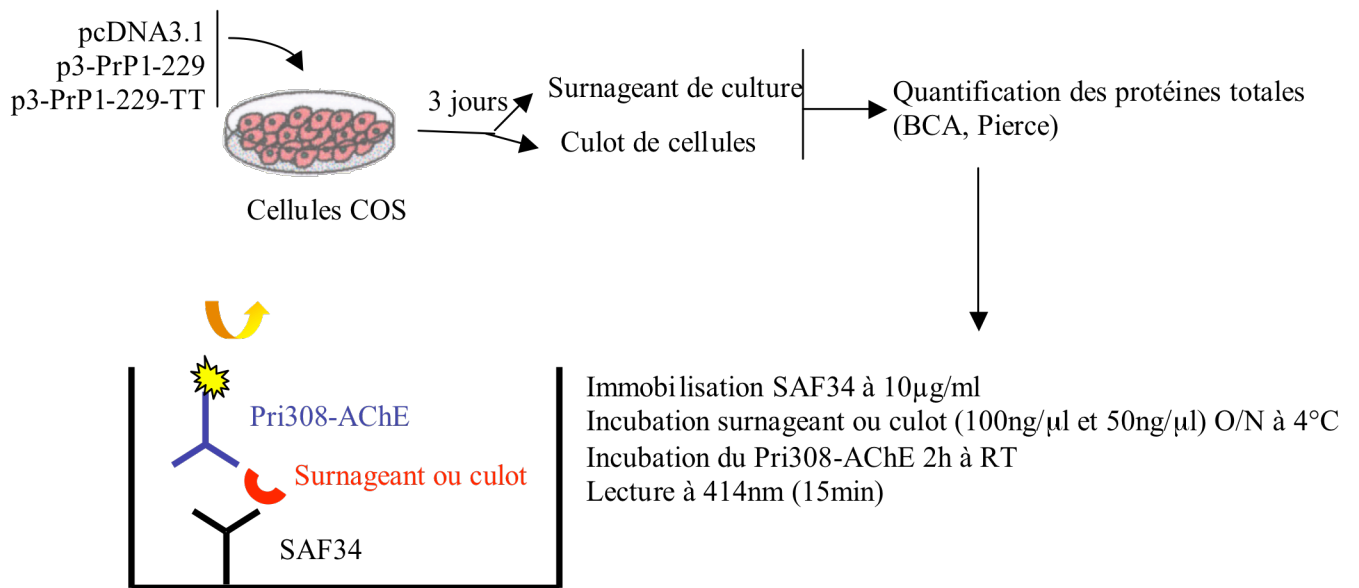
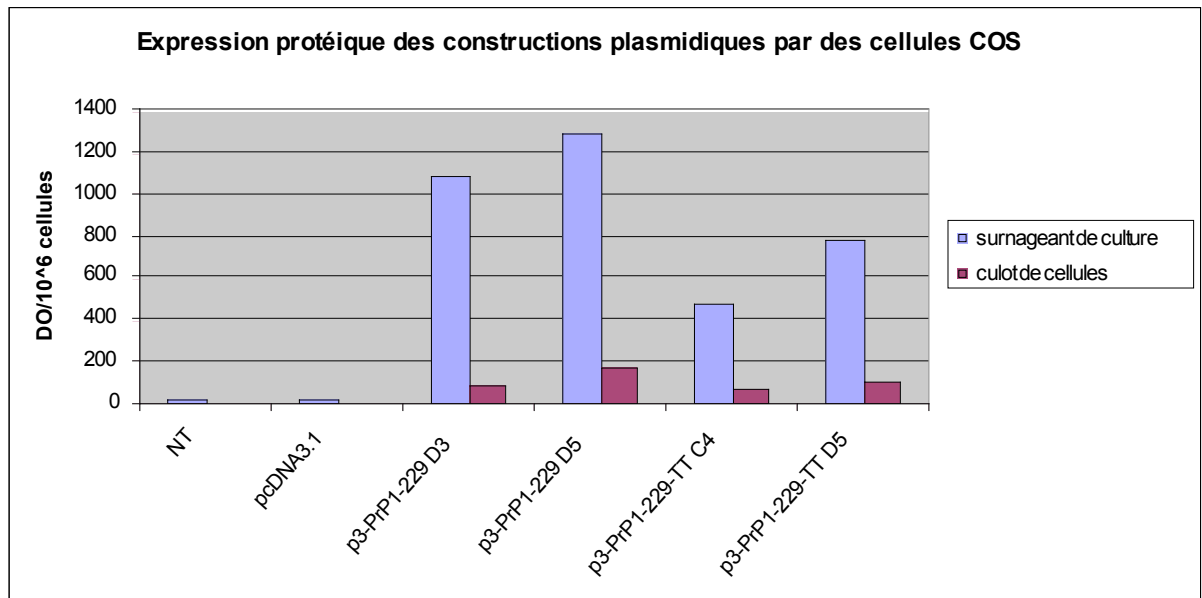


Figure 40 : Dosage immunométrique de la protéine prion humaine

Comme le montre la Figure 41, aucun signal n'est détecté dans les différentes fractions de cellules COS non transfectées (NT) ou transfectées avec le vecteur vide (pcDNA3.1). On observe un signal dans les deux fractions (surnageant de culture et culot cellulaire) des cellules transfectées par les 4 vecteurs étudiés. Quelle que soit la construction, un signal de forte amplitude est observé dans le surnageant de culture, laissant supposer que les protéines d'intérêt sont bien sécrétées par les cellules COS. Nous pouvons mettre en évidence que les constructions p3-PrP1-229 clone D5 et p3-PrP1-229-TT clone D5 permettent une meilleure expression de la protéine prion humaine. Cependant, l'ajout de l'épitope T semble diminuer la synthèse de la protéine d'intérêt de l'ordre de 50%.



Le signal obtenu pour chaque fraction (surnageant de culture et culot cellulaire) est rapporté à la quantité en protéines totales et au nombre de cellules.

Figure 41 : Détection de l'expression de la protéine prion humaine après transfection transitoire de cellules COS par dosage immunométrique.

III.1.2.1.2.2 Immuno-transfert

Protocole (Figure 42) :

Trois jours après la transfection de cellules COS par les différentes constructions, les cellules sont récupérées et comptées. Elles sont ensuite lysées en tampon Triton-DOC (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0,5% Triton X-100, 0,5% sodium deoxycholate, pH 7,5). La concentration en protéine totale des extraits cellulaires est déterminée par un dosage colorimétrique BCA (bicinchoninic acid assay, Pierce). La protéine prion humaine est ensuite mise en évidence par immuno-transfert selon le protocole suivant : 10µg de protéines totales du culot cellulaire sont séparés selon leur poids moléculaire apparent. Après migration électrophorétique en condition SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis sodium dodecyl sulfate, 2h sous 150V) et transfert sur membrane de nitrocellulose (1h sous 110V), cette-dernière est saturée (30min en PBS-1% tween 20-5% BSA). Après lavage, la membrane est incubée avec l'anticorps SAF60 à 0.1µg/ml pendant 30min à température ambiante puis avec l'anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxydase pendant 20min à température ambiante. L'activité de la peroxydase est détectée par chimioluminescence (Pierce).

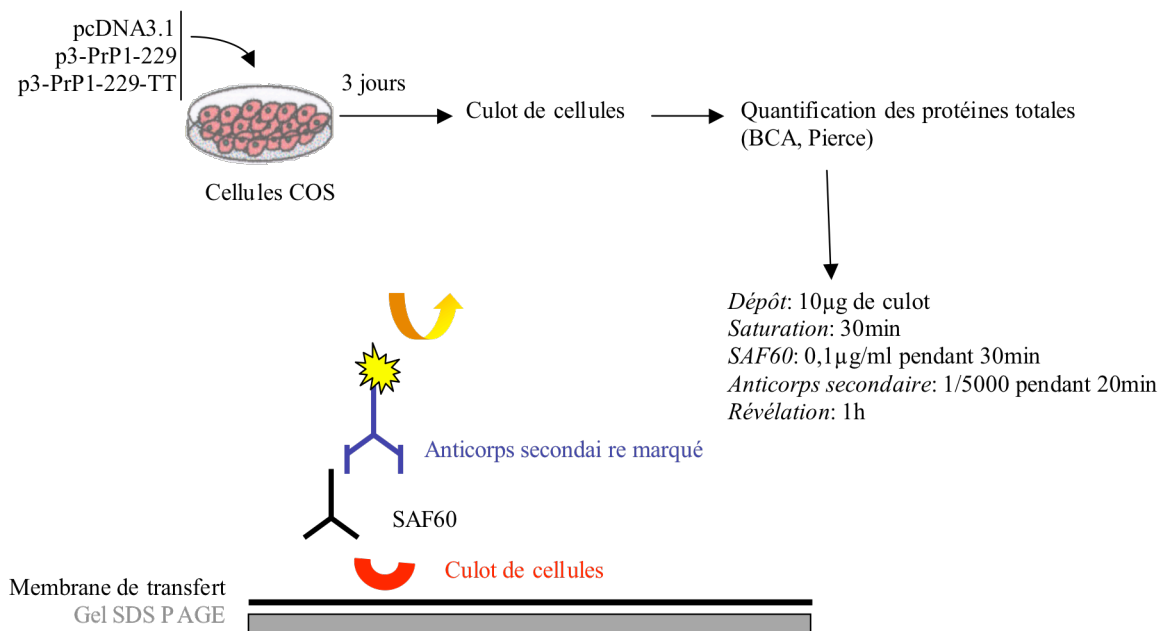


Figure 42 : Mise en évidence de la protéine prion humaine par immuno-transfert

Comme le montre la Figure 43, aucun signal n'est détecté dans les culots de cellules COS non transfectées (NT) ou transfectées avec le vecteur vide (pcDNA3.1). On observe une bande au poids moléculaire attendu pour les 4 constructions soit respectivement 24kD pour les deux constructions p3-PrP1-229 et 26kD pour les deux constructions p3-PrP1-229-TT. Toutefois, on peut remarquer que l'intensité du signal est plus forte pour les constructions p3-PrP1-229 clone D5 et p3-PrP1-229-TT clone D5. Ainsi, en accord avec les résultats obtenus par dosage immunométrique, ces deux constructions semblent les mieux exprimées.

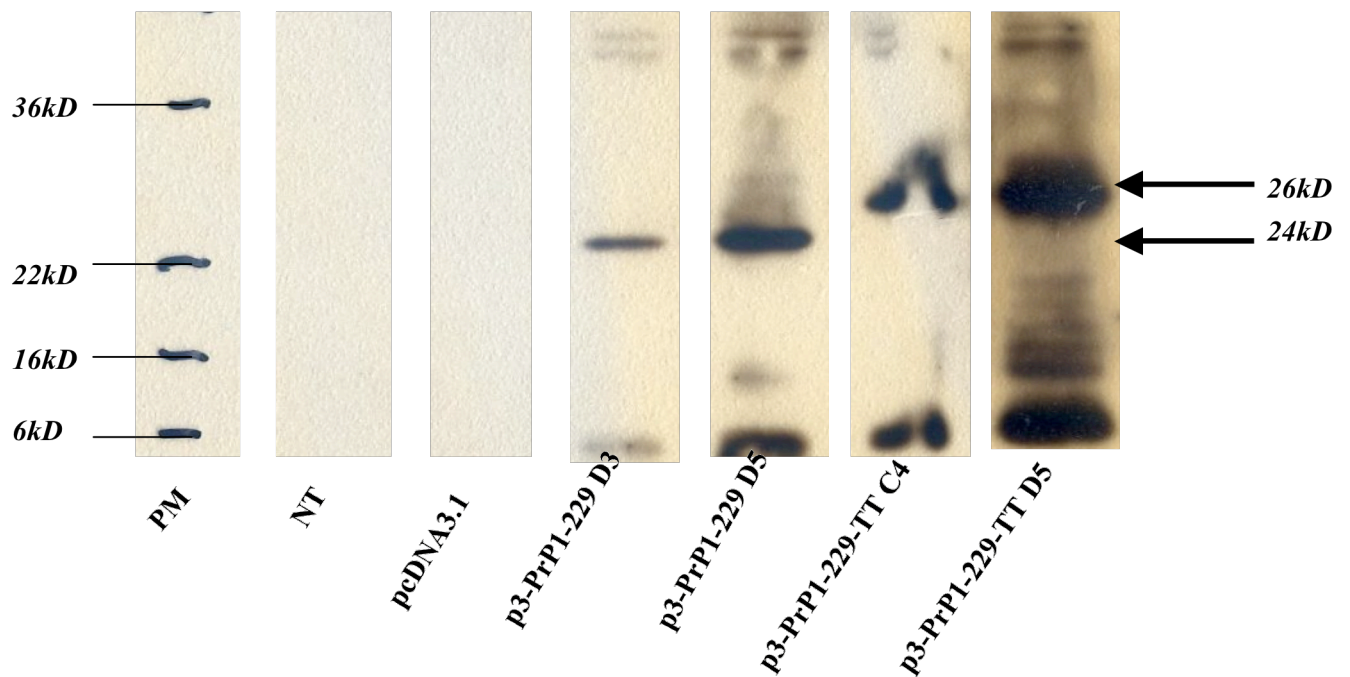


Figure 43 : Détection de la protéine prion humaine par immuno-transfert.

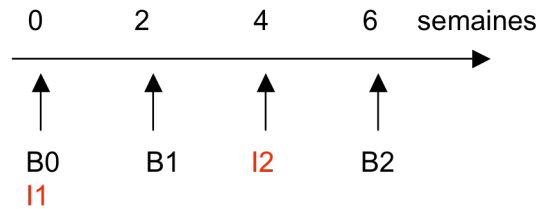
En vue des immunisations géniques, les deux constructions p3-PrP1-229 clone D5 et p3-PrP1-229-TT clone D5 ont été sélectionnées et purifiées en grande quantité en utilisant le kit Giga-Prep endotoxine free (Qiagen).

### III.1.2.2 Etude de différents protocoles d'immunisation

Afin de développer une méthode générale d'immunisation permettant la production d'anticorps dirigés contre une conformation native de la protéine prion humaine chez des souris de type sauvage, nous avons comparé différents protocoles d'immunisations géniques et protéiques en terme de stimulation de la réponse humorale spécifique. Comme nous l'avons exposé dans la dernière partie de l'introduction bibliographique, l'immunisation génique, en comparaison avec l'immunisation protéique plus classique, devrait favoriser la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de l'immunogène. Toutefois, si l'immunisation génique a permis l'obtention de résultats encourageants dans des études réalisées chez des animaux de petite taille et utilisant des séquences codant des antigènes très immunogènes, la réponse immune induite par des injections d'ADN nu chez des animaux de plus grande taille ou utilisant des séquences codant des antigènes faiblement immunogènes a été très décevante. Il semblerait que la faible perméabilité des membranes cellulaires aux acides nucléiques ainsi qu'une dégradation rapide de l'ADN nu par les nucléases aboutissent à une faible expression de la protéine d'intérêt *in vivo*. Nous avons donc comparé, en premier lieu, différents protocoles d'immunisation génique en terme de niveau d'expression de la protéine d'intérêt *in vivo*.

#### III.1.2.2.1 Description des différents protocoles d'immunisation

Les protocoles d'immunisation s'étendent sur 6 semaines (Figure 44). Ils reposent sur deux injections d'immunogène à 4 semaines d'intervalle. Des saignées effectuées deux semaines après chaque injection sont réalisées pour permettre le suivi de la réponse immunitaire. Les souris immunisées sont des femelles C57Bl/6 (H-2b) âgées de 6 semaines le jour de la première injection.



I1 et I2 représentent les deux injections d'immunogène. B0 représente la saignée pré-immune ; B1 et B2 les deux saignées immunes.

Figure 44 : Production d'anticorps dirigés contre une conformation native de la protéine prion humaine : description du protocole d'immunisation

#### III.1.2.2.1.1 Immunisation génique

Les immunogènes utilisés sont les vecteurs suivants :

- 1) le vecteur vide pcDNA3.1 comme témoin négatif
- 2) le vecteur p3-PrP1-229
- 3) le vecteur p3-PrP1-229-TT

Quel que soit le protocole d'immunisation génique utilisé, chaque injection comprend 100µg d'un des trois vecteurs à 1mg/ml.

#### →ADN nu

Ce protocole est basé sur l'injection d'ADN nu par voie intramusculaire après induction d'une dégénérescence réversible du muscle par la cardiotoxine. La cardiotoxine entraîne, d'une part, la dé-différenciation des myocytes en myoblastes, cellules plus facilement transfectables. D'autre part, la cardiotoxine engendre une réponse inflammatoire au site d'injection permettant le recrutement de CPA au site d'injection de l'ADN.



Protocole :

10 souris par lot sont immunisées par injection intramusculaire d'ADN au niveau du muscle antérieur du tibia de chaque patte postérieure. Cinq jours avant chaque injection d'ADN, les cellules musculaires sont traitées à la cardiotoxine purifiée à partir du venin de *Naja* (50µl de cardiotoxine à 10µM dans chaque muscle du tibia).

→Différentes formulations d'ADN

Pour protéger l'ADN de sa dégradation par les nucléases et ainsi augmenter son temps de circulation et favoriser la transfection cellulaire, de nombreux vecteurs chimiques ont été développés. Dans ce travail, nous en avons étudié deux : 1) l'in vivo JetPEI™ développé par Polyplus Transfection appartenant à la classe des polymères cationiques et 2) le poloxamine 304 appartenant à la classe des co-polymères amphiphiles.

*a) Lipides cationiques*

L'in vivo JetPEI™ développé par Polyplus Transfection appartient à la classe des polymères cationiques (voir *Introduction bibliographique : 2.2 Vecteurs non-viraux*). Ce polycation doit son efficacité à sa faculté de lyser les endosomes (Figure 45). En effet, dans la cellule, il se comporte comme une éponge à protons induisant la rupture des endosomes par gonflement osmotique, provoquant ainsi le largage rapide de l'ADN dans le cytoplasme tout en le protégeant des nucléases cytosoliques. Contrairement aux autres agents lipidiques, il est soluble dans l'eau. Dilué dans une solution glucosée, in vivo JetPEI™ prend la forme de nanoparticules de taille inférieure à 50nm ce qui facilite sa diffusion dans les tissus animaux.

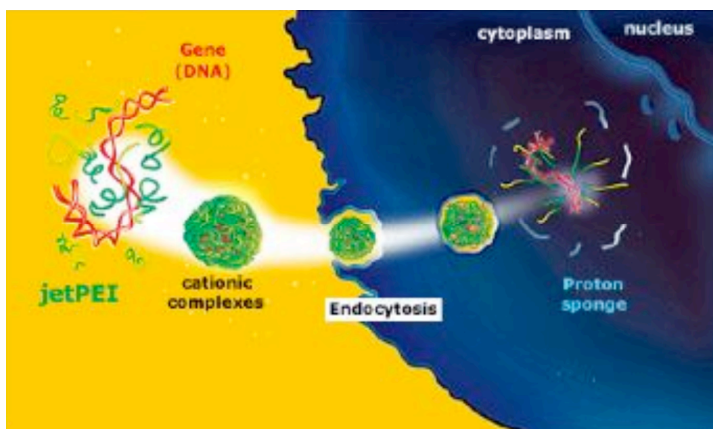


Figure 45 : Mode d'action de l'in vivo JetPEI™

([http://www.ozyme.fr/\\_prod/gammes/polyplus/in\\_vivo-jetpei.htm](http://www.ozyme.fr/_prod/gammes/polyplus/in_vivo-jetpei.htm))

Protocole :

100µg d'ADN sont dilués dans 100µl de glucose 10%. 14µl d'in vivo JetPEI™ sont dilués dans 200µl de glucose 5%. 200µl de chacune des deux solutions (d'ADN et d'in vivo JetPEI™) sont mélangés et vortexés. On obtient une solution N/P=7, ce rapport représente le nombre de résidus azote de l'in vivo JetPEI™ par phosphate d'ADN. Après incubation pendant 15min à température ambiante, 400µl de cette solution ADN-in vivo JetPEI™ sont injectés par voie intrapéritonéale. 4 souris par lot sont ainsi immunisées.

b) Block Copolymers

Le poloxamine 304 (BC304) appartient à la classe des co-polymères amphiphiles. Il est composé de 4 blocs polyéthylèneoxyde/polypropylèneoxyde (PEO/PPO) centrés sur une moitié éthylènediamine (Figure 46).

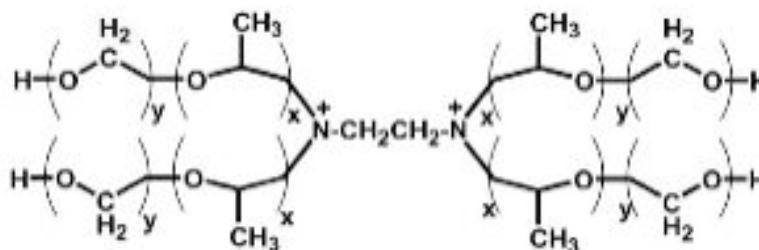


Figure 46 : Structure générale des poloxamines

Protocole :

Le BC304 nous a été généreusement fourni par BASF. Une solution stock à 20% dans de l'eau a été préparée. La formulation de l'ADN avec le BC304 a été réalisée de la façon suivante : un volume égal de la solution stock en BC304 et d'une solution d'ADN à 2mg/ml dans du Tyrode 2X sont mélangés et mis à agiter 4h à 4°C. 50µl de cette formulation sont injectés par voie intramusculaire dans le muscle antérieur du tibia de chaque patte postérieure.

→Electroporation in vivo

L'électrotransfert *in vivo* apparaît comme une technique simple et efficace de transfert de gène. Au cours de ces dernières années, cette technique a été employée sur une large variété de tissus incluant entre autres : le muscle squelettique, la peau, le foie, les poumons, le cerveau, la rétine (Mir *et al.*, 1999 ; Bettan *et al.*, 2000 ; Otten *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2002 ; Dean *et al.*, 2003 ; Matsuda *et al.*, 2004 ; Inoue *et al.*, 2001). Dans notre étude nous avons choisi comme tissu cible, le muscle squelettique, qui offre de nombreux avantages (Lu *et al.*, 2003 ; Goldspink, 2003) :

- il constitue un large volume facilement accessible
- il est constitué d'un ensemble de fibres musculaires organisées en fibres parallèles pouvant être transfectées sur toute leur longueur
- les cellules musculaires possèdent plusieurs noyaux ce qui peut augmenter le rendement de transfection
- les cellules musculaires ne se divisant pas, la transfection de fibres musculaires permet une expression à long terme de transgène
- le muscle possède une vascularisation développée permettant aux protéines d'intérêt néo-synthétisées d'atteindre rapidement la circulation sanguine

Les conditions optimales de l'électroporation *in vivo* dans un tissu donné résultent d'un compromis entre l'efficacité de transfection et une toxicité cellulaire minimale. La perméabilisation membranaire induite par le champ électrique est le principal paramètre engendrant une toxicité en modifiant la composition du milieu intra-cellulaire. Ainsi la

durée et le niveau de perméabilisation doivent être réduits au minimum. Or Bureau et al. ont montré que l'électrotransfert était la combinaison de deux phénomènes : la perméabilisation membranaire et un effet électrophorétique sur l'ADN (Bureau *et al.*, 2000). Une étude plus récente a confirmé que les impulsions de haut voltage et de courte durée (HV) entraînent la perméabilisation de la cellule alors que les impulsions de faible voltage et de longue durée (LV) sont à la base de l'effet électrophorétique sur l'ADN (Satkauskas *et al.*, 2002). Ainsi nous avons opté pour un protocole classique constitué de 8 impulsions électriques de faible voltage (200V/cm) et de longue durée (20ms) à une fréquence de 1Hz. Nous avons utilisé des électrodes composées de deux plaques attachées à une pince offrant une meilleure répartition du champ électrique tout le long des fibres musculaires.

Protocole (Figure 47) :

10 souris sont anesthésiées (kétamine 100mg/kg/ xylasine 10mg/kg) puis immunisées par injection intramusculaire d'ADN au niveau du muscle antérieur du tibia de chaque patte postérieure. Un gel conducteur est appliqué sur toute la longueur du muscle. Les impulsions électriques sont ensuite appliquées au muscle (200v/cm, 20ms, 8 implusions, 1Hz) par deux électrodes plaques (BTX Caliper Electrodes) placées de part et autre de la patte et reliées à un générateur (ECM830,BTX).

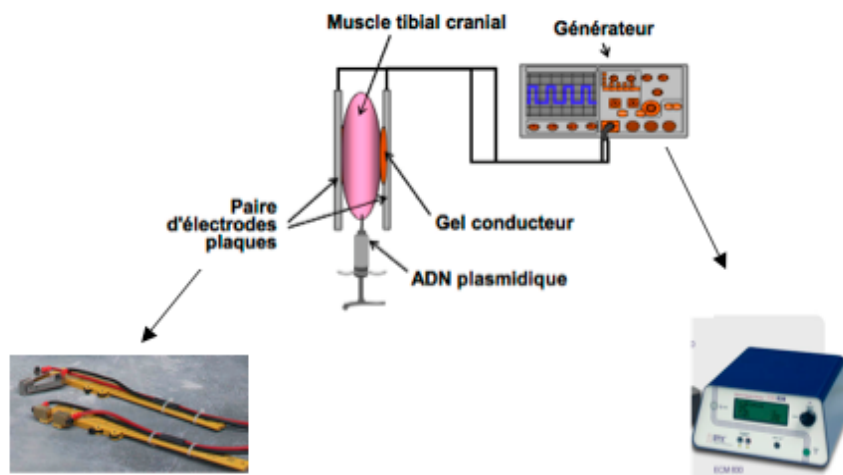


Figure 47 : Schéma du montage expérimental de l'électrotransfert intramusculaire

III.1.2.2.1.2 Immunisation protéique

L'immunogène utilisé est la protéine prion humaine recombinante (hPrP24-231), produite dans notre laboratoire (annexe 3), en combinaison avec différents adjuvants. Le terme « adjuvant » désigne toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immune dirigée contre l'antigène administré simultanément. Toutefois, un adjuvant efficace ne doit pas seulement renforcer la réponse immune, mais il doit aussi l'orienter en fonction de la pathogenèse propre à chaque infection. Chaque adjuvant est d'abord caractérisé par sa capacité à activer sélectivement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th1 ou Th2 qui correspondent aux deux grandes voies empruntées par la réponse immune, soit de type cellulaire soit humoral. Il existe de nombreux adjuvants, de nature et d'origine diverses. Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de deux adjuvants appartenant à des classes distinctes (Tableau 12) : l'Adjuvant Incomplet de Freund (IFA) appartenant à la classe des adjuvants huileux et le phosphate d'aluminium (alum) appartenant à la classe des adjuvants minéraux.

ADJUVANT	ORIGINE OU COMPOSITION CHIMIQUE	EFFETS SUR LA RÉPONSE IMMUNE
alum	minérale	stimulation de la réponse en anticorps (Th2)
adjuvant incomplet de Freund et adjuvants huileux	émulsions eau dans huile (huiles minérales ou végétales + agents de surface)	importante production d'anticorps ; fortement inflammatoires

Tableau 12 : Origine et propriétés des deux adjuvants étudiés

(d'après Vermout et al., 2003)

**→ Adjuvant Incomplet de Freund (IFA)**

Cet adjuvant constitue l'émulsion eau dans l'huile la plus connue et la plus utilisée. Cette formulation permet la libération progressive de l'antigène au niveau du site d'injection et sa présentation sur une surface étendue. Elle le protège de la dégradation

par les protéases sériques. De plus, cet adjuvant attire les cellules de l'immunité non spécifique, et active la voie du complément alterne entraînant un environnement inflammatoire.

#### **→ Phosphate d'aluminium (Alum)**

Cet adjuvant appartient à la classe des adjuvants minéraux. Cette formulation se présente sous forme d'un précipité insoluble (de type gel) sur lequel sont adsorbés les antigènes en solution aqueuse. Les antigènes interagissent avec les ions du gel par des forces électrostatiques. Cet adjuvant permet la concentration locale de l'antigène et favorise donc son endocytose par les CPA. Il induit une réponse de type Th2 et stimule donc la production d'anticorps (Nicklas, 1992).

#### Protocole :

*5 souris par lot sont immunisées par voie intrapéritonéale avec 20µg de PrP humaine recombinante reprise volume à volume dans chacun des adjuvants étudiés.*

#### *III.1.2.2.2 Suivi de l'expression de la PrPc humaine in vivo*

Comme nous l'avons décrit dans la troisième partie de l'introduction, l'immunisation génique qui consiste à injecter de l'ADN codant l'antigène, est un concept novateur né au début des années 90. Cette méthode d'immunisation présente notamment l'avantage de l'expression *in vivo* de l'antigène sous sa conformation native, tout du moins similaire à celle présente lors d'une infection. Toutefois, une des limitations de l'injection d'ADN nu est le niveau d'expression de la protéine d'intérêt *in situ*. Ainsi dans cette partie, nous avons comparé les différents protocoles d'immunisation génique en terme d'expression de la protéine prion humaine *in vivo*.

III.1.2.2.2.1 Mise au point du dosage

Une des difficultés de la mise au point du dosage est la forte homologie de séquence entre la protéine prion humaine et murine qui est ubiquiste (90%). La spécificité du dosage sera donc étudiée.

La présence de PrPc humaine dans les extraits tissulaires a été mise en évidence par un dosage immunométrique. La spécificité du dosage est basée sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-PrPc spécifique de la protéine prion humaine (Pri308), immobilisé sur la phase solide (Figure 48).

Protocole (Figure 48) :

*Les tissus sont prélevés et pesés. Le volume en glucose 5% est ajusté en fonction du poids pour constituer un extrait tissulaire à 10%. Les tissus sont broyés à l'aide d'un ribolyseur (Bio-Rad). Un cocktail d'antiprotéases est rajouté pour la conservation des extraits tissulaires (Complete Tablet, Roche). L'anticorps monoclonal Pri308, à 10µg/ml en tampon phosphate 50mM, est immobilisé sur la phase solide 96-puits (Immunoplate, Maxisorp, Nunc) par incubation une nuit à température ambiante, puis les sites non spécifiques sont saturés en BSA (tampon EIA : 0,1M tampon phosphate pH 7,4 contenant 0.1% de BSA, 0,15M NaCl et 0,01% d'azide de sodium). Les plaques sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. 100µl d'une gamme d'extrait tissulaire en tampon 20% Triton-DOC-PVP sont incubés une nuit à 4°C. Après 3 lavages, 100µl/puits de Sha31 couplé à l'acétylcholinestérase (AChE) à 2 unit/µl en tampon PVP sont incubés pendant 2 heures à température ambiante. Après 6 lavages, l'activité de l'AChE est mesurée par la méthode colorimétrique d'Ellman, comme décrit précédemment (Grassi et al., 1989). La mesure de l'absorbance à 414nm à 2h permet d'évaluer directement la quantité de PrP humaine présente dans les différents échantillons testés. On utilise comme standard la PrPc humaine recombinante produite au laboratoire (annexe 3).*

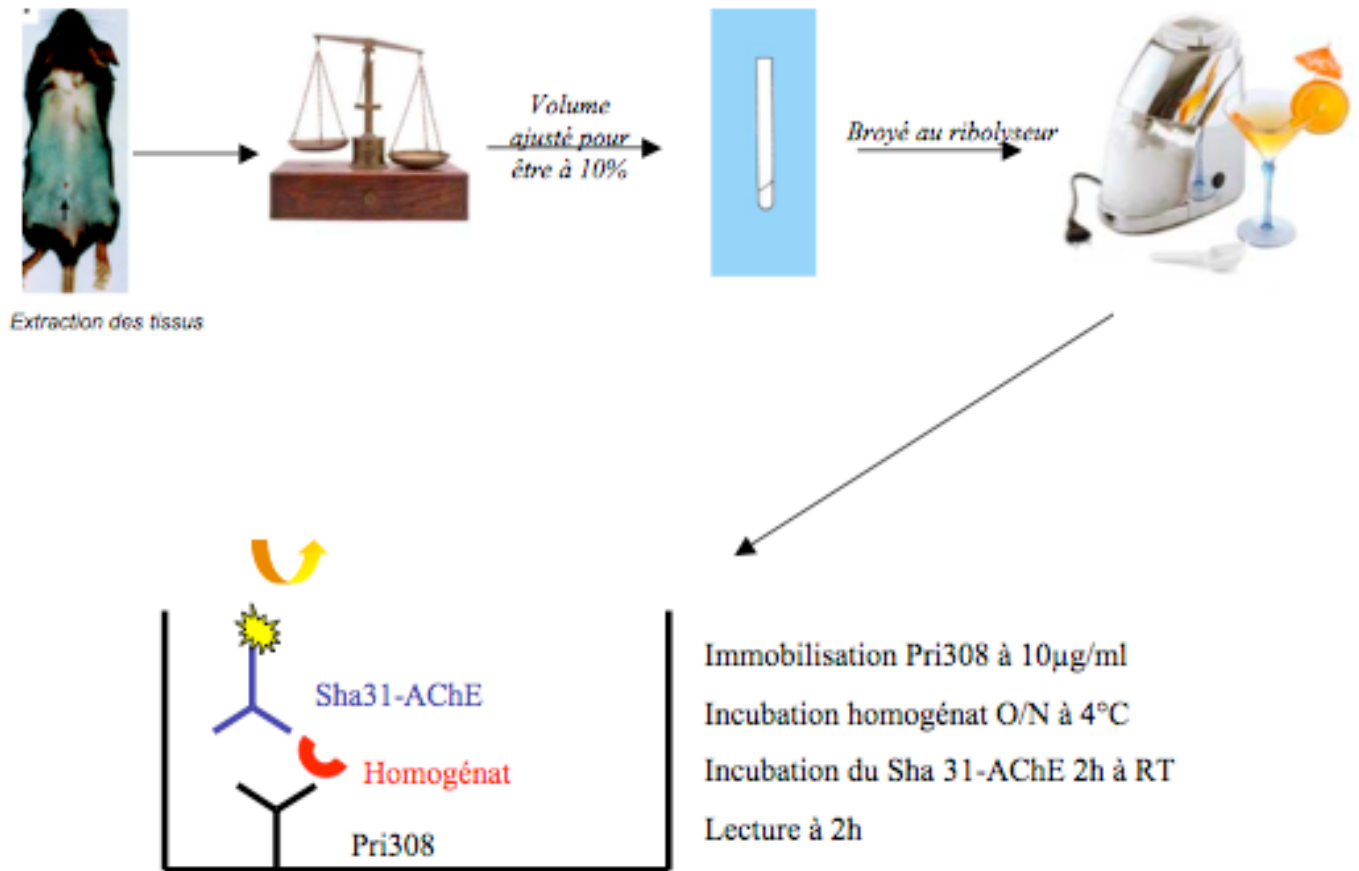


Figure 48 : Dosage de la PrPc humaine *in vivo*



-Analyse de la spécificité du dosage.

Le cerveau est un tissu riche en PrPc. Nous avons donc choisi de comparer les signaux obtenus après incubation sur la phase solide d'une gamme d'extraits de cerveau humain, murin ou de souris invalidé pour le gène *Prnp* (Figure 49).

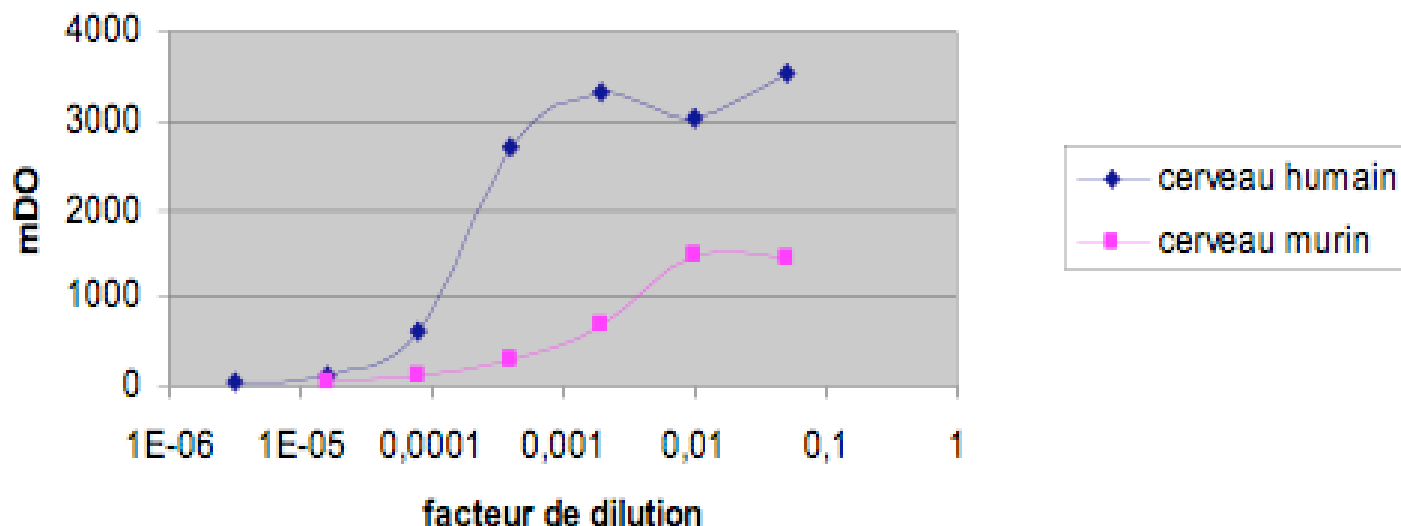


Figure 49 : Analyse de la spécificité du dosage immunométrique

Aucun signal n'a pu être détecté pour la gamme en homogénat de cerveau de souris invalidées pour le gène *Prnp*. D'après la Figure 49, les signaux obtenus pour la gamme en homogénats de cerveau humain sont supérieurs à ceux obtenus pour la gamme en homogénats de cerveau murin mettant en évidence une meilleure reconnaissance de la PrPc humaine dans les conditions expérimentales utilisées. Toutefois, nous mettons en évidence des signaux non négligeables pour les dilutions les plus faibles d'homogénat de cerveau murin laissant apparaître une spécificité non stricte du dosage. En faisant le rapport des facteurs de dilution pour lesquels on se trouve à la limite de détection du dosage (densité optique correspondant à la moyenne des densités optiques de l'absorption non spécifique sur la phase solide à laquelle on ajoute 3 fois l'écart type de ces valeurs), on peut estimer que la *réaction croisée* entre la PrPc humaine et murine du dosage immunométrique utilisé est de l'ordre de 10%.

-Ajouts dosés.

Pour vérifier si la PrPc humaine peut être quantifiée indépendamment de la matrice dans laquelle elle se trouve, nous avons effectué des ajouts dosés. Des quantités connues en PrPc humaine recombinante ont été ajoutées dans des extraits de foie, de pancréas et d'ovaires de souris de type sauvage et comparées avec une même gamme en PrPc recombinante réalisée dans du tampon 20% Triton-DOC-PVP (Figure 50).

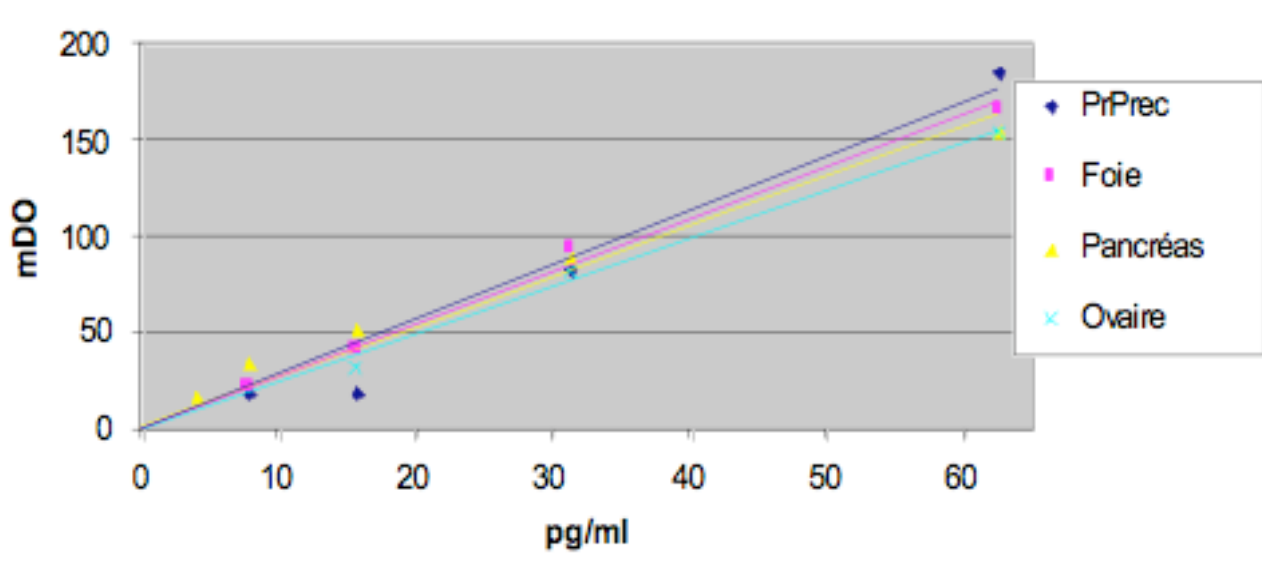


Figure 50 : Ajouts dosés

D'après la Figure 50, quelle que soit la matrice dans laquelle est réalisée la gamme en PrPc humaine recombinante, les droites obtenues sont confondues. Ainsi cette gamme est reproductible indépendamment de la matrice utilisée. On peut utiliser comme *standard une gamme en PrPc humaine recombinante réalisée dans le tampon de dilution des extraits tissulaires*. De plus, on peut estimer la *sensibilité de ce dosage à 10pg/ml* (concentration en PrPc humaine recombinante pour laquelle on se trouve à la limite de détection).

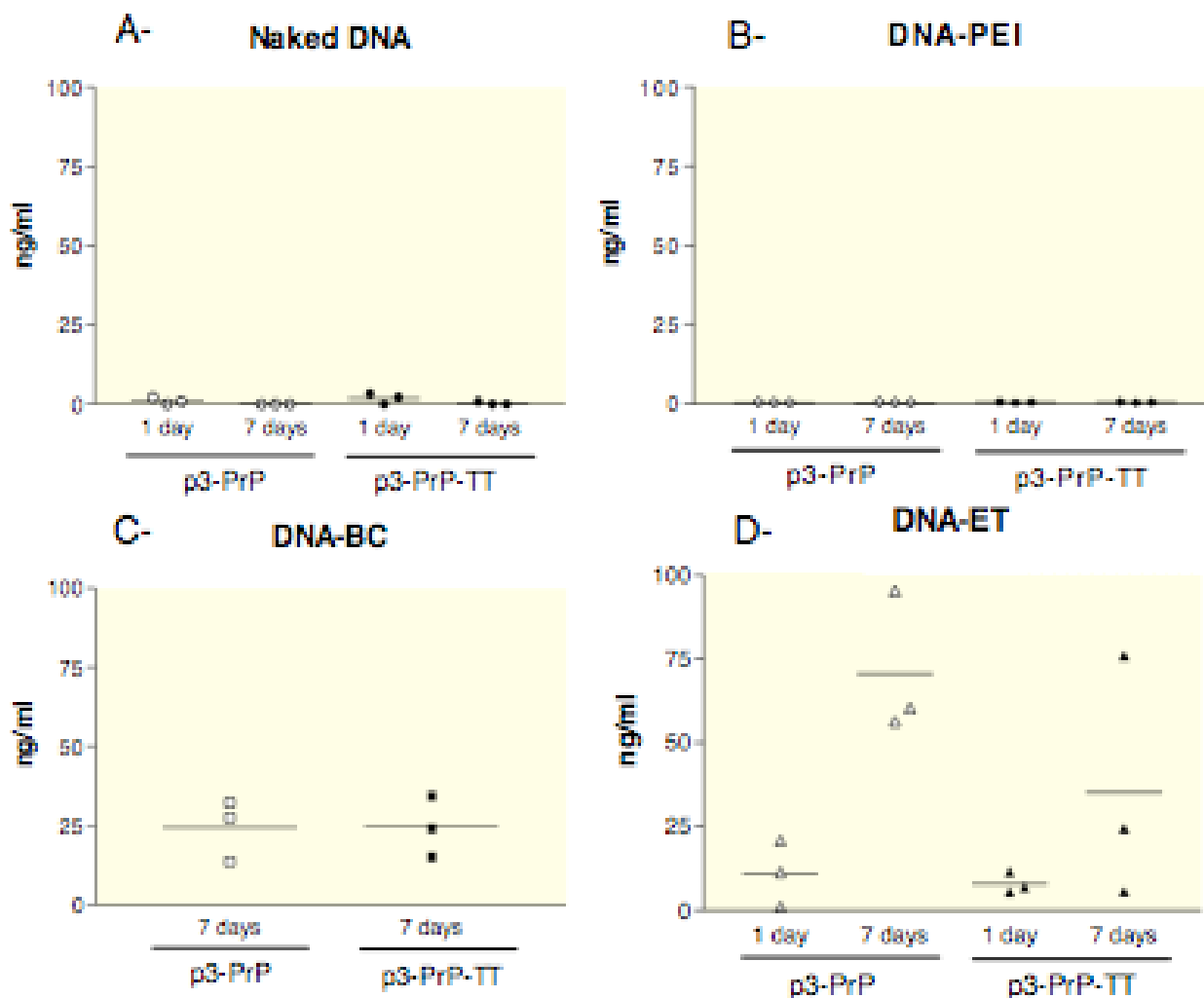
III.1.2.2.2 Dosage de la protéine prion humaine *in vivo*

Six souris par lot ont été immunisées selon les différents protocoles d'immunisation génique étudiés. Trois souris par lot sont sacrifiées 1 jour après l'injection d'ADN et les 3 autres, 7 jours après cette injection. Sauf pour le lot BC304 où seul le niveau d'expression 7 jours après l'injection d'ADN a été étudié. Les tissus d'intérêt sont prélevés : le muscle et la rate pour les injections intramusculaires (ADN nu, BC304 et électroporation *in vivo*) ; la rate, le foie, le pancréas et les ovaires pour les injections intrapéritonéales (*in vivo* JetPEI). Les résultats obtenus dans le muscle (ou dans la rate pour le protocole *in vivo* JetPEI) sont reportés dans la Figure 51.

Comme le montre la Figure 51A et la Figure 51B, les injections d'ADN nu (Naked DNA) ou formulé avec l'*in vivo* Jet PEI (DNA-PEI) ne permettent pas l'expression de la protéine d'intérêt dans le muscle et la rate, respectivement. De plus, concernant ces deux protocoles d'immunisation, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression de la PrPc humaine quel que soit l'organe étudié. Cependant, l'injection d'ADN formulé avec le block copolymer BC 304 (DNA-BC) ou suivi d'un choc électrique (DNA-ET) entraîne une forte augmentation de l'expression de la protéine d'intérêt dans le muscle (Figure 51C et Figure 51D). La protéine prion humaine est détectable dans le muscle dès 1 jour après électroporation de l'ADN avec une concentration moyenne de 10ng/ml. Son niveau d'expression atteint 25-70ng/ml à 7 jours dans les protocoles DNA-BC et DNA-ET. En outre, il semble se dessiner une différence entre le niveau d'expression de la protéine d'intérêt suite à l'injection des différents vecteurs d'expression suggérant que la présence de l'épitope T puisse réduire ce niveau d'expression, résultat en accord avec ceux obtenus lors du dosage de la protéine d'intérêt *ex vivo* (Figure 51D). Toutefois, cette différence n'est pas statistiquement significative. Par ailleurs, 15 jours après l'injection des plasmides, nous n'avons plus détecté de protéine prion humaine dans les extraits tissulaires quel que soit le protocole étudié. De plus, la protéine d'intérêt n'a pu être mise en évidence dans les extraits de rate, quels que soient le protocole et le temps étudiés.

D'après ces résultats, il semblerait que l'électrotransfert soit une méthode efficace pour augmenter l'expression de la protéine d'intérêt *in vivo* suite à l'injection d'ADN. En effet, comme nous avons estimé la limite de détection du dosage immunométrique utilisé

à 10pg/ml, on peut estimer que l'électroporation *in vivo* a permis d'augmenter au moins 5000 fois le niveau d'expression de la protéine d'intérêt par comparaison avec l'injection d'ADN nu.



Injections : 100µg p3-PrP1-229 (p3-PrP) ou p3-PrP1-229-TT (p3-PrP-TT).

A- Niveau d'expression de la protéine prion humaine dans le muscle 1 jour ou 7 jours après l'injection d'ADN nu.

B- Niveau d'expression de la protéine prion humaine dans la rate 1 jour ou 7 jours après l'injection d'ADN formulé avec l'*in vivo* JetPEI.

C- Niveau d'expression de la protéine prion humaine dans le muscle 7 jours après l'injection d'ADN formulé avec le BC304.

D- Niveau d'expression de la protéine prion humaine dans le muscle 1 jour ou 7 jours après l'injection d'ADN suivi d'un électrotransfert.

Figure 51 : Expression de la protéine prion humaine *in vivo*

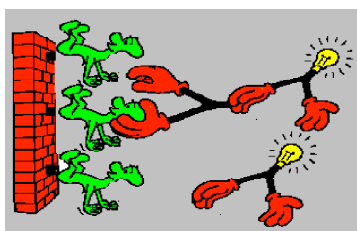
### III.1.2.2.3 Suivi de la réponse immunitaire

Nous avons comparé différents protocoles d'immunisations génique et protéique en terme de niveau de réponse en anticorps spécifiquement dirigés contre cette protéine. D'après le suivi du niveau d'expression de la protéine prion humaine *in vivo* suite aux différents protocoles d'immunisation génique, la formulation de l'ADN avec l'*in vivo* JetPEI n'a pas donné des résultats satisfaisants. Ce protocole ne sera donc plus utilisé dans la suite des travaux.

#### **→ par immuno-analyse**

Protocole (Figure 52) :

La protéine prion humaine recombinante, à 10 $\mu$ g/ml en tampon phosphate 50mM, est immobilisée sur la phase solide 96-puits (Immunoplate, Maxisorp, Nunc) par incubation une nuit à température ambiante, puis les sites non spécifiques sont saturés en BSA (tampon EIA : 0,1M tampon phosphate pH 7,4 contenant 0.1% de BSA, 0,15M NaCl et 0,01% d'azide de sodium). Les plaques sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. 100 $\mu$ l d'une gamme de dilution des différentes saignées en tampon EIA sont incubés une nuit à 4°C. Après 3 lavages, 100 $\mu$ l/puits d'un anticorps de révélation anti-souris (Affinipure goat antibodies anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch) couplé à l'acétylcholinestérase (AChE) à 2 unit/ $\mu$ l en tampon EIA sont incubés pendant 2 heures à température ambiante. Après 6 lavages, l'activité de l'AChE est mesurée par la méthode colorimétrique d'Ellman, comme décrit précédemment (Grassi et al., 1989). La mesure de l'absorbance à 414nm à 1h permet d'évaluer directement la quantité en anticorps spécifiquement dirigés contre la PrP humaine présente dans les différents échantillons testés.



Immobilisation de la PrPc humaine (10 $\mu$ g/ml)  
Incubation des saignées une nuit à 4°C  
Incubation de l'anticorps secondaire 2h à RT

RT : température ambiante

Figure 52 : Dosage immunométrique : suivi de la réponse anticorps dirigés contre la PrPc humaine

-homogénéité de la réponse.

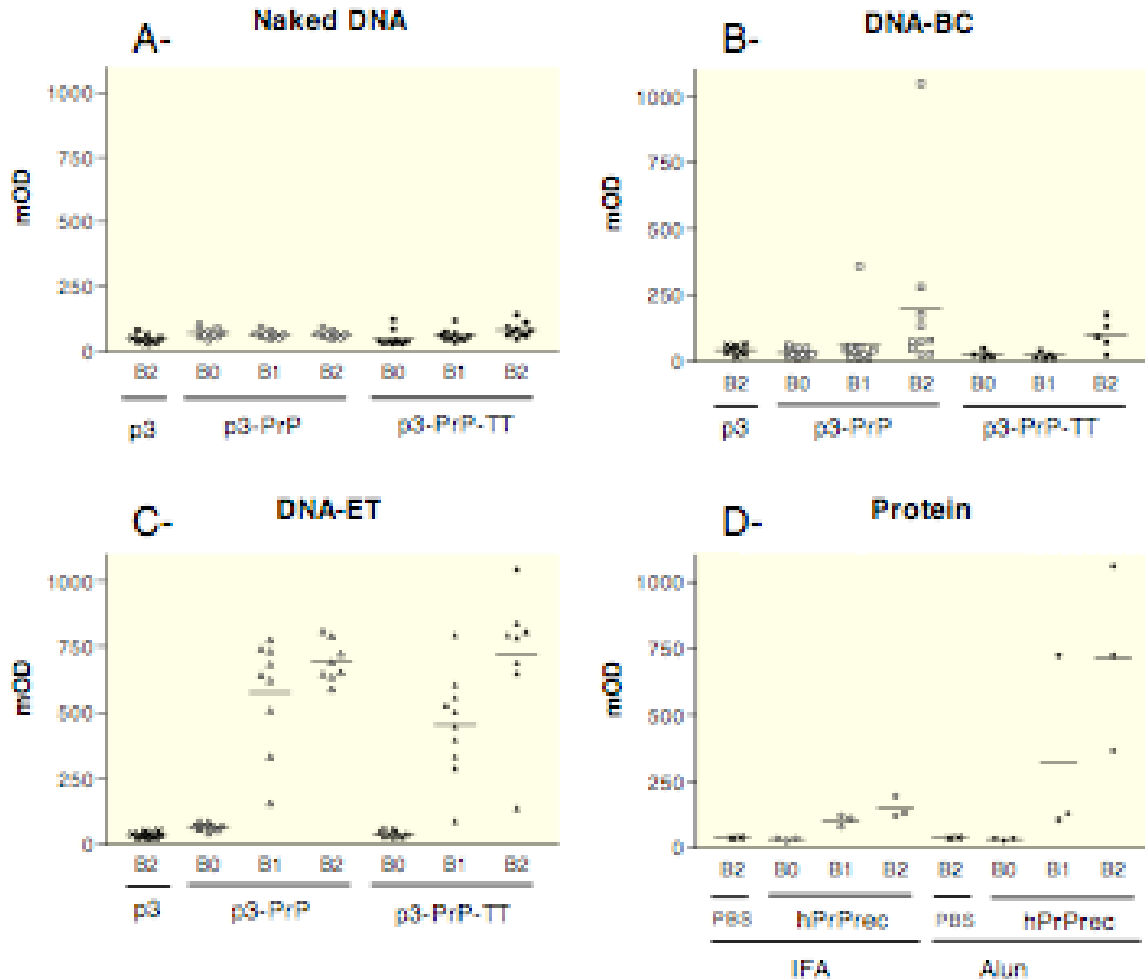
Dans un premier temps, les saignées ont été incubées individuellement à une seule dilution (1/100). Les résultats obtenus sont reportés dans Figure 53.

Comme le montre la Figure 53, aucun anticorps spécifiquement dirigé contre la PrPc humaine n'a été détecté dans les témoins négatifs (p3 seul pour les protocoles d'immunisation génique ou tampon seul pour les protocoles d'immunisation protéique). De façon non surprenante au vu des résultats obtenus dans l'étude de l'expression protéique *in vivo*, des injections d'ADN nu ne permettent pas la production d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt (Figure 53A).

D'après la Figure 53B, la formulation de l'ADN avec le block copolymer BC304 n'entraîne qu'une faible stimulation de la réponse en anticorps spécifiques. De plus, seulement 4 souris sur 10, immunisées avec le vecteur p3-PrP1-229 (p3-PrP), présentent des anticorps spécifiques dans leur sérum. Au contraire, l'électrotransfert *in vivo* des vecteurs d'expression p3-PrP1-299 et p3-PrP1-229-TT a permis une stimulation importante de la réponse humorale spécifique et ce dès 2 semaines après une unique injection d'ADN (Figure 53C ; B1). De plus, nous avons détecté la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre la PrPc humaine dans le sérum des 10 souris immunisées 2 semaines après le rappel (Figure 53C ; B2).

Par ailleurs, la production en anticorps générés lors d'immunisation protéique semble être dépendante de l'adjuvant utilisé. Même si l'homogénéité de la réponse est identique (3 souris sur 3 présentent des anticorps spécifiques 2 semaines après le rappel

(B2)), l'utilisation d'alum semble permettre une meilleure réponse que celle induite avec l'IFA (Figure 53D).



La PrPc humaine recombinante est immobilisée sur des plaques de microtitration 96-puits. Les saignées (1/100) sont incubées individuellement une nuit à 4°C. L'éventuelle fixation d'anticorps sur la phase solide est révélée par un anticorps de révélation anti-souris couplé à l'AChE. B0 : saignées pré-immunes ; B1 : saignées effectuées 2 semaines après la première immunisation ; B2 : saignées effectuées 2 semaines après le rappel.

A-Injection d'ADN nu.

B-Injection d'ADN formulé avec BC304.

C-Injection d'ADN suivi de l'électrotransfert.

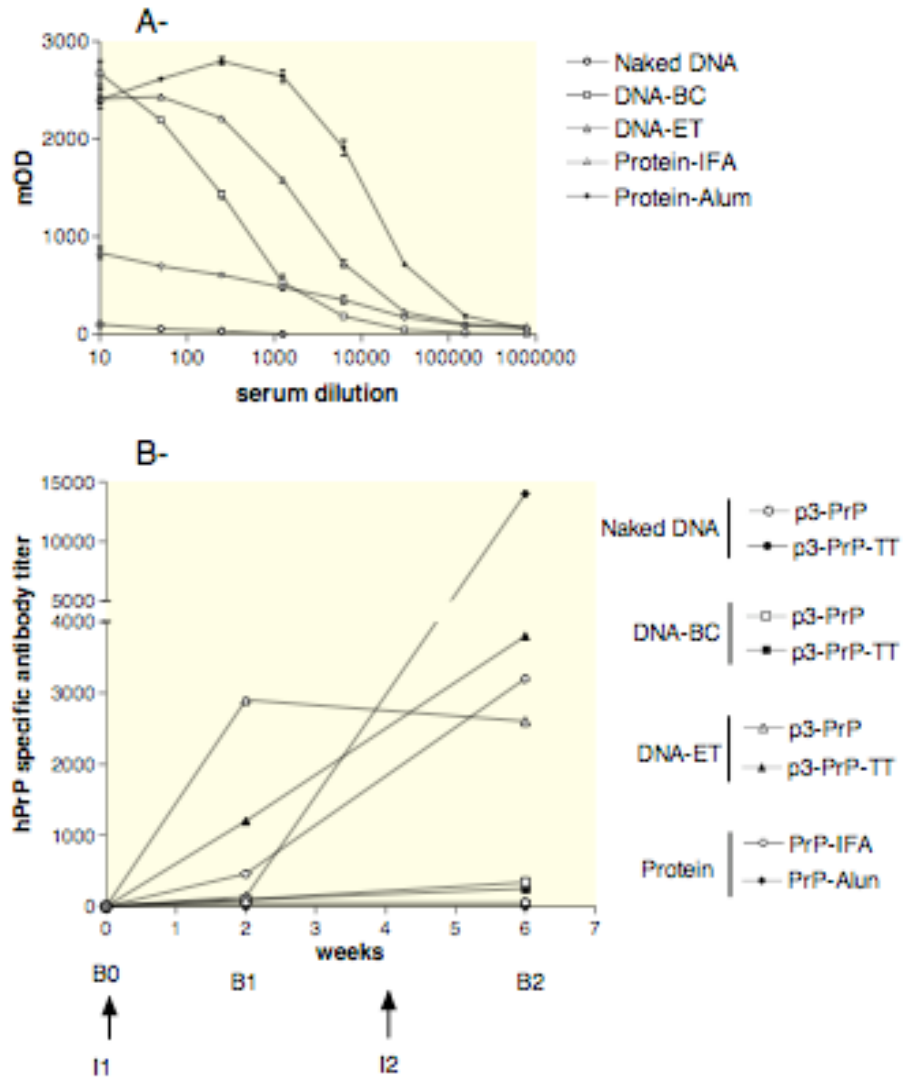
D-Injection de PrPc humaine recombinante dans de l'IFA ou dans de l'Alum.

Figure 53 : La réponse anticorps dirigés contre la PrPc humaine recombinante

-amplitude de la réponse.

Pour pouvoir comparer l'amplitude de la réponse anticorps et avoir une idée de l'affinité apparente des anticorps polyclonaux produits, les saignées ont été poolées et leur titre en anticorps dirigés contre la protéine humaine recombinante mesuré. Nous avons utilisé le même dosage immunométrique que précédemment pour différentes dilutions des saignées (des dilutions sériées de 5 en 5 sur 8 points en tampon EIA ; premier point :1/10). La Figure 54A représente un exemple de courbes obtenues pour les pools de saignées B2 (2 semaines après le rappel) avec les différents protocoles d'immunisation. Le titre en anticorps correspond à la dilution en sérum pour laquelle on obtient 50% du signal maximal. D'après la Figure 54B, les souris immunisées par électrotransfert présentent dans leur sérum un fort titre en anticorps dirigés contre la PrPc humaine (atteignant 1/2500 à 1/3500 selon le vecteur d'expression utilisé) (DNA-ET). Toutefois, des titres 5 fois supérieurs ont été mesurés chez des souris immunisées par la PrPc humaine recombinante conjuguée à de l'alum (Protein-Alum). De façon comparable, même si les signaux mesurés dans la Figure 53 semblent similaires entre le protocole d'immunisation génique utilisant le block copolymer BC304 et le protocole d'immunisation protéique utilisant l'IFA, le titre en anticorps est 10 fois supérieur chez les souris immunisées par la PrPc humaine recombinante conjugué à l'IFA (Protein-IFA) que chez des souris immunisées par de l'ADN formulé avec le BC304 (DNA-BC). Il semblerait donc que les protocoles d'immunisation protéique entraînent une production d'anticorps présentant une plus forte affinité pour la PrPc humaine recombinante immobilisée sur un support solide que les protocoles d'immunisation génique. Or, la fixation directe d'une protéine sur une phase solide est connue pour altérer sa conformation native (Butler *et al.*, 1992). Ainsi, à fin de comparer la capacités de ces différents anticorps à reconnaître la conformation native de la PrPc, nous avons réalisé des expériences de cytométrie en flux sur des cellules surexprimant la PrPc humaine.





La PrPc humaine recombinante est immobilisée sur des plaques de microtitration 96-puits. Différentes dilutions des saignées poolées (de 1/10 à 1/78125) sont incubées une nuit à 4°C. L'éventuelle fixation d'anticorps sur la phase solide est révélée par un anticorps de révélation anti-souris couplé à l'AChE.

A-Courbes obtenues pour les saignées B2 des différents protocoles d'immunisation.

B-Titre en anticorps spécifiquement dirigés contre la PrPc humaine en fonction des semaines.

Figure 54 : Détermination du titre en anticorps dirigés contre la PrPc humaine

**→ par cytométrie en flux**

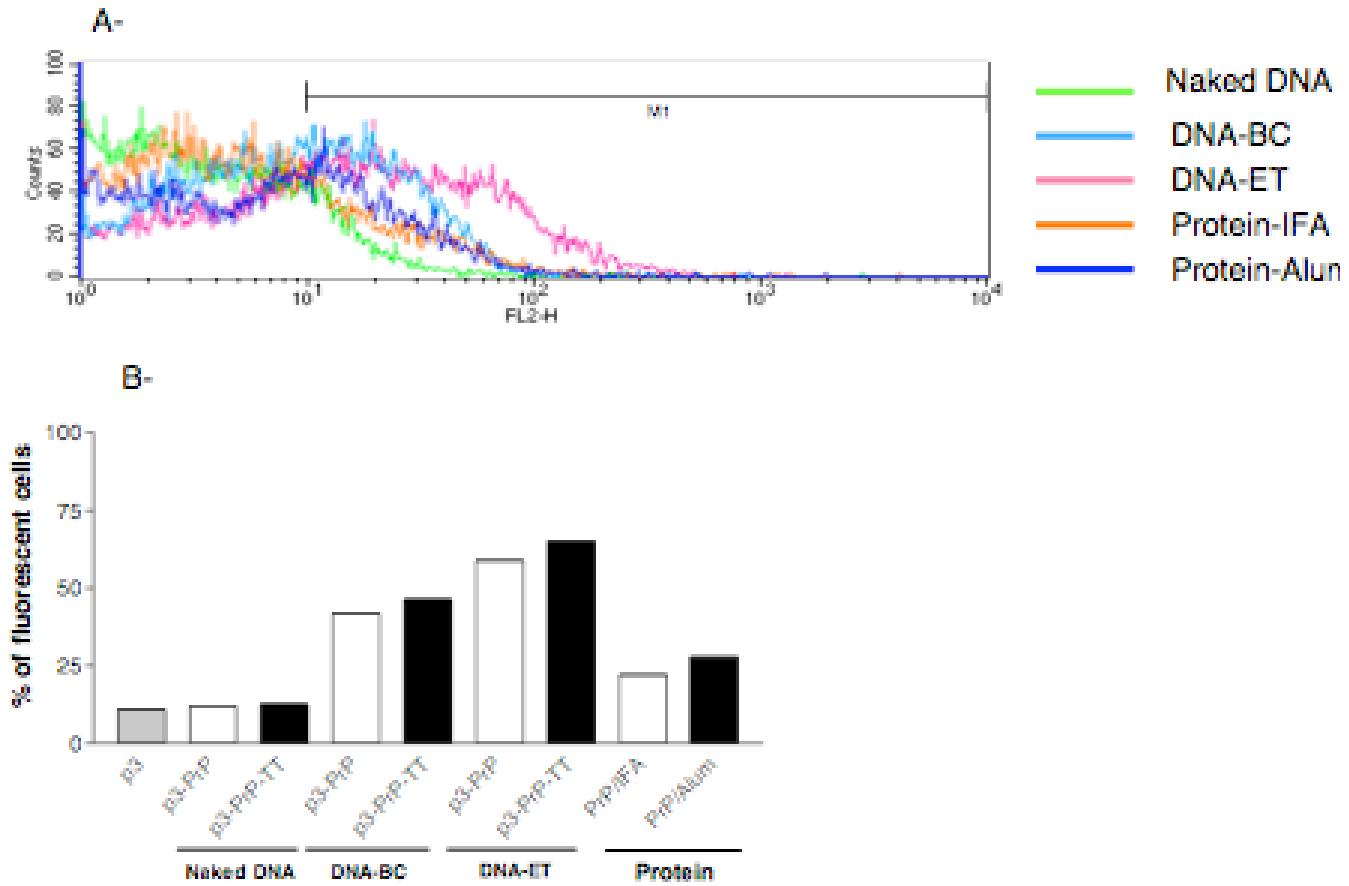
Nous avons testé la capacité de chaque pool de sérum à lier la PrPc humaine native exprimée à la surface des cellules. Pour ces expériences de cytométrie en flux, des cellules HEK ont été transfectées en stable par un vecteur d'expression eucaryote codant la protéine prion humaine entière (p3-PrP1-253) (Padiolleau-Lefèvre *et al.*, 2007).

Protocole :

*Des cellules HEK surexprimant de façon stable la PrP humaine cultivées à confluence sont lavées en PBS puis décollées au moyen d'une solution de dissociation sans trypsine (Sigma) 5min à 37°C afin de ne pas dégrader la PrP en surface des cellules. Les cellules sont centrifugées à 1500rpm à 4°C pendant 5 min. Après deux lavages en PBS, les cellules sont incubées 2h à 4°C avec 100µl de tampon PBS/0,1% BSA/20% de sérum normal de chèvre contenant les pool de saignées (1/100). Après deux lavages en PBS/0,1% BSA/1% de sérum normal de chèvre, les cellules sont incubées 1h à 4°C dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire (phycoerythrin-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch). Après deux lavages en PBS/0,1% BSA/1% de sérum normal de chèvre, elles sont reprises dans 500µl de Facs Flow (Becton Dickinson). La fluorescence de 10 000 cellules/tube est mesurée à l'aide du FACS-Calibur flow cytofluorometer (Becton Dickinson). L'iodure de propidium est utilisé pour détecter les cellules endommagées dont on ne tient pas compte pour l'analyse.*

Comme le montre la Figure 55A, un déplacement de la fluorescence vers la droite est observé lorsque les cellules sont incubées avec le pool de saignées B2 de souris immunisées selon le protocole d'électrotransfert (DNA-ET, courbe rose) et dans une moindre mesure avec le protocole utilisant BC304 (DNA-BC, courbe bleu clair). Toutefois, un très faible déplacement de la fluorescence est observé lors d'une incubation avec les pools de saignées issues des protocoles d'immunisation protéique (Protein-IFA, courbe orange ; Protein-Alum, courbe bleu foncé). En effet, d'après la Figure 55B, alors que 70% des cellules incubées avec les saignées issues du protocole d'électrotransfert et

50% des cellules incubées avec les saignées issues du protocole BC304 sont fluorescentes, seulement 25% des cellules le sont lors d'incubation avec les saignées provenant des protocoles d'immunisation protéique (IFA ou Alum).



Les cellules HEK surexprimant la PrPc humaine sont incubées 2h en présence du pool de saignées B2 de chaque protocole. La fixation éventuelle d'anticorps à la surface cellulaire est mise en évidence par un anticorps de révélation anti-souris couplé à la phycoérytrine.

A- Les déplacements de fluorescence obtenus en incubant les cellules avec le pool de saignées B2 immunisées par le vecteur p3-PrP1-229 pour les protocoles d'immunisation ou la PrPc humaine recombinante pour les protocoles d'immunisation protéique.

B- Le pourcentage de cellules fluorescentes observé en fonction du protocole d'immunisation.

Figure 55 : Reconnaissance de la PrPc humaine native exprimée à la surface des cellules

#### III.1.2.2.4 Discussion

L'objectif de cette étude est de développer un protocole d'immunisation permettant la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de la PrPc humaine et plus généralement contre une protéine humaine faiblement immunogène chez des souris de type sauvage. Depuis le développement de la technique des hybridomes par Köhler et Milstein, en 1975, permettant la production efficace d'anticorps monoclonaux, ces molécules sont apparues comme une classe importante de médicaments dans de nombreux domaines tels que l'oncologie, les maladies infectieuses et inflammatoires (Reichert *et al.*, 2005 ; Carter, 2006). Toutefois, si les anticorps ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché sont aujourd'hui peu nombreux, cela résulte, en partie, de la difficulté de produire des anticorps reconnaissant, *in vivo*, une protéine humaine. En conséquence, nous avons choisi un protocole d'*immunisation génique* afin de favoriser la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de l'antigène. En effet, l'immunisation génique qui consiste à injecter de l'ADNc codant la protéine d'intérêt permet la synthèse de l'antigène *in situ* sous sa conformation native. Toutefois, l'injection d'ADN nu souffre de nombreux inconvénients. Notamment, cette méthode possède une faible efficacité de transfection, dans le muscle par exemple, celle-ci est généralement de 1 à 5% des fibres musculaires totales (Wolff *et al.*, 1990 ; Doh *et al.*, 1997). Ainsi, les niveaux d'expression de la protéine d'intérêt *in vivo* obtenus sont généralement trop faibles pour produire un effet thérapeutique (Davis *et al.*, 1993). Dans un souci d'amélioration des protocoles d'immunisation génique, divers types de vecteurs non viraux ont vu le jour : 1) les vecteurs synthétiques tels que les lipides cationiques (*in vivo* JetPEI™) et les blocks copolymers (poloxamine 304) qui sont des molécules capables d'interagir avec l'ADN nu en modifiant ses propriétés physico-chimiques et 2) les outils qui utilisent des moyens physiques pour propulser l'ADN dans la cellule (électrotransfert *in vivo*). En parallèle ces quatre protocoles d'immunisation génique, nous avons étudié l'effet de deux classes d'adjuvant (constituants bactériens et adjuvants minéraux) sur la stimulation de la production en anticorps spécifiques dans des protocoles d'*immunisation protéique* classiques.

Nos résultats mettent en avant l'intérêt de l'immunisation génique pour la production d'anticorps dirigés contre une conformation native de l'antigène. En effet, nous avons mis en évidence une différence en terme de spécificité fine des anticorps spécifiques générés par immunisation génique ou par immunisation protéique. Alors que les protocoles d'immunisation protéique permettent une réponse en anticorps plus importante et présentant une meilleure affinité pour la protéine prion humaine recombinante immobilisée sur une plaque de microtitrage (titre en anticorps 5 à 10 fois supérieur), l'immunisation génique offre l'avantage de produire des anticorps dirigés contre la conformation native de la PrPc humaine exprimée à la surface des cellules (50 à 70% de cellules fluorescentes au lieu de 25% lorsque les cellules sont incubées avec des anticorps obtenus par immunisation protéique). Il est à noter que les deux adjuvants utilisés, IFA et Alum, n'offrent pas le même niveau de réponse en anticorps spécifiques. Des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre si l'Alum permet une meilleure stimulation de la réponse immunitaire en général ou si les meilleurs résultats obtenus pour cet adjuvant sont dus à une orientation de la réponse immunitaire de type Th2 plus marquée que l'IFA.

Nous avons montré précédemment que la fusion d'une séquence codant un épitope T « universel » à celle d'une protéine faiblement immunogène potentialisait la réponse en anticorps spécifiques (Tymciu *et al.*, 2004). Cependant, dans ce travail de thèse, l'utilisation comme immunogène d'un vecteur d'expression eucaryote codant la protéine prion humaine fusionnée à ce même épitope T « universel » ne semble pas augmenter significativement la réponse humorale spécifiquement dirigée contre cette protéine prion d'intérêt. Il semblerait donc que les 10% de différences de séquence entre la protéine prion humaine et murine suffisent à la présence d'épitopes T, indispensables à la stimulation d'une réponse anticorps. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Andrievskaia *et al.* qui ont produit des anticorps dirigés contre la protéine prion bovine recombinante dans plusieurs souches de souris (Andrievskaia *et al.*, 2006).

Par ailleurs, il semblerait que ce soit la quantité en protéine prion humaine correctement conformée qui soit à la base d'une forte réponse en anticorps dirigés contre la conformation native de cette protéine. En effet, en comparant les différents protocoles d'immunisation génique, on observe une corrélation entre le niveau d'expression de la protéine d'intérêt *in vivo* et la réponse en anticorps spécifiquement dirigés contre la

conformation native de la PrPc humaine. Il est vrai que nous avons quantifié l'expression de la protéine prion humaine *in vivo* par un dosage immunométrique (dans lequel la conformation de la PrPc pourrait être altéré) et que nous n'avons pas analysé la proportion en protéines correctement conformées. Mais, il est intéressant de noter que malgré des injections de quantités importantes (20µg) en protéine prion humaine recombinante, les protocoles d'immunisation protéique ne permettent pas de produire en grande quantité des anticorps possédant la spécificité recherchée.

Ainsi, cette étude montre l'intérêt de l'immunisation génique, en général, et celui de l'électrotransfert *in vivo* de l'ADN, en particulier, pour générer des anticorps dirigés contre la conformation native de la protéine prion humaine chez des souris de type sauvage. En effet, en augmentant le niveau de transfection des cellules par l'ADN d'intérêt, ce protocole a permis d'augmenter considérablement le niveau d'expression de la protéine d'intérêt *in vivo*. L'électrotransfert *in vivo* apparaît donc comme une technique simple et efficace pour produire de nouveaux outils pour l'immunothérapie passive chez l'homme.

### **III.2 Immunothérapie active : vers un protocole vaccinal...**

Depuis ces cinq dernières années, de nombreuses équipes ont testé l'effet protecteur induit par des protocoles d'immunothérapie active contre les maladies à prions (Bade and Frey, 2007). Toutefois, induire une réponse immunitaire anti-PrP protectrice *in vivo* chez des souris de type sauvage constitue toujours un véritable défi en raison de la tolérance naturelle de l'hôte pour la PrPc, protéine ubiquiste à la fois dans les compartiments neuronaux et extraneuronaux. En effet, de nombreuses études réalisées chez des souris de type sauvage et utilisant comme immunogène, diverses formes de PrPc murine recombinante (peptides ou protéine entière) conjuguées à une variété d'adjuvants n'ont pas permis la production d'anticorps présentant une activité thérapeutique intéressante. En effet, malgré la stimulation d'une forte réponse immunitaire humorale dirigée contre la PrPc recombinante, ces anticorps n'étaient pas capables de reconnaître la conformation native de la PrPc exprimée à la surface des cellules, condition nécessaire pour exercer un effet thérapeutique.

L'objectif de cette étude est d'essayer de rompre la tolérance immunitaire de façon à permettre la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de la PrPc endogène chez des souris de type sauvage. Notre stratégie est, d'une part, l'utilisation de l'immunisation génique pour favoriser la génération d'anticorps dirigés contre la conformation native de l'antigène, et d'autre part, l'utilisation comme immunogène d'une protéine hétérologue (la protéine prion humaine) pour tenter de rompre la tolérance immunitaire, comme le suggère une étude récente (Ishibashi *et al.*, 2006). Dans l'étude précédente, nous avons pu montrer que l'immunisation génique consistant à injecter l'ADNc de la protéine prion humaine favorisait la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de cette-dernière. Cependant, les anticorps que nous avons obtenus après 6 semaines d'immunisation étaient incapables de reconnaître la PrPc murine. Nous avons donc continué ce protocole d'électrotransfert *in vivo* pour essayer de mettre en évidence une probable réaction croisée de ces anticorps avec la PrPc endogène. entre la réponse humorale dirigée contre la protéine prion humaine et celle dirigée contre la protéine prion murine endogène. Nous avons également analysé la

durée, la mémoire et l'orientation de la réponse immunitaire tout au long de la période d'immunisation (36 semaines).

### **III.2.1 Rupture de la tolérance immunitaire pour la PrPc murine par électrotransfert *in vivo* de l'ADN codant la protéine prion humaine**

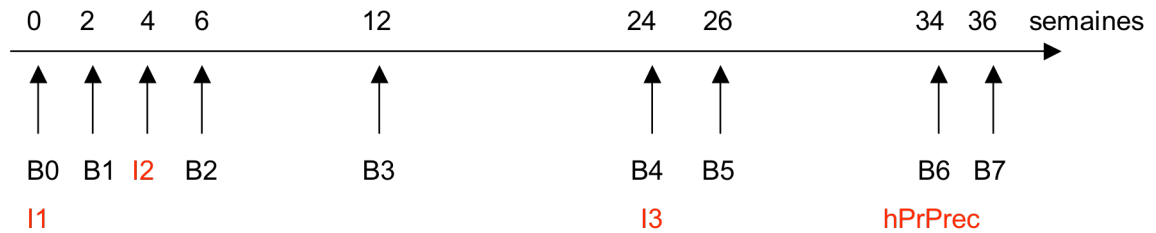
#### **III.2.1.1 Description du protocole d'immunisation**

Le protocole d'immunisation s'étend sur 36 semaines (Figure 56).

De nombreuses études ont montré l'avantage de combiner différents modes d'immunisation. Ainsi, la combinaison de deux protocoles d'immunisation permettrait la potentialisation de la réponse immunitaire induite par ces protocoles lorsqu'ils sont réalisés séparément (Degano *et al.*, 1999 ; Robinson *et al.*, 1999 ; Estcourt *et al.*, 2002 ; Matano *et al.*, 2001). Notamment, initier la réponse immunitaire par immunisation génique puis la restimuler par une immunisation protéique semble augmenter le titre en anticorps spécifiques (Barnett *et al.*, 1997 ; Mossman *et al.*, 2004). Ainsi, le protocole d'immunisation repose sur trois injections intramusculaires d'ADN codant la protéine prion humaine sécrétée et fusionnée ou non au fragment de la toxine tétanique 829-844 suivi d'un choc électrique aux semaines 0, 4 et 24 et suivies d'une injection intrapéritonéale de 80µg de protéine humaine recombinante conjuguée à l'IFA à la semaine 34.

Des saignées effectuées aux semaines 0, 2, 6, 12, 24, 26, 34 et 36 sont réalisées pour permettre le suivi de la réponse immunitaire.





I1, I2 et I3 représentent les injections intramusculaires des vecteurs d'expression eucaryote p3-PrP1-229 ou p3-PrP1-229-TT suivi d'une électroporation *in vivo* (200V/cm, 20ms, 8 impulsions, 1Hz). B0 représente la saignée préimmune et B1-B7 les saignées immunes. hPrPrec représente l'injection intrapéritonéale de 80µg de protéine humaine recombinante conjuguée à l'IFA.

Figure 56 : Vers un protocole vaccinal... : description du protocole d'immunisation.

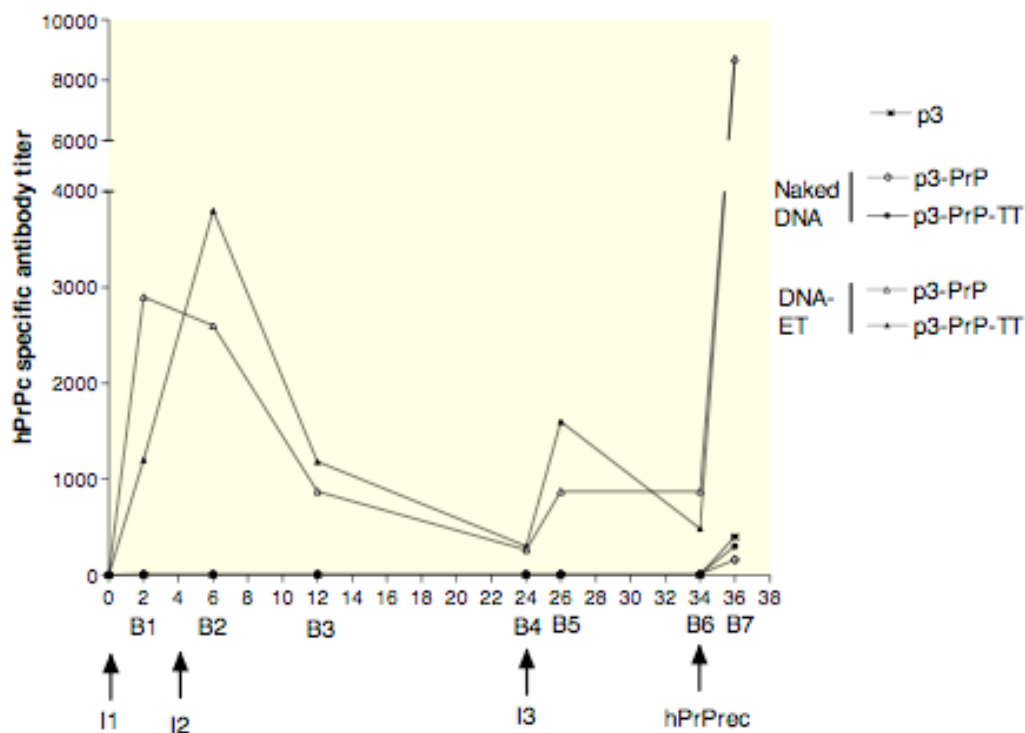
### III.2.1.2 Suivi de la réponse immunitaire humorale dirigée contre la protéine prion humaine.

La vaccination ou immunothérapie active constitue un moyen préventif ou thérapeutique fondamental contre de nombreux pathogènes. Son principe est basé sur l'administration à un être vivant d'un principe actif capable d'induire une immunité spécifique vis-à-vis d'un agent pathogène, ainsi qu'une mémoire immunitaire susceptible d'amplifier rapidement la réponse immune. L'immunité active engendrée est plus ou moins durable en fonction des vaccins, ce qui impose des injections de rappels afin que le taux en anticorps spécifiques soit toujours suffisant. Il est donc intéressant d'étudier dans le cadre d'un protocole vaccinal la durée de la réponse en anticorps ainsi que la stimulation de la mémoire immunitaire spécifique.

#### III.2.1.2.1 Durée de la réponse

La Figure 57 représente les titres en anticorps dirigés contre la protéine prion humaine au cours du protocole d'immunisation. Le protocole du dosage est décrit dans la première partie des résultats (voir le paragraphe p128).

D'après la Figure 57 et comme nous l'avons décrit dans la première partie des résultats, quel que soit le vecteur d'expression eucaryote utilisé, l'électrotransfert *in vivo* (DNA-ET) amplifie la réponse immunitaire humorale spécifique par comparaison avec l'immunisation par ADN nu (Naked DNA). De plus, des anticorps spécifiquement dirigés contre la protéine prion humaine sont toujours détectés dans le sérum 20 semaines après la dernière injection d'ADN (titre de l'ordre de 500 à la semaine 24 alors que le dernier rappel a été effectué à la semaine 4). Ainsi, l'électrotransfert *in vivo* permet la stimulation d'une réponse immunitaire humorale durable.



La PrPc humaine recombinante est immobilisée sur des plaques de microtitrage 96-puits. Différentes dilutions des saignées poolées (de 1/10 à 1/78125) sont incubées une nuit à 4°C. L'éventuelle fixation d'anticorps sur la phase solide est révélée par un anticorps de révélation anti-souris couplé à l'AChE.

Figure 57 : Titre en anticorps dirigés contre la PrPc humaine en fonction des semaines au cours du protocole vaccinal

III.2.1.2.2 Mémoire immunitaire

→ **Notion de mémoire immunitaire**

La prolifération sélective de lymphocytes qui mène à la formation de clones de cellules effectrices contre un antigène constitue la réaction immunitaire primaire. Entre l'exposition à l'antigène et la production maximale de cellules effectrices, il y a un délai de 5 à 10 jours (temps nécessaire à la différenciation des lymphocytes activés). Si l'organisme rencontre le même antigène quelque temps plus tard, la réaction se produit plus vite (3 à 5 jours) et plus longtemps : c'est la réaction immunitaire secondaire (Figure 58). Elle est le résultat de la mémoire immunitaire qui repose sur les cellules mémoires élaborées en même temps que les lymphocytes effecteurs à vie courte. Au cours de la réponse primaire, les cellules mémoires ne sont pas actives mais elles survivent plus longtemps et prolifèrent rapidement lors d'une deuxième exposition.

Propriété	Réponse primaire	Réponse secondaire
Cellule B répondeuse	Cellule B naïve	Cellule B mémoire
Période de latence	4-7 jours	3-5 jours
Pic de la réponse	≥10 jours	3-5 jours
Amplitude du pic de réponse	variable	100 à 1000 plus forte que ds la réponse primaire
Isotype produit	IgM	IgG
Affinité de l'anticorps	Faible	Elevée

Figure 58 : Comparaison entre la réponse humorale primaire et secondaire

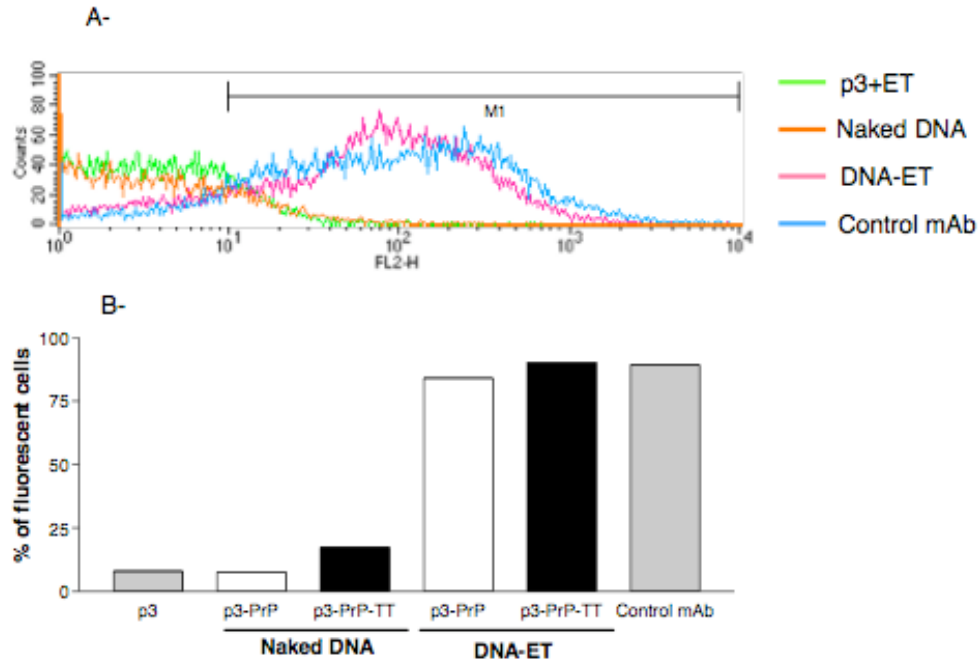
**→ Résultats obtenus**

D'après la Figure 57, deux semaines après l'injection intrapéritonéale de la protéine prion humaine recombinante (semaine 36), nous observons une augmentation importante du titre en anticorps dirigés contre la PrPc humaine dans le lot de souris immunisées par électrotransfert *in vivo* (DNA-ET), atteignant 1/10000. Toutefois, la même injection en protéine recombinante réalisée dans les lots de souris immunisées par ADN nu ou par le vecteur vide (Naked DNA ou p3) n'induit pas une telle augmentation du titre en anticorps (titre de l'ordre de 1/400). Ainsi, l'augmentation rapide du titre en anticorps dans le sérum des souris immunisées par électrotransfert *in vivo* reflète le déclenchement d'une réponse immunitaire secondaire laissant supposer la stimulation d'une mémoire immunitaire spécifique induite par les injections d'ADN au préalable.

De plus, nous avons testé ces saignées tardives (B7) pour leur capacité à reconnaître la PrPc humaine native exprimée à la surface des cellules par cytométrie en flux. Le protocole est décrit dans la première partie des résultats (1.2.2.3. *Suivi de la réponse immunitaire*). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 59.

D'après la Figure 59A, on observe un déplacement important de la fluorescence vers la droite avec le pool de saignées du lot de souris immunisées par électrotransfert *in vivo* (DNA-ET). En effet, le pourcentage de cellules fluorescentes atteint 90%. Il est à noter que ce pourcentage est du même ordre de grandeur que celui obtenu après incubation des cellules avec un anticorps monoclonal anti-PrPc obtenu par immunisation de souris invalidées pour le gène *Prnp*, SAF34, à 50nM (Figure 59B). De plus, contrairement aux lots de souris immunisées par ADN nu ou par le vecteur vide, l'injection de la protéine prion humaine recombinante chez les souris immunisées par électrotransfert *in vivo* stimule la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de la PrPc humaine. En effet, le pourcentage de cellules fluorescentes passe de 70% pour le pool de saignées B2 (Figure 55) à 90% pour le pool de saignées B7 (Figure 59B).

Ainsi, l'électrotransfert *in vivo* permet la stimulation d'une mémoire immunitaire spécifiquement dirigée contre la conformation native de la PrPc humaine.



Les cellules HEK surexprimant la PrPc humaine sont incubées 2h en présence du pool de saignées B7 de chaque protocole. Control mAb : incubation pendant 2h avec l'anticorps monoclonal anti-PrPc, SAF34, à 50nM. La fixation éventuelle d'anticorps à la surface cellulaire est mise en évidence par un anticorps de révélation anti-souris couplé à la phycoérytrine.

A- les déplacements de fluorescence obtenus en incubant les cellules avec le pool de saignées B7 immunisées par le vecteur p3-PrP1-229 puis suivi d'une stimulation par la PrPc humaine recombinante.

B- le pourcentage de cellules fluorescentes observé en fonction du protocole d'immunisation génique.

Figure 59 :Reconnaissance de la PrPc humaine native exprimée à la surface des cellules après une stimulation par la protéine recombinante

### III.2.1.2.3 Orientation de la réponse

#### → Généralités sur l'orientation de la réponse immunitaire humorale

Les premiers travaux de Mossman (1986) ont permis de distinguer, chez la souris, deux types de lymphocytes T auxiliaires ( $CD4^+$ ) nommés Th1 et Th2 qui se caractérisent par leur profil de sécrétion de cytokines (Mossman and Coffman, 1989) (Figure 60). Cette classification a pu être étendue aux lymphocytes T humains. Les cellules Th1

produisent l'IL2, et l'IFN $\gamma$  et la lymphotoxine (ou TNF $\beta$ ), alors que les cellules Th2 sécrètent l'IL4, l'IL5, l'IL6 et l'IL13. Ces deux types de lymphocytes dérivent d'une population cellulaire CD4<sup>+</sup> appelée Th0. Les cellules Th1 contrôlent la réponse cellulaire, telle que la réponse d'hypersensibilité retardée et certaines réponses humorales. Les cellules Th2, de par leur capacité à produire de l'IL4, favorisent la réponse humorale, en particulier, la production des IgE dans les manifestations allergiques et les infections parasitaires. Ces deux types cellulaires sont impliqués dans la commutation de classe des lymphocytes B. Ainsi, les cellules Th1 favorisent la production d'IgG2a et les cellules Th2 celle d'IgG1 et d'IgE. La nature et le mode d'inoculation de l'antigène peuvent être déterminants dans la différenciation des lymphocytes T en Th1 ou Th2. Par exemple, les antigènes de nématodes et les allergènes permettent le développement de clones Th2, alors que ceux de *Mycobacterium tuberculosis* provoquent l'expansion de clones Th1. L'environnement en cytokine est également important. Ainsi, l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) favorise la différenciation des lymphocytes T CD4 en clones Th1 et inhibe le développement de la population Th2, alors que l'IL4 favorise la différenciation des clones Th2.

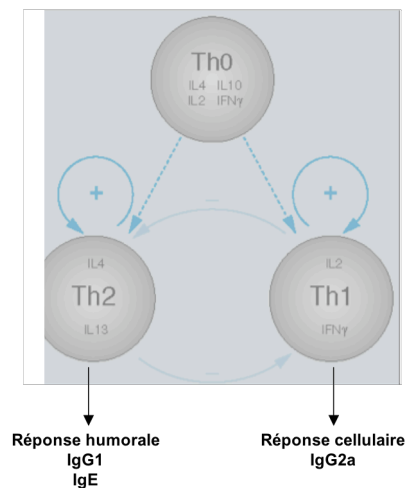


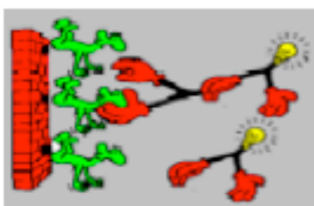
Figure 60 : Généralités sur l'orientation de la réponse immunitaire

**→ Résultats obtenus**

Pour avoir une idée de l'orientation de la réponse immunitaire, nous avons déterminé le titre en anticorps d'isotype IgG1 et IgG2a dirigés contre la protéine prion humaine dans les pools de saignées B7 selon le protocole suivant :

Protocole (Figure 61) :

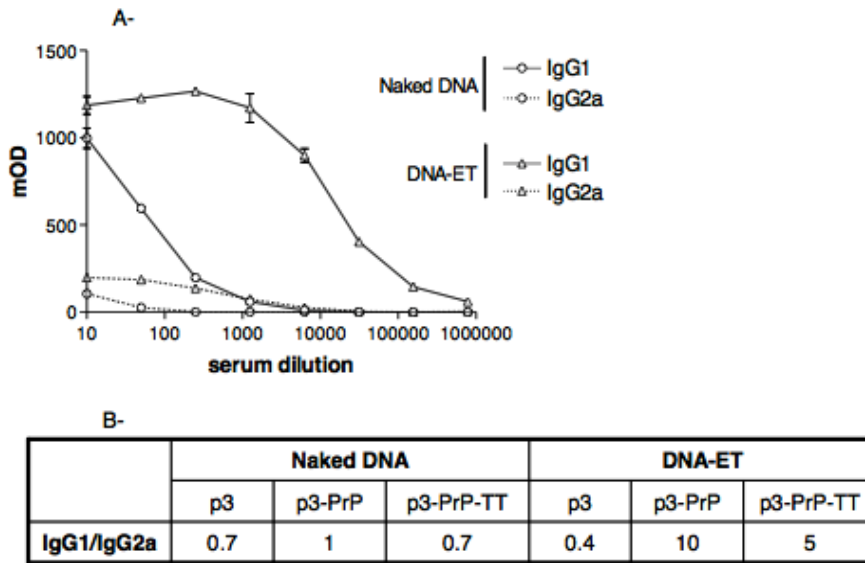
La protéine prion humaine recombinante, produite au laboratoire, à 10µg/ml en tampon phosphate 50mM est immobilisée sur la phase solide 96-puits (Immunoplate, Maxisorp, Nunc) par incubation une nuit à température ambiante, puis les sites non spécifiques sont saturés en BSA (tampon EIA : 0,1M tampon phosphate pH 7,4 contenant 0.1% de BSA, 0,15M NaCl et 0,01% d'azide de sodium). Les plaques sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. 100µl d'une gamme de dilution des différentes saignées en tampon EIA sont incubés une nuit à 4°C (des dilutions sériées de 5 en 5 sur 8 points en tampon EIA ; premier point : 1/10). Après 3 lavages, 100µl/puits d'un anticorps de révélation anti-souris dirigé spécifiquement contre les IgG1 ou les IgG2a (produits au laboratoire) couplé à l'acétylcholinestérase (AChE) à 2 unit/µl et 3 unit/µl en tampon EIA, respectivement, sont incubés pendant 2 heures à température ambiante. Après 6 lavages, l'activité de l'AChE est mesurée par la méthode colorimétrique d'Ellman, comme décrit précédemment (Grassi et al., 1989). La mesure de l'absorbance à 414nm à 1h permet d'évaluer directement la quantité en anticorps d'isotype IgG1 ou IgG2a spécifiquement dirigés contre la PrP humaine présente dans les différents échantillons testés.



Immobilisation de la PrPrec humaine (10µg/ml)  
 Incubation des saignées une nuit à 4°C  
 Incubation de l'anticorps secondaire anti-IgG1 ou anti-IgG2a 2h à RT

Figure 61 : Dosage immunométrique : suivi de l'orientation de la réponse immunitaire humorale dirigée contre la PrPc humaine.

D'après la Figure 62B, le ratio IgG1/IgG2a passe de 1 à 5-10 dans les saignées de souris immunisées par ADN nu (Naked DNA) et par électrotransfert *in vivo* (DNA-ET), respectivement. Ainsi, l'électrotransfert *in vivo* semble favoriser, dans les conditions expérimentales utilisées, l'orientation immunitaire vers une réponse humorale de type Th2.



La PrPc humaine recombinante est immobilisée sur des plaques de microtitrages 96-puits. Différentes dilutions des saignées B7 (effectuées après la restimulation protéique) (de 1/10 à 1/78125) sont incubées une nuit à 4°C. L'éventuelle fixation d'anticorps sur la phase solide est révélée par un anticorps de révélation anti-IgG1 ou anti-IgG2a de souris couplé à l'ACHé.

Figure 62 : Orientation de la réponse humorale dirigée contre la PrPc humaine.

### III.2.1.3 Rupture de la tolérance immunitaire

L'objectif de ce protocole d'immunisation à long terme est une production en anticorps dirigés contre la protéine prion humaine suffisamment importante pour permettre éventuellement la mise en évidence d'une réaction croisée avec la protéine prion murine endogène. Le pool de saignées B2 (2 semaines après le premier rappel en ADN) n'a pas permis la détection d'une telle réaction croisée quel que soit le protocole d'immunisation génique utilisé. Cependant, d'après la Figure 57 et la Figure 59, la



stimulation de la réponse immunitaire par l'injection d'une quantité importante (80µg) en protéine prion humaine recombinante a enrichi les saignées en anticorps d'intérêt. Ainsi, ces saignées B7 ont été testées pour leur capacité à lier la protéine prion murine exprimée à la surface des cellules par cytométrie en flux.

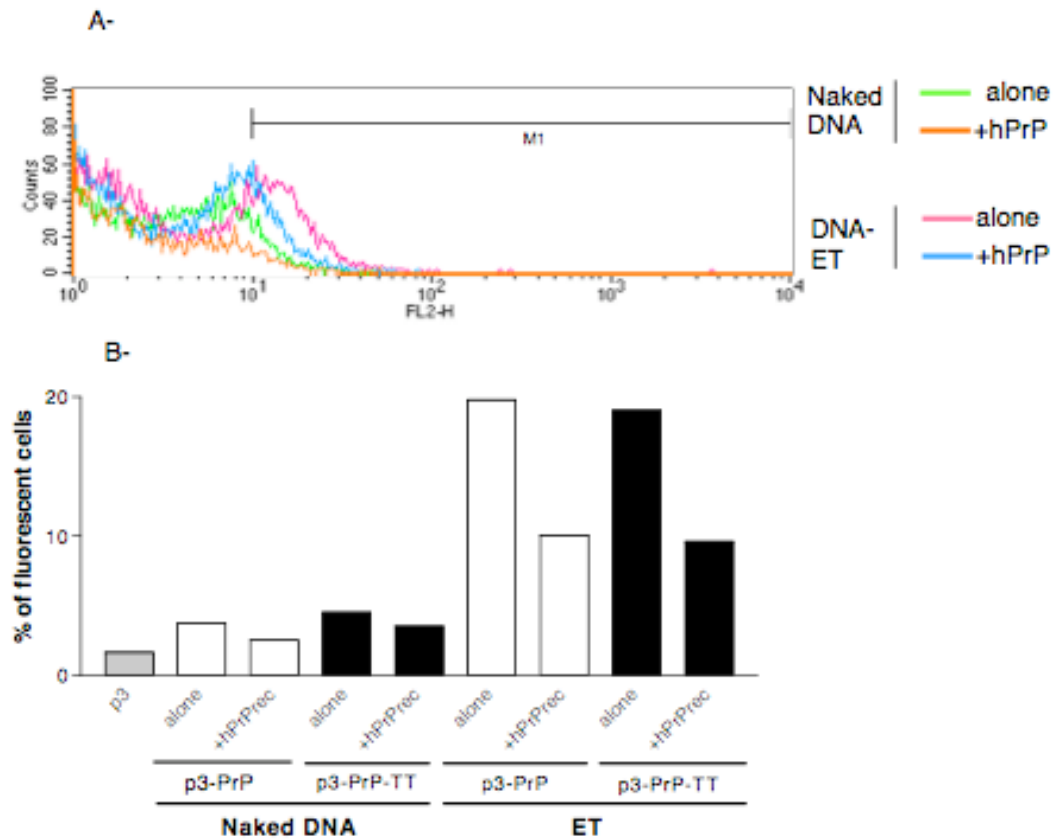
Les résultats sont reportés dans la Figure 63.

Protocole :

*Des cellules N2a surexprimant de façon stable la PrP murine cultivées à confluence sont lavées en PBS puis décollées au moyen d'une solution de dissociation sans trypsine (Sigma) 5min à 37°C afin de ne pas dégrader la PrP en surface des cellules. Les cellules sont centrifugées à 1500rpm à 4°C pendant 5 min. Après deux lavages en PBS, les cellules sont incubées 2h à 4°C avec 100µl de tampon PBS/0,1% BSA/20% de sérum normal de chèvre contenant les pools de saignées à la dilution 1/100. La spécificité de l'éventuelle fixation est mise en évidence par une incubation au préalable des saignées avec de la PrPc humaine recombinante (10µg/ml) immobilisée sur une plaque de microtitrage une nuit à 4°C. Après deux lavages en PBS/0,1% BSA/1% de sérum normal de chèvre, les cellules sont incubées 1h à 4°C dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire (phycoerythrin-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch). Après deux lavages en PBS/0,1% BSA/1% de sérum normal de chèvre, elles sont reprises dans 500µl de Facs Flow (Becton Dickinson). La fluorescence de 10 000 cellules/tube est mesurée à l'aide du FACS-Calibur flow cytofluoromètre (Becton Dickinson). L'iodure de propidium est utilisé pour détecter les cellules endommagées dont on ne tient pas compte pour l'analyse.*

L'incubation des cellules N2a avec les saignées B7 provenant du protocole d'électrotransfert *in vivo* (DNA-ET) met en avant un déplacement de la fluorescence vers la droite (Figure 63A). Ainsi, on observe que 20% des cellules présentent un niveau de fluorescence supérieur à  $10^1$  (Figure 63B). La spécificité de ce marquage a été contrôlée par une incubation au préalable des saignées avec la protéine prion humaine permettant de réduire de 50% le pourcentage de cellules fluorescentes. Même si le protocole d'immunisation génique avec l'ADN nu (Naked DNA) semble mettre en évidence un

faible marquage spécifique des cellules N2a (de l'ordre de 4% de cellules fluorescentes), ces résultats suggèrent fortement l'intérêt de l'immunisation génique et plus particulièrement de l'électrotransfert *in vivo* pour produire des anticorps dirigés à la fois contre la protéine humaine et la protéine prion murine endogène chez des souris de type sauvage.



Les cellules N2a surexprimant la PrPc murine sont incubées 2h en présence du pool de saignées B7 de chaque protocole d'immunisation génique avec (+hPrP) ou sans (alone) incubation préalable avec la PrP humaine recombinante immobilisée sur une plaque de microtitrage. La fixation éventuelle d'anticorps à la surface cellulaire est mise en évidence par un anticorps de révélation anti-souris couplé à la phycoérytrine.

A- Les déplacements de fluorescence obtenus en incubant les cellules avec le pool de saignées B7 immunisées par le vecteur p3-PrP1-229 puis suivi d'une stimulation par la PrPc humaine recombinante.

B- Le pourcentage de cellules fluorescentes observé en fonction du protocole d'immunisation génique.

Figure 63 : Reconnaissance de la PrPc murine native exprimée à la surface des cellules après une restimulation par la protéine humaine recombinante.

### III.2.2 Expériences complémentaires

Les résultats décrits ci-dessus montrent l'intérêt de l'électrotransfert *in vivo* dans le cadre d'une immunothérapie active contre les maladies à prions. Pour conforter ces résultats, nous avons, par la suite, étudié la réponse immunitaire humorale dirigée contre la protéine humaine et l'éventuelle réaction croisée entre cette protéine et la protéine prion murine endogène suite à différents protocoles vaccinaux plus courts.

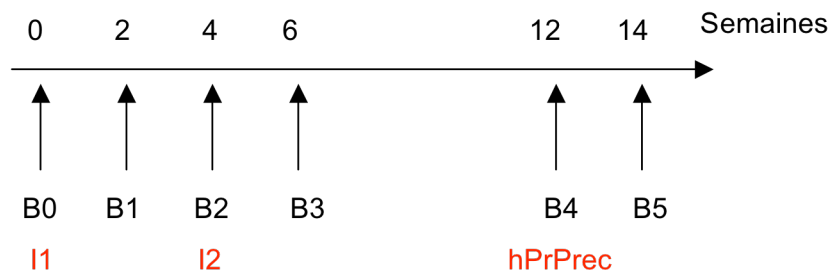
#### III.2.2.1 Description des protocoles d'immunisation

Les protocoles d'immunisation s'étendent sur 14 semaines (Figure 64).

Les protocoles d'immunisation comportent :

- 1) aux semaines 0 et 4 : deux injections intramusculaires d'ADN (codant la PrPc humaine sécrétée) formulé avec le poloxamine 304 (BC304) (DNA-BC) ou deux injections intrapéritonéales de 20µg de protéine prion humaine recombinante conjuguées à l'IFA (Protein-IFA) ou à l'Alum (Protein-Alum).
- 2) à la semaine 12 : une injection intrapéritonéale de 80µg de protéine humaine recombinante conjuguée à l'IFA (Protein-IFA) ou l'Alum (DNA-BC et Protein-Alum).

Des saignées effectuées aux semaines 0, 2, 4, 6, 12 et 14 sont réalisées pour permettre le suivi de la réponse immunitaire.



I1 et I2 représentent les deux injections d'immunogène selon le protocole. hPrPrec représente la restimulation par 80µg de protéine humaine recombinante conjuguée à l'IFA (Protein-IFA) ou l'Alum (DNA-BC et Protein-Alum). B0 représente la saignée pré-immune ; B1-B5 les saignées immunes.

Figure 64 : Description du protocole d'immunisation contrôlée

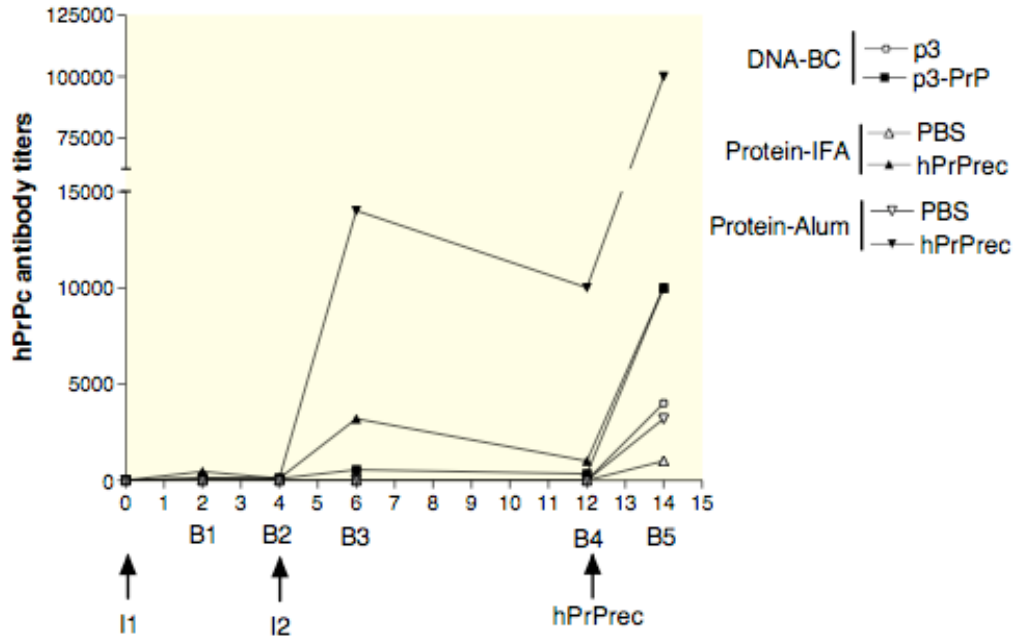
### **III.2.2.2 Suivi de la réponse immunitaire humorale dirigée contre la protéine prion humaine.**

#### *III.2.2.2.1 Amplitude et mémoire de la réponse.*

La Figure 65 représente les titres en anticorps dirigés contre la protéine prion humaine au cours des différents protocoles d'immunisation. Le protocole du dosage est décrit dans la première partie des résultats (*1.2.2.3. Suivi de la réponse immunitaire*).

D'après la Figure 65 et comme nous l'avons décrit précédemment, les deux protocoles d'immunisation protéique permettent une forte réponse humorale dirigée contre la protéine prion humaine. Cette réponse est notamment supérieure à celle observée après une immunisation d'ADN formulé avec le poloxamine BC304. En effet, les titres en anticorps spécifiques obtenus deux semaines après la deuxième injection (B3) sont 6 à 30 fois supérieurs selon le protocole d'immunisation protéique utilisé.

Une immunisation protéique conjuguée à l'alum semble générer une plus forte réponse en anticorps qu'une immunisation protéique conjuguée à l'IFA. D'une part, lors d'une unique immunisation avec 80 $\mu$ g de protéine prion humaine recombinante conjuguée à l'alum (DNA-BC p3 B5 et Protein-Alum PBS B5), on observe un titre en anticorps spécifiques de l'ordre de 4000, comparable au titre obtenu après deux injections de 20 $\mu$ g de protéine conjugué à l'IFA (Protein-IFA hPrPrec B3). D'autre part, lors de primo-injections de 20 $\mu$ g de protéine prion humaine recombinante, ce protocole engendre une réponse en anticorps 5 à 30 fois supérieure (B3) à celle obtenue avec les protocoles Protein-IFA et DNA-BC, respectivement. De plus, un titre important (10000) en anticorps spécifique est encore mis en évidence 6 semaines après la dernière injection (B4). Cette réponse immunitaire durable est également accompagnée d'une stimulation importante de la mémoire immunitaire (Protein-Alum hPrPrec B5).



La PrPc humaine recombinante est immobilisée sur des plaques de microtitrage 96-puits. Différentes dilutions des saignées poolées (de 1/10 à 1/78125) sont incubées une nuit à 4°C. L'éventuelle fixation d'anticorps sur la phase solide est révélée par un anticorps de révélation anti-souris couplé à l'AChE.

Figure 65 : Titre en anticorps dirigés contre la PrPc humaine en fonction des semaines

### III.2.2.2.2 Orientation de la réponse

Nous avons déterminé le titre en anticorps d'isotype IgG1 et IgG2a dirigés contre la protéine prion humaine dans les pools de saignées B5 de chaque protocole d'immunisation selon le protocole décrit précédemment. Les résultats sont reportés dans le Tableau 13.

D'après le Tableau 13, le rapport IgG1/IgG2a est de l'ordre de 100 pour les saignées de souris immunisées par le protocole Protein-alum par comparaison avec 2 pour les saignées de souris immunisées par le protocole Protein-IFA. Ainsi, nos résultats montrent, en accord avec la littérature, que l'utilisation de l'alum comme adjuvant pour une immunisation protéique, contrairement à l'IFA, favorise l'orientation de la réponse humorale de type Th2. En effet,

De plus, cette observation est confirmée par l'étude de l'orientation de la réponse humorale induite par le protocole DNA-BC. Les anticorps spécifiques produits par les souris immunisées au préalable par le vecteur vide formulé avec le BC304 puis restimulées par une quantité importante en protéine humaine recombinante conjuguée à l'Alum (DNA-BC p3 B5) sont essentiellement d'isotype IgG1 (IgG1/IgG2a de l'ordre de 100). Cependant, lorsque la restimulation protéique est précédée par une immunisation spécifique avec le vecteur p3-PrP, ce rapport est diminué (IgG1/IgG2a de l'ordre de 10). Il semblerait donc que l'injection d'ADN codant la protéine d'intérêt formulé avec le poloxamine BC304 induise préférentiellement une réponse immunitaire de type Th1.

	DNA-BC		Protein-IFA		Protein-Alum	
	p3	p3-PrP	PBS	hPrPrec	PBS	hPrPrec
<b>IgG1/IgG2a</b>	100	10	nd	2	100	100

La PrPc humaine recombinante est immobilisée sur des plaques de microtitrages 96-puits. Différentes dilutions des saignées B5 (effectuées après la restimulation protéique) (de 1/10 à 1/78125) sont incubées une nuit à 4°C. L'éventuelle fixation d'anticorps sur la phase solide est révélée par un anticorps de révélation anti-IgG1 ou anti-IgG2a de souris couplé à l'ACHe.

nd : non déterminé car les titres en anticorps d'isotypes IgG1 ou IgG2a sont proches de 0.

Tableau 13 : Orientation de la réponse humorale dirigée contre la PrPc humaine.

### III.2.2.3 Rupture de la tolérance immunitaire

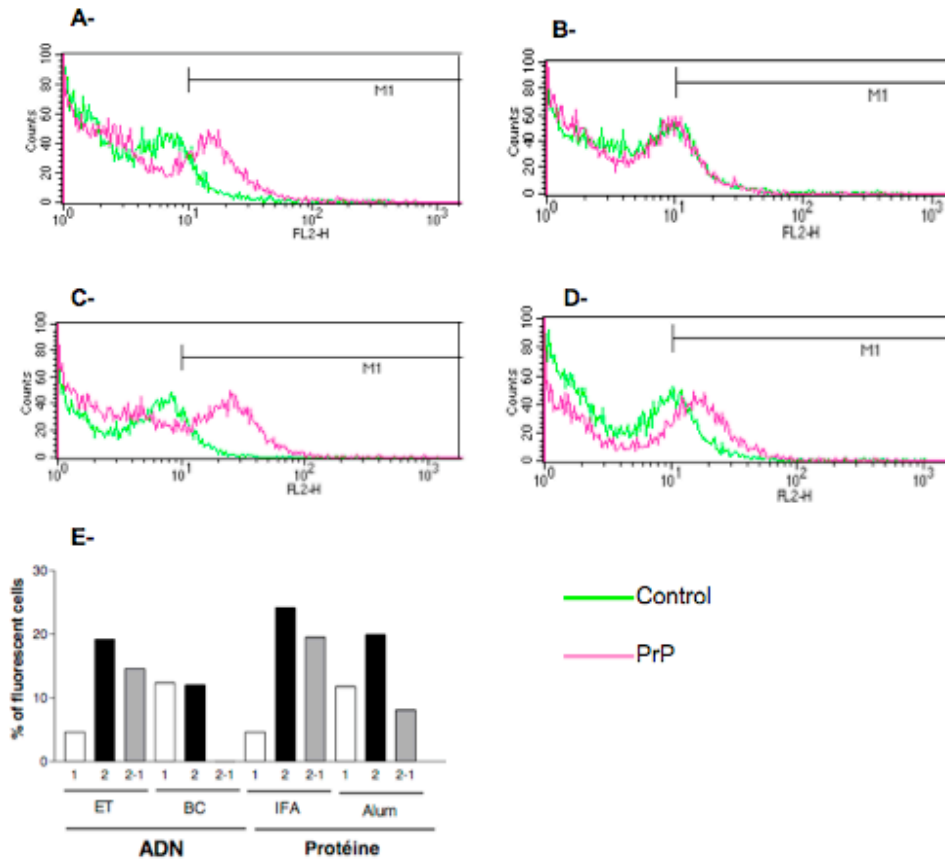
Pour essayer de mettre en évidence une réaction croisée entre la reconnaissance de la protéine prion humaine et de la protéine prion murine endogène par les anticorps générés, les saignées B5 ont été testées pour leur capacité à lier la protéine prion murine exprimée à la surface des cellules par cytométrie en flux selon le protocole décrit précédemment. Les résultats sont reportés dans la Figure 66.

On observe un déplacement de la fluorescence vers la droite pour les saignées des souris immunisées, après la restimulation protéique, avec le vecteur p3-PrP (immunisation génique) ou la protéine humaine recombinante (immunisation protéique) issues de tous les protocoles étudiés (Figure 66A-D, courbes roses). Le pourcentage de cellules fluorescentes est compris entre 12% et 24% selon le protocole d'immunisation

(Figure 66E, 2). Dans ces conditions expérimentales, la réaction croisée observée est la résultante de la stimulation de la réponse immunitaire induite à la fois par les primo-injections et la restimulation protéique.

Une restimulation protéique en alum faisant suite aux immunisations non spécifiques (Figure 66B et Figure 66D, courbes vertes) augmente la génération d'anticorps reconnaissant la protéine prion murine native par comparaison avec une restimulation en IFA (Figure 66A et Figure 66C, courbes vertes). En effet, le pourcentage de cellules fluorescentes est de 12% et 4%, respectivement (Figure 66E, 1). Or, dans ces conditions expérimentales, seule la restimulation protéique a pu engendrer une réponse immunitaire spécifique. Ces témoins nous permettent donc d'analyser la part de la réaction croisée induite par cette restimulation à elle seule qui est donc différente selon l'adjuvant utilisé.

En soustrayant la réaction croisée induite par la combinaison de primo-injections spécifiques et de la restimulation protéique (Figure 66E, 2) et celle induite par la restimulation protéique seule (Figure 66E, 1), on a donc une idée de la stimulation de la mémoire immunitaire spécifique induite par les primo-injections (Figure 66E, 2-1). Ainsi, il semblerait que, concernant les primo-injections, l'électrotransfert *in vivo* d'ADN et l'injection de protéine recombinante conjuguée à l'IFA soient les protocoles les plus prometteurs pour induire une stimulation importante de la mémoire immunitaire spécifique et ainsi permettre la production d'anticorps capables de reconnaître la PrPc murine native exprimée à la surface des cellules (Figure 66E, 2-1).



Les cellules N2a surexprimant la PrPc murine sont incubées 2h en présence du pool de saignées B5 de chaque protocole d'immunisation. La fixation éventuelle d'anticorps à la surface cellulaire est mise en évidence par un anticorps de révélation anti-souris couplé à la phycoérythrine.

*Control* (ou 1 pour E-) représente le pool de saignées B5 (ou B7 pour le protocole électrotransfert *in vivo*) de souris immunisées par le vecteur vide (pour les protocoles d'immunisation génique) ou du PBS (pour les protocoles d'immunisation protéique) suivi d'une restimulation par 80µg de protéine humaine recombinante.

*PrP* (ou 2 pour E-) représente le pool de saignées B5 (ou B7 pour le protocole électrotransfert *in vivo*) de souris immunisées par le vecteur p3-PrP (pour les protocoles d'immunisation génique) ou la protéine prion humaine recombinante (pour les protocoles d'immunisation protéique) suivi d'une restimulation par 80µg de protéine humaine recombinante.

A- Intensité de fluorescence pour le protocole DNA-ET.

B- Intensité de fluorescence pour le protocole DNA-BC.

C- Intensité de fluorescence pour le protocole Protein-IFA.

D- Intensité de fluorescence pour le protocole Protein-Alum.

E- Le pourcentage de cellules fluorescentes observé en fonction du protocole d'immunisation génique.

Figure 66 : Reconnaissance de la PrPc murine native exprimée à la surface des cellules après une restimulation par la protéine humaine recombinante.



### III.2.3 Discussion

Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives dont l'issue est toujours fatale. Il n'existe pas, actuellement, de traitements prophylactiques et/ou curatifs efficaces. Pour de nombreux agents pathogènes conventionnels, la vaccination est une méthode efficace pour contrôler l'infection. Toutefois, cette méthode thérapeutique est difficile à mettre en oeuvre, dans le cadre des maladies à prions, puisque l'organisme est tolérant vis à vis de la PrPc endogène, une molécule exprimée dans de nombreux tissus. Dans ce contexte, notre objectif était de développer un protocole d'immunisation permettant la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de la PrPc endogène chez des souris de type sauvage. Dans la première partie des résultats, nous avons mis en évidence l'intérêt de l'immunisation génique et plus particulièrement de l'électroporation *in vivo* pour produire des anticorps dirigés contre la conformation native de la protéine prion humaine. Toutefois, nous n'avons pas pu détecter d'anticorps capables de reconnaître, à la fois, la conformation native de notre immunogène et celle de la protéine prion murine endogène dans les sérums de souris immunisées selon le protocole d'électrotransfert *in vivo* et ce, deux semaines après la deuxième injection d'ADN. Ce protocole a donc été prolongé pour tenter d'augmenter le titre en anticorps dirigés contre la protéine prion humaine et ainsi pouvoir mettre en évidence une réaction croisée avec la protéine prion murine endogène.

Nos résultats montrent qu'une restimulation des souris immunisées par électrotransfert *in vivo* par une importante quantité (80µg) de protéine humaine recombinante permet une forte stimulation de la réponse humorale spécifique. Le titre en anticorps dirigés contre la protéine prion humaine est multiplié par 10, lorsque les souris sont immunisées au préalable par l'ADN codant la protéine d'intérêt. Ainsi, dans ces conditions expérimentales, ce titre atteint 10000 alors qu'il n'est que de 400 lorsque les souris sont immunisées au préalable par le vecteur vide. Ainsi, en accord avec la littérature, ces résultats confirment que la combinaison de différents modes d'immunisation a été décrite permet la potentialisation de la réponse immunitaire (Xing and Carters, 2007 ; Lu, 2006 ; Girard *et al.*, 2006 ; Gilbert *et al.*, 2006). De plus, dans le contexte des maladies à prions, il est important de noter que cette restimulation protéique

potentialise la réponse humorale dirigée contre la conformation native de notre immunogène. Or, nous avons montré dans la première partie des résultats que des immunisations protéiques de la protéine prion humaine recombinante ne permettaient pas la génération d'anticorps dirigés contre la conformation native de l'antigène. Une explication à cette potentialisation spécifique de la réponse immunitaire par la restimulation protéique est la stimulation, au préalable, de la mémoire immunitaire dirigée contre la conformation native de la PrPc humaine par l'électroporation *in vivo*.

Un autre volet de notre étude a été l'analyse de l'orientation de la réponse immunitaire. En effet, celle-ci a rarement été étudiée lors des nombreuses approches d'immunothérapie active dirigée contre les maladies à prions testées (voir pour revue Bade and Frey, 2007). Nous avons pu mettre en évidence une orientation différentielle selon le protocole étudié. Ainsi, l'électroporation *in vivo* d'ADN ainsi que l'immunisation protéique conjuguée à l'alum semblent favoriser la production d'anticorps spécifiques d'isotype IgG1 et par conséquent orienter la réponse immunitaire de type Th2. A contrario, l'injection d'ADN formulé au poloxamine BC304 et l'immunisation protéique conjuguée à l'IFA semblent favoriser la production d'anticorps spécifiques d'isotype IgG2a et par conséquent orienter la réponse immunitaire de type Th1. Or, dans le cadre des maladies à prions où l'antigène est une protéine ubiquiste, l'orientation de la réponse immunitaire vers un type Th2 peut être nécessaire pour limiter une réponse cellulaire dirigée contre de nombreuses cellules de l'organisme.

Cette étude confirme les travaux réalisés par Ishibashi *et al.* qui ont étudié l'intérêt d'une immunisation par une protéine hétérologue dans le cadre de l'immunothérapie active des maladies à prions (Ishibashi *et al.*, 2006). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la reconnaissance de la conformation native de la PrPc murine endogène par des anticorps dirigés contre la PrPc humaine chez des souris de type sauvage. D'une part, nos travaux démontrent, pour la première fois dans le cadre des maladies à prions, l'intérêt de l'immunisation génique et plus particulièrement l'électroporation *in vivo* comme protocole d'immunothérapie active pour générer des anticorps présentant des caractéristiques thérapeutiques intéressantes. D'autre part, ils confirment une hypothèse énoncée notamment par Heppner *et al.* (mais souvent controversée) que la tolérance immunitaire de l'hôte pour la PrPc est essentiellement due à une tolérance des lymphocytes T et non des lymphocytes B (Heppner *et al.*, 2001).

### **III.3 Travaux complémentaires : Étude de nanosphères In-Cell-Art sur l'expression de la PrPc humaine *in vivo*.**

Nous avons collaboré avec le docteur Bruno Pitard (co-fondateur de la société *In-Cell-Art* ) pour étudier la capacité de trois *nanosphères* à augmenter le niveau d'expression de la PrPc humaine *in vivo* par comparaison avec les différents protocoles d'immunisation génique étudiés.

Les travaux ont consisté à injecter dans les deux muscles tibiaux antérieurs de 4 souris C57Bl/6 âgées de 8 semaines, les deux vecteurs d'expression eucaryote p3-PrP1-229 et p3-PrP1-229-TT à 3 quantités différentes (10, 20 et 50µg) et formulés avec 3 nanosphères différentes (P1, P2 et P3). Sept jours après l'injection, les muscles tibiaux antérieurs et les rates sont prélevés et congelés dans l'azote liquide. Nous avons ensuite analysé le niveau de transfection des cellules par dosage de l'ADN plasmidique, le niveau de transcription par dosage de l'ARNm et le niveau d'expression de la PrPc humaine par dosage immunométrique dans les extraits de muscle et de rate. Ces résultats ont été comparés après injection des vecteurs par électrotransfert *in vivo* et ADN nu.

Comme nous l'avons exposé dans la première partie des résultats (1.2.2.2. *Suivi de l'expression de la PrPc humaine in vivo*), une des difficultés de la mise au point de ces dosages est la forte homologie de séquence entre la protéine prion humaine et murine (90%).

#### **III.3.1 Mise au point des dosages**

##### **III.3.1.1 Dosages de l'ADN et de l'ARNm spécifiques**

La présence d'ADN et ARN codant la protéine prion humaine dans les tissus a été mise en évidence par PCR et RT-PCR respectivement.

III.3.1.1.1 Choix des amorces et vérification leur fonctionnalité

La spécificité de ces deux dosages est basée sur le *choix des amorces*. La protéine prion humaine est codée par le plasmide injecté lors de l'immunisation. Ainsi, il y a une corrélation entre la présence du plasmide et le gène codant la protéine prion humaine dans les tissus. Nous avons donc choisi comme amorces (Figure 67) :

-pour l'amplification d'ADN : des séquences comprises dans le gène codant la  $\beta$ -lactamase (DNAfor : 5'-CGTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCG-3' et DNArev : 5'-GACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGC-3'). Il s'agit d'un gène spécifiquement bactérien dont la protéine confère à la cellule qui l'exprime une résistance à l'ampicilline.

-pour l'amplification d'ARN : des séquences permettant l'amplification du transcrite de la PrPc humaine et comprenant également une région transcrite spécifique du vecteur eucaryote utilisé (mRNAfor : 5'-GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGC-3' et mRNArev : 5'-GACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGC-3').

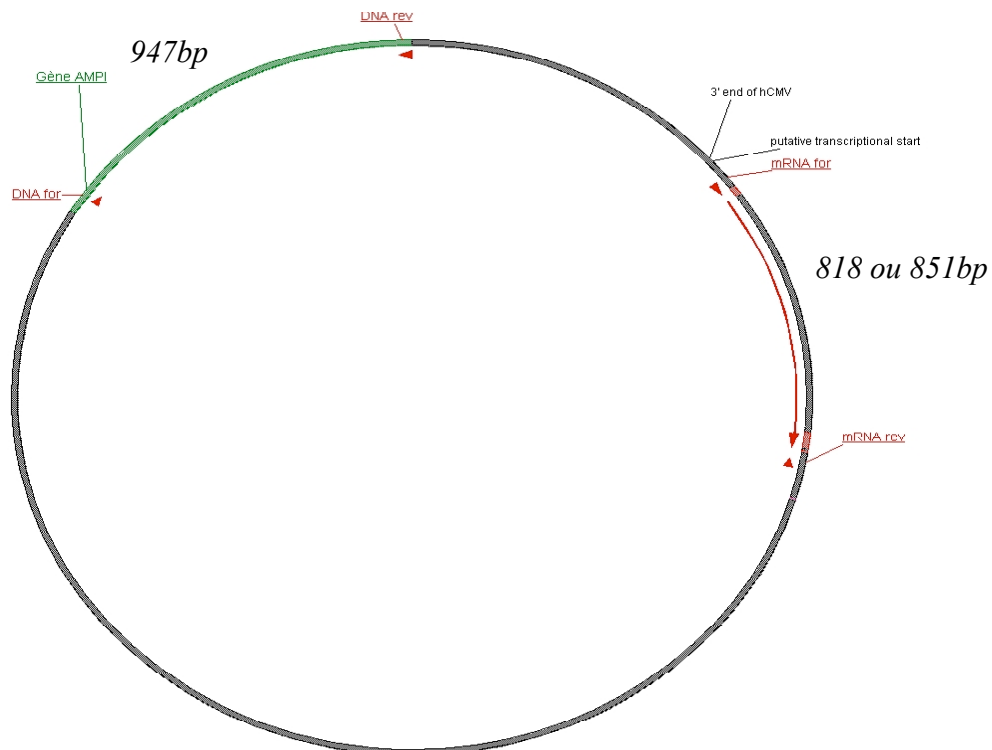
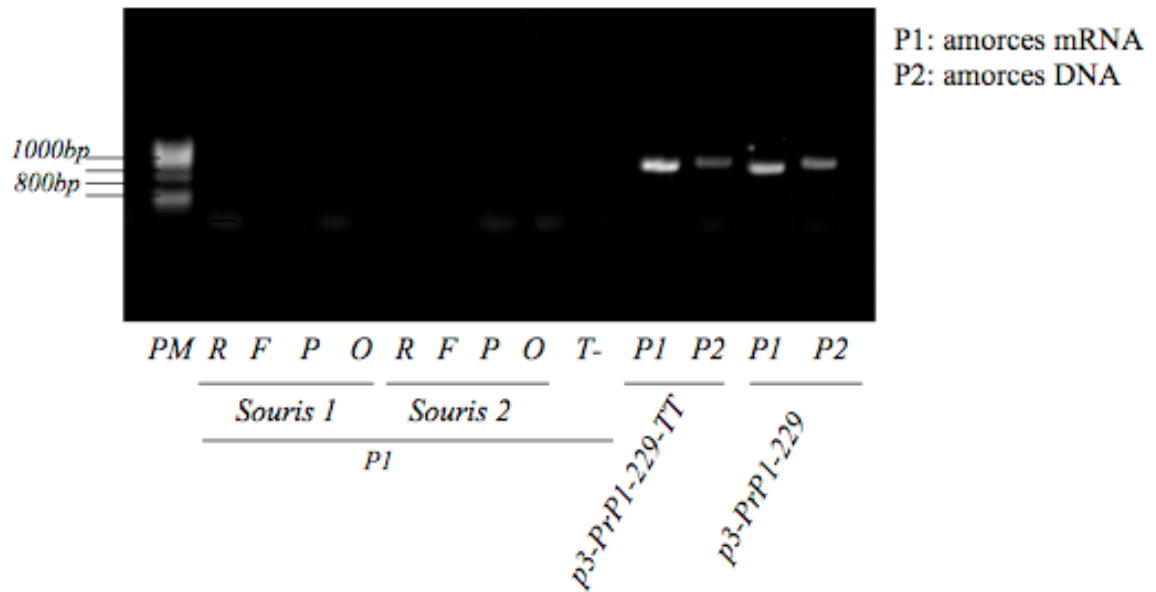


Figure 67 : Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN et de l'ARN de la PrPc humaine

La fonctionnalité de ces amorces a été vérifiée par l'amplification des plasmides p3-PrP1-229 et p3-PrP1-229-TT (Figure 68). Quant à la spécificité du couple d'amorce mRNAfor-mRNArev, elle a été contrôlée sur des extraits d'ARN de tissus (rate, foie, pancréas, ovaire) de souris de type sauvage C57Bl/6 n'ayant pas reçu d'injection de plasmide. Les protocoles d'extraction d'ADN et d'ARN tissulaire ainsi que de PCR et de RT-PCR sont reportés dans l'annexe 4. Les protocoles de PCR et de RT-PCR sont exposés ci-dessous.



PM : poids moléculaire (100pb, Sigma) ; R :rate ; F :foie ; P :pancréas ; O :ovaire ; T- :témoin négatif de PCR ne contenant pas d'ADN

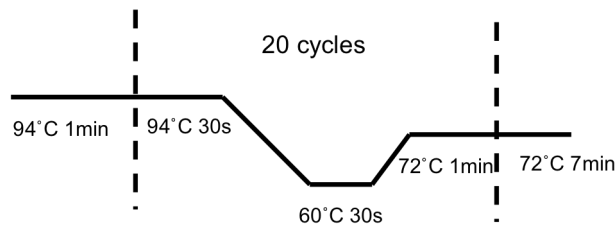
Figure 68 : Fonctionnalité et spécificité des amorces utilisées pour la détection d'ADN et d'ARN de la PrPc humaine *in vivo*

D'après la Figure 68, les produits PCR résultant de l'amplification des deux vecteurs (p3-PrP1-229 et p3-PrP1-229-TT) par les deux couples d'amorces étudiés (P1 :mRNAfor-mRNArev et P2 :DNAfor-DNArev) migrent au poids moléculaire attendu soit 818pb (p3-PrP1-229) ou 851pb (p3-PrP1-229-TT) pour le couple P1 et 947pb pour le couple P2. Les deux couples d'amorce sont donc fonctionnels. De plus, aucune bande n'a pu être mise en évidence dans les échantillons utilisant les extraits tissulaire d'ARN comme matrice pour la RT-PCR. Ce couple d'amorce ne permet donc pas l'amplification artéfactuelle du transcrite de la PrPc murine.

### III.3.1.1.2 Protocoles de PCR et de RT-PCR

#### -Protocole utilisé pour l'amplification de l'ADN par PCR :

Les conditions suivantes ont été utilisées pour un volume réactionnel de 50 $\mu$ l : 6 $\mu$ l de l'extraction d'ADN à 100ng/ $\mu$ l, 5 $\mu$ l de tampon 10X Redtaq, 2,5 $\mu$ l dNTP à 10mM, 6 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> à 25mM, 0,5 $\mu$ l de chaque amorce à 100pmol/ $\mu$ l et 2,5 $\mu$ l de RedTaq 1u/ $\mu$ l (Sigma). Les paramètres du cycle de PCR sont :



#### -Protocole utilisé pour l'amplification de l'ARNm par RT-PCR :

Les éventuels contaminants d'ADN ont été éliminés par un traitement à la DNaseI (sigma) : 50 $\mu$ l des extraits d'ARN sont incubés 15min à température ambiante en présence de 5 $\mu$ l de tampon DNaseI 10X et 5 $\mu$ l de DNaseI 1unité/ $\mu$ l. La réaction est arrêtée par incubation 10min à 70°C avec 5 $\mu$ l de solution stop.

Les conditions suivantes de transcription reverse (RT) ont été utilisées : 5 $\mu$ g d'ARN, 1,5 $\mu$ l dNTP à 10mM, 1,5 $\mu$ l des amorces mRNarev et 18sRNarev à 100pmol/ $\mu$ l et qsp H<sub>2</sub>O à 20 $\mu$ l sont incubés 10min à 70°C. Ensuite, sur glace, on ajoute 3 $\mu$ l de tampon AMV-RT 10X, 5,5 $\mu$ l d' H<sub>2</sub>O et 1,5 $\mu$ l AMV-RT 1 unité/ $\mu$ l (Sigma) (50min à 42°C).

Nous avons utilisé les mêmes conditions de PCR que pour l'amplification de l'ADN.

### III.3.1.2 Dosage de la PrPc humaine in vivo

La mise au point de ce dosage est reportée dans la première partie de résultats :

#### 1.2.2.2. Suivi de l'expression de la PrPc humaine in vivo.

### III.3.2 Résultats obtenus

Sept jours après injection des vecteurs d'expression eucaryote les souris sont sacrifiées, leurs muscles tibiaux antérieurs ainsi que leur rate sont prélevés. Les homogénats sont réalisés comme décrit précédemment.

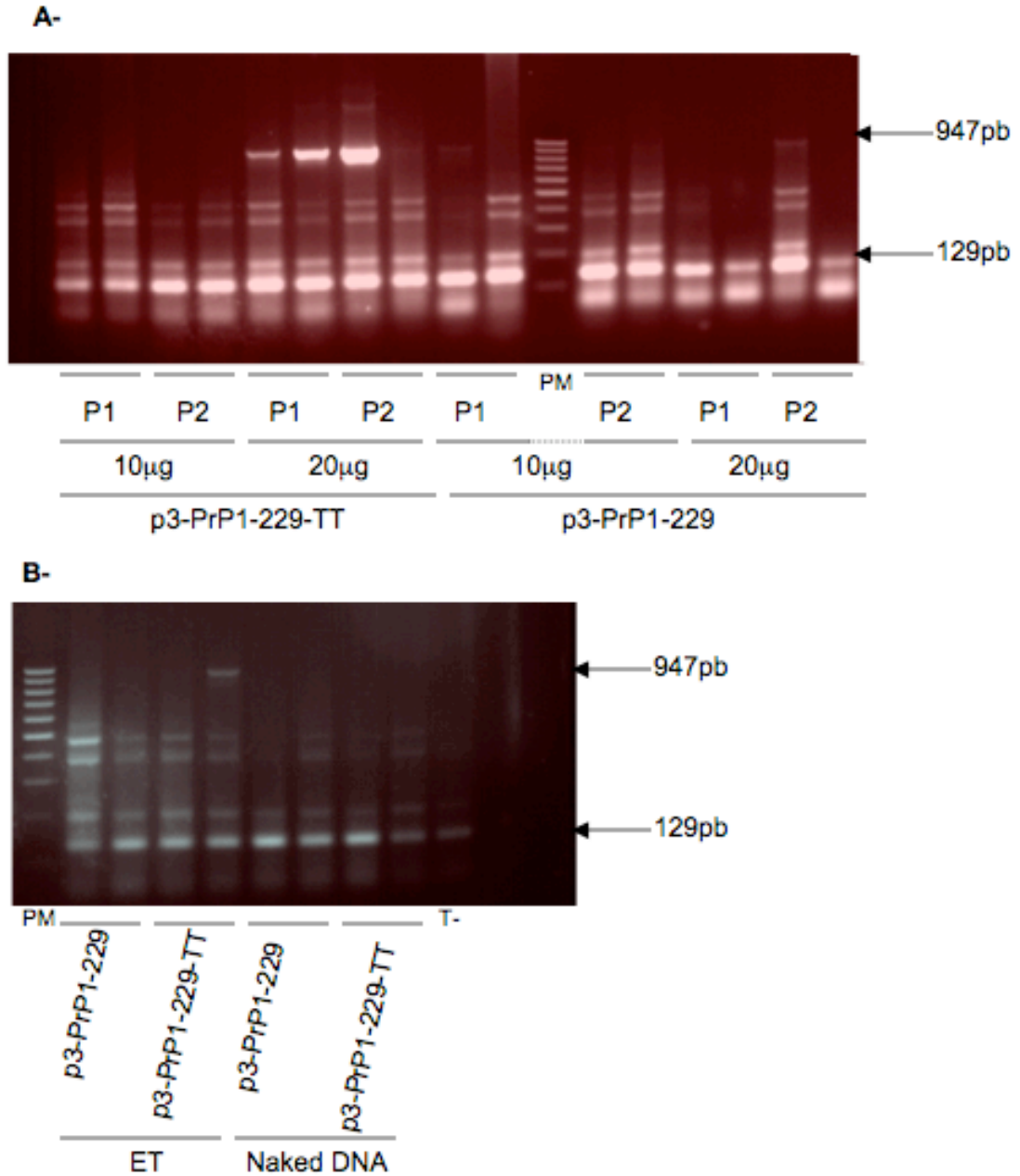
#### III.3.2.1 Dosages des ADN et ARNm spécifiques

##### -dosage de l'ADN plasmidique *in situ*

L'amplification de l'ADN plasmidique (dont le PM attendu est de 947pb) est normalisée par rapport à celle du gène codant l'ARN18s (dont le PM attendu est de 129pb). Nous n'observons que de très faibles différences d'intensité de la bande de 129pb. Nous avons donc estimé que les différents échantillons contenaient la même quantité de matériel pour l'amplification PCR.

D'après la Figure 69A, nous observons une bande de 947pb dans les lots provenant des souris immunisées par 20µg de p3-PrP1-229-TT formulés avec P1 ou P2 et, dans une moindre mesure, dans les lots provenant des souris immunisées par 10µg ou 20µg de p3-PrP1-229 formulés avec P1 ou P2. Cependant, d'après la Figure 69B, nous n'observons une bande d'intérêt que dans l'extrait musculaire d'une souris immunisée par 100µg de p3-PrP1-229 suivi d'un choc électrique. Il semblerait donc que les nanosphères P1 et P2 permettent un meilleur rendement de transfection des cellules musculaires, surtout plus reproductible.

Dans la plupart des échantillons étudiés, nous avons mis en évidence des traces pouvant correspondre à une dégradation plasmidique ou à son intégration dans le génome. Des expériences complémentaires, notamment de séquençage des bandes observées, seraient nécessaires. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence du plasmide dans les extraits de rate quel que soit le protocole étudié.



A- Protocole utilisant les nanosphères In-Cell-Art P1 et P2. 10µg ou 20µg des vecteurs p3-PrP1-229 ou p3-PrP1-229-TT formulé avec l'une des 2 nanosphères sont injectés en intramusculaire. Deux échantillons par lot sont analysés.

B- Protocoles utilisant l'électrotransfert *in vivo* (ET) ou l'ADN nu (Naked DNA). 100µg des vecteurs p3-PrP1-229 ou p3-PrP1-229-TT sont injectés en intramusculaire. Deux échantillons par lot sont analysés.

PM : marqueur de poids moléculaire ; T- : témoin négatif de PCR.

Figure 69 : Amplification par PCR de l'ADN plasmidique des extraits de muscle

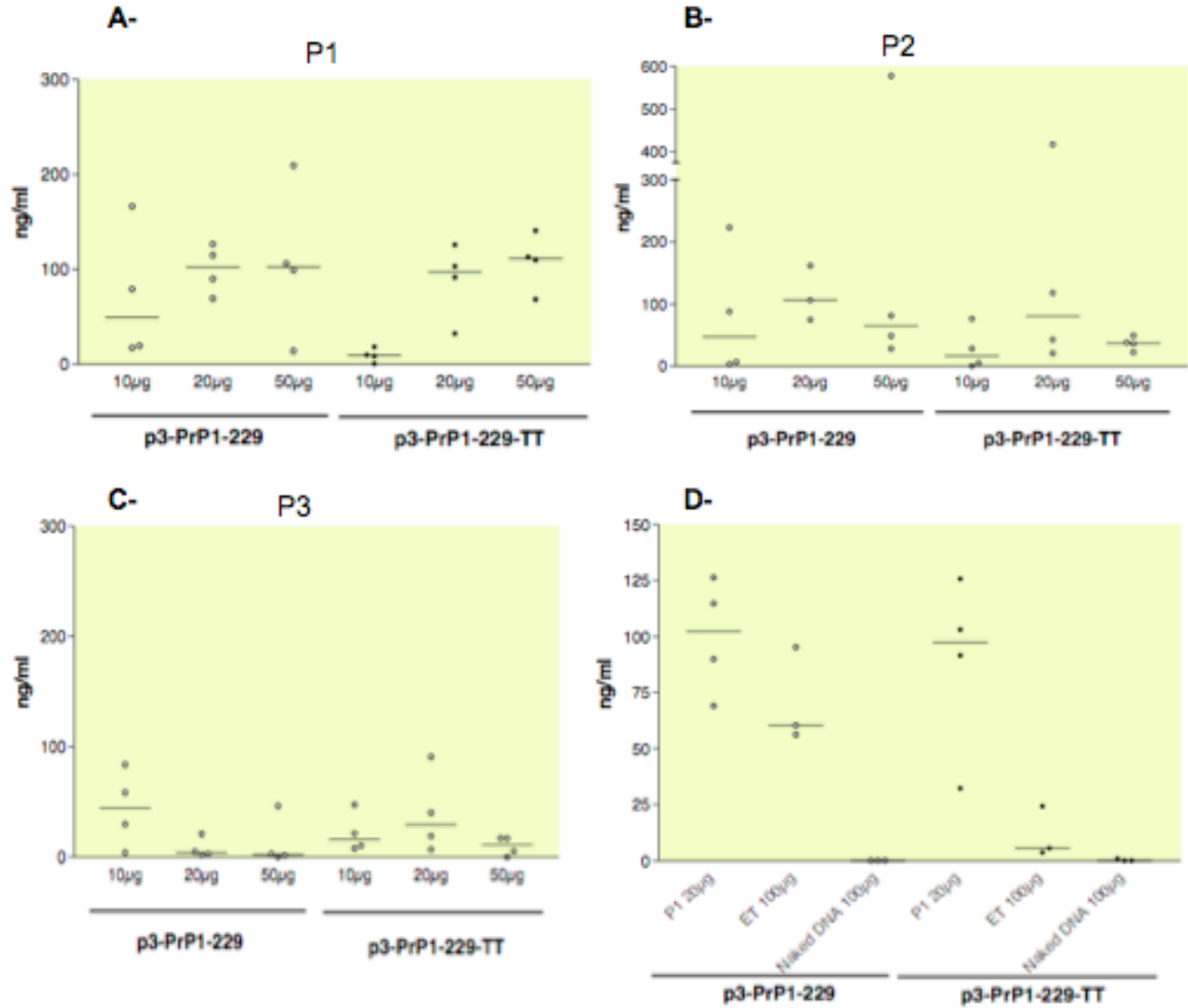


-dosage de l'ARNm *in situ*

Dans les conditions expérimentales utilisées, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de l'ARNm d'intérêt dans les extraits de muscle et de rate sept jours après l'injection des vecteurs d'expression eucaryote quel que soit le protocole utilisé.

**III.3.2.2 Dosage de la PrPc humaine *in vivo***

D'après les Figure 70A, Figure 70B et Figure 70C, les nanosphères P1 et P2 permettent une meilleure expression de la protéine d'intérêt par comparaison avec la nanosphère P3, notamment lorsque 20µg ou 50µg de plasmides sont injectés. Il semblerait que l'injection de 20µg de vecteur d'expression soit la quantité optimale lorsqu'il est formulé avec les nanosphères P1 et P2. La Figure 70D compare le niveau d'expression de la PrPc humaine, dans le muscle, obtenue en utilisant 20µg de plasmide en présence du composé P1 et celui obtenu dans les protocoles d'immunisation génique étudiés au sein de ce travail de doctorat (électrotransfert de 100µg de plasmide (ET) ou l'injection de 100µg d'ADN nu (Naked DNA)). Il apparaît que la formulation de l'ADN avec la nanosphère P1 offre une meilleure expression de la protéine d'intérêt, quel que soit le vecteur d'expression utilisé, par comparaison avec l'électrotransfert *in vivo* et surtout avec l'injection d'ADN nu. En effet, cette formulation permet d'augmenter de 2 fois ou 10 fois le niveau d'expression de la PrPc humaine par comparaison avec l'électrotransfert du vecteur p3-PrP1-229 ou p3-PrP1-229-TT, respectivement. De plus, contrairement à l'électroporation *in vivo*, en utilisant la nanosphère P1, nous n'avons pas observé de différence en terme de niveau d'expression de la PrPc humaine dans le muscle quel que soit le vecteur utilisé. Ainsi un tel protocole d'immunisation pourrait permettre d'augmenter significativement l'immunogénécité de la protéine d'intérêt lorsqu'elle est fusionnée avec un épitope T « universel ».



Sept jours après l'injection des vecteurs p3-PrP1-229 et p3-PrP1-229-TT à 10µg, 20µg, 50µg ou 100µg, les souris sont sacrifiées et leurs tibiaux antérieurs prélevés.

- A- Formulation des vecteurs d'expression eucaryote avec P1.
- B- Formulation des vecteurs d'expression eucaryote avec P2.
- C- Formulation des vecteurs d'expression eucaryote avec P3.
- D- Comparaison du niveau d'expression de la protéine PrPc humaine suite à l'injection des vecteurs d'expression eucaryote : formulés avec P1 (20µg), par électrotransfert (ET, 100µg) ou sous forme d'ADN nu (Naked DNA, 100µg).

Figure 70 : Niveau d'expression de la PrPc humaine dans les extraits de muscle

### III.3.3 Conclusion

D'après le dosage de l'ADN plasmidique, la formulation des plasmides avec *les nanosphères In-Cell-Art P1 et P2* semble permettre augmenter le rendement de transfection des cellules musculaires par comparaison avec l'électrotransfert. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence une corrélation entre les échantillons dans lesquels nous avons pu observer la présence du plasmide et ceux présentant une concentration en protéine d'intérêt la plus importante.

Il est intéressant de noter que les deux protocoles (électrotransfert *in vivo* et formulation de l'ADN avec P1 ou P2) nous ont permis de doser de la PrPc humaine dans tous les échantillons, contrairement au protocole utilisant l'ADN nu. Cependant, par comparaison avec l'électrotransfert *in vivo*, les nanosphères P1 et P2 semblent, d'une part, augmenter le niveau d'expression de la protéine d'intérêt et, d'autre part, permettre une importante expression de la PrPc humaine indépendamment du vecteur d'expression utilisé. Des expériences consistant à doser les anticorps anti-PrPc générés par immunisation génique avec ces nouveaux composés nous semblent donc particulièrement intéressants à envisager.

## **IV. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Les maladies à prions ou encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) sont des maladies neurodégénératives incurables associant notamment une mort neuronale, une vacuolisation spongiforme caractéristique du tissu neuronal et l'accumulation dans des tissus neuronaux et extraneuronaux d'une conformation anormale (PrP<sup>sc</sup>) dérivant de la protéine prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>). Globalement, l'incidence des ESST humaines est faible (1 à 2 cas par an et par million d'individus en France). Toutefois, la longue période d'incubation de la maladie chez l'homme (Collinge, 1999) et l'apparition de nouveaux risques de transmission de ces maladies par transfusion sanguine et greffe d'organes motivent la recherche d'agents thérapeutiques. Face aux résultats souvent décevants obtenus avec des composés chimiques, la recherche s'est orientée vers des stratégies immunologiques (ou immunothérapie) et plus particulièrement, vers l'utilisation d'anticorps. En effet, de nombreux travaux ont montré que des anticorps dirigés contre la conformation native de la PrP<sup>c</sup> étaient capables d'inhiber l'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> dans des cellules en culture chroniquement infectées et de retarder le développement de la maladie *in vivo* dans des modèles murins (Beringue *et al.*, 2004 ; Cardinale *et al.*, 2005; Enari *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Peretz *et al.*, 2001 ; Perrier *et al.*, 2004 ; Heppner *et al.*, 2001; White *et al.*, 2003 ; Féraudet *et al.*, 2005). On distingue deux types d'immunothérapies faisant intervenir les anticorps : d'une part, l'immunothérapie passive qui consiste à injecter chez le patient des anticorps spécifiques et, d'autre part, l'immunothérapie active qui revient à stimuler le système immunitaire de l'hôte pour lui permettre de produire des anticorps spécifiques *in situ*. Mon travail avait donc plusieurs objectifs :

- 1) développer de nouveaux anticorps à visée thérapeutique dans le cadre de l'immunothérapie passive des maladies à prions chez l'homme.
- 2) développer un nouveau protocole d'immunothérapie active permettant la production d'anticorps à visée thérapeutique chez des souris de type sauvage.

développer, de façon plus générale, un protocole d'immunisation permettant la production d'anticorps dirigés contre une conformation native d'une protéine humaine faiblement immunogène chez des souris de type sauvage.

## IV.1 Immunothérapie passive

Il est décrit dans la littérature que pour interférer avec la pathogenèse et donc présenter un intérêt thérapeutique potentiel, les anticorps doivent reconnaître la conformation native de la PrPc endogène (Polymenidou *et al.*, 2004). Pour favoriser la production de tels anticorps protecteurs, notre stratégie a été le développement d'un protocole d'immunisation génique efficace chez des souris de type sauvage. En effet, dans un autre modèle d'étude, notre équipe a pu générer des anticorps dirigés contre la conformation native d'un récepteur à sept passages transmembranaires par l'injection d'ADN nu codant ce récepteur (Tymciu *et al.*, 2002). Toutefois, lors mon travail de doctorat, nous avons été confrontés à un problème de stimulation de la réponse immunitaire faible lors de l'injection d'ADN nu codant la PrPc humaine faiblement immunogène (car présentant 90% d'homologie de séquence avec une protéine ubiquiste). Pour pallier ce problème, nous avons, d'une part, testé différents protocoles d'immunisation génique afin d'augmenter le niveau d'expression de la protéine d'intérêt *in vivo* et, d'autre part, fusionné la séquence codant la PrPc humaine avec celle d'un épitope T « universel », que nous avons montré précédemment comme potentialisateur de la réponse en anticorps spécifiques (Tymciu *et al.*, 2004). Nous avons ainsi pu obtenir des anticorps polyclonaux reconnaissant la conformation native de la PrPc humaine exprimée à la surface des cellules par immunisation génique. Cette étude conforte l'intérêt d'un tel mode d'immunisation pour produire des anticorps dirigés contre la conformation native de l'antigène par comparaison avec l'immunisation protéique classique. En effet, les deux protocoles d'immunisation protéique que nous avons testés, nous ont permis de générer de forts titres en anticorps polyclonaux reconnaissant la PrPc humaine recombinante immobilisée sur une plaque de microtitrage mais, pour l'essentiel d'entre eux, incapables de lier la PrPc humaine exprimée à la surface des cellules. Concernant les protocoles d'immunisation génique étudiés, nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de la protéine d'intérêt *in vivo* et celui de la stimulation de la réponse humorale spécifique. Ainsi, l'électrotransfert *in vivo* nous a permis d'obtenir les résultats les plus encourageants. Il semblerait donc qu'une des raisons pouvant expliquer des résultats parfois décevants de l'immunisation génique

soit la trop faible expression de l'immunogène *in vivo*. Par ailleurs, la faible immunogénicité de l'antigène peut également être un frein pour générer une forte réponse en anticorps spécifiques. Cependant, dans cette étude, l'ajout de la séquence d'un épitope T « universel » ne nous a pas permis d'augmenter significativement le titre en anticorps dirigés contre la PrPc humaine. Il est, toutefois, intéressant de noter que la forte réponse immunitaire contre la protéine prion humaine fusionnée avec le fragment 829-844 de la toxine tétanique est observée en dépit d'une plus faible expression de cette protéine par rapport à la PrPc humaine non fusionnée sept jours après l'électroporation de l'ADN.

Par ailleurs, nous avons collaboré avec l'équipe de Bruno Pitard pour étudier le niveau d'expression de la PrPc humaine dans le muscle et la rate de souris immunisées par les vecteurs p3-PrP1-229 ou p3-PrP1-229-TT formulés avec différents block copolymers. La formulation de 20µg des deux vecteurs d'expression avec les nanosphères *In-Cell-Art* P1 et P2 a permis d'augmenter l'expression de la protéine d'intérêt dans le muscle de 2 à 10 fois, respectivement, par comparaison avec l'électrotransfert de 100µg de ces vecteurs. De plus, le même niveau d'expression de la PrPc humaine *in vivo* a été mis en évidence quel que soit le vecteur d'expression eucaryote injecté. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de leur utilisation sur la réponse en anticorps spécifiques.

Le développement d'un protocole d'immunisation efficace et général aboutissant à la production d'anticorps polyclonaux présentant des caractéristiques thérapeutiques intéressantes est la première étape dans la génération de nouveaux outils pour l'immunothérapie passive. Il est clair, à notre avis, que seuls des anticorps recombinants, dont les propriétés fonctionnelles auront été optimisées par génie génétique (Siberil *et al.*, 2006 ; Presta *et al.*, 2006), pourront constituer à terme des agents thérapeutiques potentiellement efficaces et dépourvus d'effets secondaires chez l'homme. C'est pourquoi, concernant notre travail, les étapes suivantes consistent à produire de nouveaux anticorps monoclonaux et à comparer leur spécificité fine avec celle des nombreux anticorps monoclonaux anti-PrPc obtenus chez des souris invalidées pour le gène *Prnp*. Il s'agira ensuite de tester leurs effets thérapeutiques potentiels *ex vivo* et notamment de déterminer l'influence de leur bivalence sur leur capacité à réduire

l'accumulation de la PrPsc dans un modèle cellulaire. C'est ce que nous avons réalisé en utilisant des Fab préparés à partir d'anticorps monoclonaux dirigés contre la PrPc murine, disponibles au laboratoire. Les résultats de ce genre d'études permettent de choisir les meilleurs anticorps candidats, avant d'entreprendre leur clonage et d'envisager le format (scFv, diabody, Fab recombinant) dans lequel ils seront exprimés lors d'une étude *in vivo*.

## **IV.2 Immunothérapie active**

La tolérance immunitaire de l'hôte pour la PrPc endogène rend difficile le développement de protocole d'immunothérapie active efficace. Durant ces cinq dernières années, de nombreux protocoles ont été étudiés mais peu d'entre eux ont permis la stimulation d'une réponse immunitaire protectrice (Bade and Frey, 2007). En effet, ces protocoles ont souvent engendré de faibles titres en anticorps dirigés contre la PrPc et surtout peu d'entre eux ont permis la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de la PrPc, prérequis pour exercer un effet protecteur (Heppner *et al.*, 2004 ; Polymenidou *et al.*, 2004). Ainsi, les objectifs, pour développer un protocole anti-prion efficace sont, d'une part, de rompre la tolérance immunitaire et, d'autre part, d'orienter la production d'anticorps dirigés contre la conformation native de l'antigène. Dans ce but, nous avons utilisé, d'une part, une protéine hétérologue (la PrPc humaine) comme immunogène et, d'autre part, l'immunisation génique comme protocole d'immunisation. Le mimétisme moléculaire entre un pathogène et un antigène du soi est un processus connu pour provoquer des maladies auto-immunes en engendrant la production d'auto-anticorps et/ou de lymphocytes T auto-réactifs (Behar and Porcelli, 1995 ; Ang *et al.*, 2004). Plus particulièrement, dans le cadre des maladies à prions, une étude menée Ishibashi *et al.* a permis la production d'anticorps dirigés contre la PrPc murine suite à l'immunisation de souris de type sauvage avec la protéine prion bovine recombinante (Ishibashi *et al.*, 2006).

Des études ont montré qu'initier la réponse immunitaire par immunisation génique puis la restimuler par une immunisation protéique tend à augmenter le titre en anticorps spécifiques (Barnett *et al.*, 1997 ; Mossman *et al.*, 2004). Ainsi, nous avons continué le



protocole d'électrotransfert *in vivo* initié dans le cadre de l'immunothérapie passive puis nous avons restimulé la réponse immunitaire par l'injection d'une quantité importante de PrPc humaine recombinante. Nous avons observé une potentialisation de la réponse humorale dirigée contre la conformation native de notre immunogène mettant en avant une stimulation de la mémoire immunitaire spécifique par l'électrotransfert *in vivo*. De plus, nous avons observé une réaction croisée entre la PrPc humaine et la PrPc murine endogène. Ainsi, nous avons produit des anticorps dirigés contre la conformation native de la PrPc murine chez des souris de type sauvage. Il sera maintenant intéressant de vérifier l'effet protecteur *in vivo* de ces anticorps.

La PrPc est une protéine ubiquiste exprimée dans la majorité des tissus neuronaux et extraneuronaux, l'orientation de la réponse immunitaire est donc une notion importante à analyser. En effet, si Heppner *et al.* ont montré sur un modèle de souris transgéniques que la co-expression de la protéine prion cellulaire endogène et d'un anticorps anti-PrPc n'entraînait pas de maladie auto-immune (Heppner *et al.*, 2001), une réponse cellulaire spécifique pourrait être délétère pour l'organisme. Ainsi, dans le cadre de l'immunothérapie active des maladies à prions, une réponse immunitaire de type Th2 semble être mieux adaptée. Or, de façon intéressante, nous avons observé que l'électrotransfert *in vivo* stimulait essentiellement la production d'anticorps spécifiques d'isotype IgG1. Par ailleurs, nous avons mené des expériences complémentaires pour étudier notamment l'avantage d'une restimulation protéique en alum ou en IFA. Il semblerait qu'une restimulation en alum permette, d'une part, une potentialisation plus importante de la réponse immunitaire secondaire et, d'autre part, une orientation de la réponse immunitaire vers le type humoral. Ainsi, il serait intéressant de combiner l'électrotransfert *in vivo* avec une restimulation protéique en alum.

Ce travail de thèse a donc permis de développer un protocole d'immunisation général permettant, d'une part, de produire des anticorps reconnaissant la PrPc humaine et, d'autre part, de rompre la tolérance immunitaire vis à vis d'une protéine du soi chez des souris de type sauvage. Ce protocole présente donc un intérêt à la fois en immunothérapie passive et active. De plus, la méthode d'immunisation utilisée nécessite seulement la préparation de l'ADNc codant la protéine d'intérêt, matériel que l'on peut facilement obtenir en grande quantité et qui se conserve facilement. Aucune purification

de la protéine antigénique n'est requise, étape qui peut être particulièrement délicate selon l'antigène étudié.

L'étude de l'effet thérapeutique *in vivo* des anticorps produits constitue la principale perspective de ce travail.

## **V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

*A*

---

**Adamczyk M, Gebler JC, Wu J.** Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry. *J Immunol Methods*. 2000 Apr 3;237(1-2):95-104.

**Adjou KT, Demaimay R, Lasmezas C, Deslys JP, Seman M, Dormont D.** MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhanced efficacy in delaying hamster scrapie. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Dec;39(12):2810-2.

**Aguzzi A, Brandner S, Fischer MB, Furukawa H, Glatzel M, Hawkins C, Heppner FL, Montrasio F, Navarro B, Parizek P, Pekarik V, Prinz M, Raeber AJ, Rockl C, Klein MA.** Spongiform encephalopathies: insights from transgenic models. *Adv Virus Res*. 2001;56:313-52.

**Aguzzi A, Heikenwalder M.** Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity*. 2005 Feb;22(2):145-54.

**Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG.** Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004 Mar;5(3):266-71.

**Andrianaivo F, Lecocq M, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R, Jadot M.** Hydrodynamics-based transfection of the liver: entrance into hepatocytes of DNA that causes expression takes place very early after injection. *J Gene Med*. 2004 Aug;6(8):877-83.

**Andrievskaia O, McRae H, Elmgren C, Huang H, Balachandran A, Nielsen K.** Generation of antibodies against bovine recombinant prion protein in various strains of mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Jan;13(1):98-105.

**Ang CW, Jacobs BC, Laman JD.** The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol*. 2004 Feb;25(2):61-6.

**Arbel M, Lavie V, Solomon B.** Generation of antibodies against prion protein in wild-type mice via helix 1 peptide immunization. *J Neuroimmunol*. 2003 Nov;144(1-2):38-45.

**Aucouturier P, Carnaud C.** The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness. *J Leukoc Biol*. 2002 Dec;72(6):1075-83.

**Augusti-Tocco G, Sato G.** Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 Sep;64(1):311-5.

8

---

**Bade S, Baier M, Boetel T, Frey A.** Intranasal immunization of Balb/c mice against prion protein attenuates orally acquired transmissible spongiform encephalopathy. *Vaccine.* 2006 Feb 27;24(9):1242-53.

**Bade S, Frey A.** Potential of active and passive immunizations for the prevention and therapy of transmissible spongiform encephalopathies. *Expert Rev Vaccines.* 2007 Apr;6(2):153-68.

**Baecher-Allan C, Hafler DA.** Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:203-16.

**Bainbridge J, Jones N, Walker B.** Multiple antigenic peptides facilitate generation of anti-prion antibodies. *Clin Exp Immunol.* 2004 Aug;137(2):298-304.

**Barnett SW, Rajasekar S, Legg H, Doe B, Fuller DH, Haynes JR, Walker CM, Steimer KS.** Vaccination with HIV-1 gp120 DNA induces immune responses that are boosted by a recombinant gp120 protein subunit. *Vaccine.* 1997 Jun;15(8):869-73.

**Barquinero J, Eixarch H, Perez-Melgosa M.** Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther.* 2004 Oct;11 Suppl 1:S3-9.

**Barry RA, McKinley MP, Bendheim PE, Lewis GK, DeArmond SJ, Prusiner SB.** Antibodies to the scrapie protein decorate prion rods. *J Immunol.* 1985 Jul;135(1):603-13.

**Barry RA, Vincent MT, Kent SB, Hood LE, Prusiner SB.** Characterization of prion proteins with monospecific antisera to synthetic peptides. *J Immunol.* 1988 Feb 15;140(4):1188-93.

**Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C.** Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell.* 1986 Aug 1;46(3):417-28.

**Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C.** Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*. 1986 Aug 1;46(3):417-28.

**Batra SK, Jain M, Wittel UA, Chauhan SC, Colcher D.** Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Curr Opin Biotechnol*. 2002 Dec;13(6):603-8.

**Baty D, Chames P.** Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunotherapy. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 2006; 21:255-263.

**Behar SM, Porcelli SA.** Mechanisms of autoimmune disease induction. The role of the immune response to microbial pathogens. *Arthritis Rheum*. 1995 Apr;38(4):458-76.

**Bekeredjian R, Chen S, Frenkel PA, Grayburn PA, Shohet RV.** Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation*. 2003 Aug 26;108(8):1022-6.

**Beringue V, Vilette D, Mallinson G, Archer F, Kaisar M, Tayebi M, Jackson GS, Clarke AR, Laude H, Collinge J, Hawke S.** PrPSc binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines. *J Biol Chem*. 2004 Sep 17;279(38):39671-6.

**Beringue V, Vilette D, Mallinson G, Archer F, Kaisar M, Tayebi M, Jackson GS, Clarke AR, Laude H, Collinge J, Hawke S.** PrPSc binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines. *J Biol Chem*. 2004 Sep 17;279(38):39671-6.

**Bettan M, Ivanov MA, Mir LM, Boissiere F, Delaere P, Scherman D.** Efficient DNA electrotransfer into tumors. *Bioelectrochemistry*. 2000 Sep;52(1):83-90.

**Bettan M, Ivanov MA, Mir LM, Boissiere F, Delaere P, Scherman D.** Efficient DNA electrotransfer into tumors. *Bioelectrochemistry*. 2000 Sep;52(1):83-90.

**Blair-Parks K, Weston BC, Dean DA.** High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *J Gene Med*. 2002 Jan-Feb;4(1):92-100.

**Blanco B, Holliger P, Vile RG, Alvarez-Vallina L.** Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells. *J Immunol*. 2003 ; 171 (2) : 1070-7.

**Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB.** Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*. 1982 Dec 24;218(4579):1309-11.

**Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB.** Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. *Biochemistry*. 1984 Dec 4;23(25):5898-906.

**Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ.** Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*. 1984 Dec 13-19;312(5995):643-6.

**Boutin AC.** Epidémiologie de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. *MedSci(Paris)*. 1998; 14:1103-7.

**Boyer JD, Chattergoon MA, Ugen KE, Shah A, Bennett M, Cohen A, Nyland S, Lacy KE, Bagarazzi ML, Higgins TJ, Baine Y, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, MacGregor RR, Weiner DB.** Enhancement of cellular immune response in HIV-1 seropositive individuals: A DNA-based trial. *Clin Immunol*. 1999 Jan;90(1):100-7.

**Boyer JD, Ugen KE, Wang B, Agadjanyan M, Gilbert L, Bagarazzi ML, Chattergoon M, Frost P, Javadian A, Williams WV, Refaeli Y, Ciccarelli RB, McCallus D, Coney L, Weiner DB.** Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med*. 1997 May;3(5):526-32.

**Boyle JS, Koniaras C, Lew AM.,** Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol*. 1997 Dec;9(12):1897-906.

**Braun S.** Naked plasmid DNA for the treatment of muscular dystrophy. *Curr Opin Mol Ther*. 2004 Oct;6(5):499-505.

**Brown DR, Besinger A.** Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J*. 1998 Sep 1;334 ( Pt 2):423-9.

**Bruggemann M, Neuberger MS.** Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice. *Immunol Today*. 1996 ; 17 (8) : 391-7.

**Bruggemann M, Winter G, Waldmann H, Neuberger MS.** The immunogenicity of chimeric antibodies. *J Exp Med*. 1989 ; 170 (6) : 2153-7.

**Buchsbaum DJ.** Experimental approaches to increase radiolabeled antibody localization in tumors. *Cancer Res.* 1995 Dec 1;55(23 Suppl):5729s-5732s.

**Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C.** Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature.* 1992 Apr 16;356(6370):577-82.

**Bureau MF, Gehl J, Deleuze V, Mir LM, Scherman D.** Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim Biophys Acta.* 2000 May 1;1474(3):353-9.

**Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B, Chang J, Brown WR, Cantarero LA.** The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods.* 1992 Jun 24;150(1-2):77-90.

*e*

---

**Caldas C, Coelho V, Kalil J, Moro AM, Maranhao AQ, Brigido MM.** Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7 : an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. *Mol Immunol.* 2003 ; 39 (15) : 941-52.

**Cardinale A, Filesi I, Vetrugno V, Pocchiari M, Sy MS, Biocca S.** Trapping prion protein in the endoplasmic reticulum impairs PrPC maturation and prevents PrPSc accumulation. *J Biol Chem.* 2005 Jan 7;280(1):685-94.

**Cardinale A, Filesi I, Vetrugno V, Pocchiari M, Sy MS, Biocca S.** Trapping prion protein in the endoplasmic reticulum impairs PrPC maturation and prevents PrPSc accumulation. *J Biol Chem.* 2005 Jan 7;280(1):685-94.

**Carter PJ.** Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol.* 2006 May;6(5):343-57.

**Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA.** Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med.* 1997 Nov 3;186(9):1481-6.



**Caspi S, Halimi M, Yanai A, Sasson SB, Taraboulos A, Gabizon R.** The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6;273(6):3484-9.

**Caughey B, Raymond GJ.** Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol.* 1993 Feb;67(2):643-50.

**Caughey B.** Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death? *Trends Biochem Sci.* 2001 Apr;26(4):235-42.

**Chatenoud L.** Immune therapies of autoimmune diseases: are we approaching a real cure? *Curr Opin Immunol.* 2006 Dec;18(6):710-7.

**Chattergoon MA, Robinson TM, Boyer JD, Weiner DB.** Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1998 Jun 15;160(12):5707-18.

**Chen S, Shohet RV, Bekeredjian R, Frenkel P, Grayburn PA.** Optimization of ultrasound parameters for cardiac gene delivery of adenoviral or plasmid deoxyribonucleic acid by ultrasound-targeted microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Jul 16;42(2):301-8.

**Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R.** Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 2002 Jul 1;21(13):3317-26.

**Colcher D, Goel A, Pavlinkova G, Beresford G, Booth B, Batra SK.** Effects of genetic engineering on the pharmacokinetics of antibodies. *Q J Nucl Med.* 1999 Jun;43(2):132-9.

**Collins SJ, Lawson VA, Masters CL.** Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet.* 2004 Jan 3;363(9402):51-61.

**Colot V, Rossignol JL.** Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays.* 1999 May;21(5):402-11.

**Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD Jr.** DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med.* 1996 Oct;2(10):1122-8.

**Cone RD, Mulligan RC.** High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Oct;81(20):6349-53.

D

---

**Danialou G, Comtois AS, Dudley RW, Nalbantoglu J, Gilbert R, Karpati G, Jones DH, Petrof BJ.** Ultrasound increases plasmid-mediated gene transfer to dystrophic muscles without collateral damage. *Mol Ther.* 2002 Nov;6(5):687-93.

**Davis HL, Michel ML, Mancini M, Schleef M, Whalen RG.** Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine.* 1994 Dec;12(16):1503-9.

**Dean DA, Machado-Aranda D, Blair-Parks K, Yeldandi AV, Young JL.** Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. *Gene Ther.* 2003 Sep;10(18):1608-15.

**Degano P, Schneider J, Hannan CM, Gilbert SC, Hill AV.** Gene gun intradermal DNA immunization followed by boosting with modified vaccinia virus Ankara: enhanced CD8+ T cell immunogenicity and protective efficacy in the influenza and malaria models. *Vaccine.* 1999 Nov 12;18(7-8):623-32.

**Demaimay R, Adjou K, Lasmezas C, Lazarini F, Cherifi K, Seman M, Deslys JP, Dormont D.** Pharmacological studies of a new derivative of amphotericin B, MS-8209, in mouse and hamster scrapie. *J Gen Virol.* 1994 Sep;75 ( Pt 9):2499-503.

**Demaimay R, Adjou KT, Beringue V, Demart S, Lasmezas CI, Deslys JP, Seman M, Dormont D.** Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals. *J Virol.* 1997 Dec;71(12):9685-9.

**Desigaux L, Gourden C, Bello-Roufai M, Richard P, Oudrhiri N, Lehn P, Escande D, Pollard H, Pitard B.** Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther.* 2005 Jul;16(7):821-9.

**Dezawa M, Takano M, Negishi H, Mo X, Oshitari T, Sawada H.** Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach. *Micron.* 2002;33(1):1-6.

**Di Martino A, Bigon E, Corona G, Callegaro L.** Production and characterization of antibodies to mouse scrapie-amyloid protein elicited by non-carrier linked synthetic peptide immunogens. *J Mol Recognit.* 1991 Mar-Jun;4(2-3):85-91.

**Divgi CR, Larson SM.** Radiolabeled monoclonal antibodies in the diagnosis and treatment of malignant melanoma. *Semin Nucl Med.* 1989 Oct;19(4):252-61.

**Dolezal O, Pearce LA, Lawrence LJ, McCoy AJ, Hudson PJ, Kortt AA.** ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10 : shortening of the linker in single-chain Fv fragment assembled in V(L) to V(H) orientation drives the formation of dimers, trimers, tetramers and higher molecular mass multimers. *Protein Eng.* 2000 ; 13 (8) : 565-74.

**Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ.** Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 9;94(25):13452-7.

**Donofrio G, Heppner FL, Polymenidou M, Musahl C, Aguzzi A.** Paracrine inhibition of prion propagation by anti-PrP single-chain Fv miniantibodies. *J Virol.* 2005 Jul;79(13):8330-8.

**Dubensky TW, Campbell BA, Villarreal LP.** Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Dec;81(23):7529-33.

**Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LG, Muyldermans S, Wyns L, Matagne A.** Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci.* 2002 Mar;11(3):500-15.

**Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, Otten GR, Ulmer JB, Donnelly JJ, Ott G, McDonald DM.** Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol.* 2000 Sep 1;165(5):2850-8.

*E. 7*

---

**Enari M, Flechsig E, Weissmann C.** Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 31;98(16):9295-9.

**Estcourt MJ, Ramsay AJ, Brooks A, Thomson SA, Medveckzy CJ, Ramshaw IA.** Prime-boost immunization generates a high frequency, high-avidity CD8(+) cytotoxic T lymphocyte population. *Int Immunol.* 2002 Jan;14(1):31-7.

**Farquhar C, Dickinson A, Bruce M.** Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*. 1999 Jan 9;353(9147):117.

**Fasano C, Campana V, Zurzolo C.** Prions: protein only or something more? Overview of potential prion cofactors. *J Mol Neurosci*. 2006;29(3):195-214.

**Feraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert Y, Creminon C, Vilette D, Lehmann S, Grassi J.** Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J Biol Chem*. 2005 Mar 25;280(12):11247-58.

**Fernandez-Borges N, Brun A, Whitton JL, Parra B, Diaz-San Segundo F, Salguero FJ, Torres JM, Rodriguez F.** DNA vaccination can break immunological tolerance to PrP in wild-type mice and attenuates prion disease after intracerebral challenge. *J Virol*. 2006 Oct;80(20):9970-6.

**Follette P.** New perspectives for prion therapeutics meeting. Prion disease treatment's early promise unravels. *Science*. 2003 Jan 10;299(5604):191-2.

**Frank R.** The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods*. 2002 Sep 1;267(1):13-26.

**Fuller DH, Loudon P, Schmaljohn C.** Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*. 2006 Sep;40(1):86-97.

**Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL.** DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):11478-82.

**Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL.** DNA vaccines: a novel approach to immunization. *Int J Immunopharmacol*. 1995 Feb;17(2):79-83.



---

**Gabizon R, McKinley MP, Groth D, Prusiner SB.** Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Sep;85(18):6617-21. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Feb;86(4):1223.

**Gabizon R, McKinley MP, Groth D, Prusiner SB.** Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Sep;85(18):6617-21. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Feb;86(4):1223.

**Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB.** Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Oct 1;89(19):9097-101.

**Gajdusek DC.** Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science.* 1977 Sep 2;197(4307):943-60.

**Gibbs CJ Jr, Asher DM, Brown PW, Fradkin JE, Gajdusek DC.** Creutzfeldt-Jakob disease infectivity of growth hormone derived from human pituitary glands. *N Engl J Med.* 1993 Feb 4;328(5):358-9.

**Gilbert SC, Moorthy VS, Andrews L, Pathan AA, McConkey SJ, Vuola JM, Keating SM, Berthoud T, Webster D, McShane H, Hill AV.** Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine.* 2006 May 22;24(21):4554-61.

**Gilch S, Winklhofer KF, Groschup MH, Nunziante M, Lucassen R, Spielhauer C, Muranyi W, Riesner D, Tatzelt J, Schatzl HM.** Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J.* 2001 Aug 1;20(15):3957-66.

**Gilliland LK, Walsh LA, Frewin MR, Wise MP, Tone M, Hale G, Kiousi D, Waldmann H.** Elimination of the immunogenicity of therapeutic antibodies. *J Immunol.* 1999 ; 162 ; 3663-71.

**Girard MP, Osmanov SK, Kienny MP.** A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine.* 2006 May 8;24(19):4062-81. Epub 2006 Feb 28.

**Glatzel M, Aguzzi A.** PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol.* 2000 Nov;81(Pt 11):2813-21.

**Goldspink G.** Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jun;17(2):211-22.

**Goldstein G.** Monoclonal antibody specificity: Orthoclone OKT3 T-cell blocker. *Nephron.* 1987;46 Suppl 1:5-11.

**Goni F, Knudsen E, Schreiber F, Scholtzova H, Pankiewicz J, Carp R, Meeker HC, Rubenstein R, Brown DR, Sy MS, Chabalgoity JA, Sigurdsson EM, Wisniewski T.** Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. *Neuroscience.* 2005;133(2):413-21.

**Grassi J, Frobert Y, Pradelles P, Chercuitte F, Gruaz D, Dayer JM, Poubelle PE.** Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunometric assays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *J Immunol Methods.* 1989 Oct 24;123(2):193-210.

**Gregoire S, Bergot AS, Feraudet C, Carnaud C, Aucoeur P, Rosset MB.** The murine B cell repertoire is severely selected against endogenous cellular prion protein. *J Immunol.* 2005 Nov 15;175(10):6443-9.

**Gutierrez JM, Leon G, Lomonte B.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(8):721-41.

#

---

**Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A.** A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2003 Jan 16;348(3):255-6.

**Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M.** LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 2003 Oct 17;302(5644):415-9. Erratum in: *Science.* 2003 Oct 24;302(5645):568.

**Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M.** LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003 Oct 17;302(5644):415-9. Erratum in: *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):568.

**Hadlow WJ.** Scrapie and Kuru. *Lancet*. 1959; 2:289-90.

**Hale G, Dyer MJ, Clark MR, Phillips JM, Marcus R, Riechmann L, Winter G, Waldmann H.** Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet*. 1988 ; 2 (8625) : 1394-9.

**Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.** Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993 Jun 3;363(6428):446-8.

**Harimoto K, Sugimura K, Lee CR, Kuratsukuri K, Kishimoto T.** In vivo gene transfer methods in the bladder without viral vectors. *Br J Urol*. 1998 Jun;81(6):870-4.

**Harmeyer S, Pfaff E, Groschup MH.** Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. *J Gen Virol*. 1998 Apr;79 ( Pt 4):937-45.

**Harris DA.** Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Jul;12(3):429-44.

**Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forchan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA.** Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev*. 2004 Jun;199:9-26.

**Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, Zinkernagel R, Aguzzi A.** Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med*. 2004 Feb;10(2):187-92.

**Heller L, Jaroszeski MJ, Coppola D, Pottinger C, Gilbert R, Heller R.** Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo. *Gene Ther*. 2000 May;7(10):826-9.

**Heller R, Jaroszeski M, Atkin A, Moradpour D, Gilbert R, Wands J, Nicolau C.** In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett.* 1996 Jul 8;389(3):225-8.

**Heppner FL, Musahl C, Arrighi I, Klein MA, Rulicke T, Oesch B, Zinkernagel RM, Kalinke U, Aguzzi A.** Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science.* 2001 Oct 5;294(5540):178-82.

**Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K.** Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Med.* 2004 Jan;10(1):29-30.

**Hoffman SL, Doolan DL, Sedegah M, Wang R, Scheller LF, Kumar A, Weiss WR, Le TP, Klinman DM, Hobart P, Norman JA, Hedstrom RC.** Toward clinical trials of DNA vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol.* 1997 Aug;75(4):376-81.

**Holliger P, Prospero T, Winter G.** "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 ; 90 (14) : 6444-8.

**Hudson PJ, Kortt AA.** High avidity scFv multimers ; diabodies and triabodies. *J Immunol Methods.* 1999 ; 231 (1-2) : 177-89.

**Hudson PJ, Souriau C.** Engineered antibodies. *Nat Med.* 2003 ; 9 (1) : 129-34.

**Huillard J, Costagliola D, Maccario J, Billette D, Brandel JP, Deslys JP, Hauw JJ, Chaussain JL, Agid Y, Dormont D, Alperovitch A.** Incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in human growth hormone recipients in France. *Neurology.* 1999; 53:1197-1201.

9

---

**Inoue T, Krumlauf R.** An impulse to the brain--using in vivo electroporation. *Nat Neurosci.* 2001 Nov;4 Suppl:1156-8.

**Inoue T, Krumlauf R.** An impulse to the brain--using in vivo electroporation. *Nat Neurosci.* 2001 Nov;4 Suppl:1156-8.

**Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi**



**Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S.** Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine*. 2007 Jan 22;25(6):985-92.

9

---

**Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J.** Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8531-5.

**James TL, Liu H, Ulyanov NB, Farr-Jones S, Zhang H, Donne DG, Kaneko K, Groth D, Mehlhorn I, Prusiner SB, Cohen FE.** Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 16;94(19):10086-91.

**Janeway C., Travers P., Walport M.,** *Immunobiology*. New York : Garland Science Publishing, 2004.

**Jarrett JT, Lansbury PT Jr.** Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*. 1993 Jun 18;73(6):1055-8.

**Jayankura M, Boggione C, Frisen C, Boyer O, Fouret P, Saillant G, Klatzmann D.** In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *J Gene Med*. 2003 Jul;5(7):618-24.

**Jeffrey M, McGovern G, Goodsir CM, Brown KL, Bruce ME.** Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy. *J Pathol*. 2000 Jul;191(3):323-32.

**Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ.** Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):301-6.

K

- 
- Kalinna BH.** DNA vaccines for parasitic infections. *Immunol Cell Biol.* 1997 Aug;75(4):370-5.
- Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Tonna-DeMasi M, Fersko R, Carp RI, Wisniewski HM, Diringer H.** Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol.* 1987 Dec;61(12):3688-93.
- Katsumi A, Emi N, Abe A, Hasegawa Y, Ito M, Saito H.** Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. *Hum Gene Ther.* 1994 Nov;5(11):1335-9.
- Kaufmann SH.** Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today.* 1995 Jul;16(7):338-42.
- Kay MA, Glorioso JC, Naldini L.** Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* 2001 Jan;7(1):33-40.
- Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF.** Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother.* 1994 ; 15 (1) : 42-52.
- Kilara A, Shahani KM.** Preparation and properties of immobilized papain and lipase. *Biotechnol Bioeng.* 1977 Nov;19(11):1703-14.
- Kim CL, Karino A, Ishiguro N, Shinagawa M, Sato M, Horiuchi M.** Cell-surface retention of PrPC by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J Gen Virol.* 2004 Nov;85(Pt 11):3473-82.
- Kim CL, Umetani A, Matsui T, Ishiguro N, Shinagawa M, Horiuchi M.** Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology.* 2004 Mar 1;320(1):40-51.
- Kim SJ, Park Y, Hong HJ.** Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells.* 2005 Aug 31;20(1):17-29.
- Kimberlin RH.** Scrapie agent: prions or virinos? *Nature.* 1982 May 13;297(5862):107-8.

**King CY, Diaz-Avalos R.** Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature*. 2004 Mar 18;428(6980):319-23.

**Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J.** Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*. 1991 Nov;65(11):6292-5.

**KLATZO I, GAJDUSEK DC, ZIGAS V.** Pathology of Kuru. *Lab Invest*. 1959 Jul-Aug;8(4):799-847.

**Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A.** A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*. 1997 Dec 18-25;390(6661):687-90.

**Knaus KJ, Morillas M, Swietnicki W, Malone M, Surewicz WK, Yee VC.** Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol*. 2001 Sep;8(9):770-4.

**Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, Takakura Y.** Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med*. 2004 May;6(5):584-92.

**Kohler G, Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 ; 256 (5517) : 495-7.

**Koller MF, Grau T, Christen P.** Induction of antibodies against murine full-length prion protein in wild-type mice. *J Neuroimmunol*. 2002 Nov;132(1-2):113-6.

**Kont V, Laan M, Kisand K, Merits A, Scott HS, Peterson P.** Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol Immunol*. 2007 Jun 27.

**Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB.** Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9836-41.

**Kortt AA, Dolezal O, Power BE, Hudson PJ.** Dimeric and trimeric antibodies : high avidity scFvs for cancer targeting. *Biomol Eng*. 2001 ; 18 (3) : 95-108.

**Kortt AA, Lah M, Oddie GW, Gruen CL, Burns JE, Pearce LA, Atwell JL, McCoy AJ, Howlett GJ, Metzger DW, Webster RG, Hudson PJ.** Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. *Protein Eng.* 1997 ; 10 (4) : 423-33.

**Krasemann S, Groschup M, Hunsmann G, Bodemer W.** Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of PrP0/0 mice. *J Immunol Methods.* 1996 Dec 15;199(2):109-18.

**Krasemann S, Groschup MH, Harmeyer S, Hunsmann G, Bodemer W.** Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP0/0 mice. *Mol Med.* 1996 Nov;2(6):725-34.

**Kreiss P, Scherman D.** Optimisation des plasmides et des vecteurs synthétiques pour la thérapie génique. *Medecine/Sciences.* 1999 mai; 15:669-676.

**Krieg AM.** Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jun;5(6):471-84.

**Kronenberg M, Rudensky A.** Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature.* 2005 Jun 2;435(7042):598-604.

**Kumar A, Arora R, Kaur P, Chauhan VS, Sharma P.** "Universal" T helper cell determinants enhance immunogenicity of a Plasmodium falciparum merozoite surface antigen peptide. *J Immunol.* 1992 Mar 1;148(5):1499-505.

**Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC.** Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol.* 2005 Sep;17(5):518-22.

ℒ

---

**Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, Perron H, Feugeas O, Furstenberger P, Oberling F, Brambilla E, Behr JP.** An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.* 1996 Nov;3(11):1010-7.

**Ladogana A, Casaccia P, Ingrosso L, Cibati M, Salvatore M, Xi YG, Masullo C, Pocchiari M.** Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol.* 1992 Mar;73 ( Pt 3):661-5.

**Laurent M.** Les prions: entre dogmes et réalités. *MedSci(Paris).* 1998; 14(4): 475-8.

**Lauwereys M, Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Kinne J, Holzer W, De Genst E, Wyns L, Muyldermans S.** Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.* 1998 Jul 1;17(13):3512-20.

**Lawrence LJ, Kortt AA, Iliades P, Tulloch PA, Hudson PJ.** Orientation of antigen binding sites in dimeric and trimeric single chain Fv antibody fragments. *FEBS Lett.* 1998 ; 425 (3) : 479-84.

**Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Schock HB, Zhang H, Faris JE, Way PA, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW.** Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol (Basel).* 2000;104:33-43.

**Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB.** Synthetic mammalian prions. *Science.* 2004 Jul 30;305(5684):673-6.

**Lehmann S, Harris DA.** A mutant prion protein displays an aberrant membrane association when expressed in cultured cells. *J Biol Chem.* 1995 Oct 13;270(41):24589-97.

**Lemieux P, Guerin N, Paradis G, Proulx R, Chistyakova L, Kabanov A, Alakhov V.** A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther.* 2000 Jun;7(11):986-91.

**Letchford K, Burt H.** A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007 Mar;65(3):259-69.

**Liautard JP, Alvarez-Martinez MT, Feraudet C, Torrent J.** La protéine prion: structure, dynamique et conversion in vitro. *Medecine/Sciences.* 2002 Janvier;1:62-69.

**Liaw J, Chang SF, Hsiao FC.** In vivo gene delivery into ocular tissues by eye drops of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) polymeric micelles. *Gene Ther.* 2001 Jul;8(13):999-1004.

**Lin CR, Tai MH, Cheng JT, Chou AK, Wang JJ, Tan PH, Marsala M, Yang LC.** Electroporation for direct spinal gene transfer in rats. *Neurosci Lett.* 2002 Jan 4;317(1):1-4.

**Liu F, Huang L.** Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 2002 Aug;9(16):1116-9.

**Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG.** Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet.* 2004 Feb 7;363(9407):417-21.

**LoBuglio AF, Wheeler RH, Trang J, Haynes A, Rogers K, Harvey EB, Sun L, Ghrayeb J, Khazaeli MB.** Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jun;86(11):4220-4.

**Loftus B, Rogers M.** Characterization of a prion protein (PrP) gene from rabbit; a species with apparent resistance to infection by prions. *Gene.* 1997 Jan 15;184(2):215-9.

**Lorenzen N, LaPatra SE.** DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev Sci Tech.* 2005 Apr;24(1):201-13.

**Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE.** DNA vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 1997 Dec;75(6):591-4.

**Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA.** Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Ther.* 2003 Jan;10(2):131-42.

**Lu QL, Liang HD, Partridge T, Blomley MJ.** Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther.* 2003 Mar;10(5):396-405.

**Lu S.** Combination DNA plus protein HIV vaccines. *Springer Semin Immunopathol.* 2006 Nov;28(3):255-65.

**Luo GX, Kohlstaedt LA, Charles CH, Gorfain E, Morantte I, Williams JH, Fang F.** Humanization of an anti-ICAM-1 antibody with over 50-fold affinity and functional improvement. *J Immunol Methods.* 2003 ; 275 (1-2) : 31-40.

M

**Mabbott NA, Bruce ME, Botto M, Walport MJ, Pepys MB.** Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med.* 2001 Apr;7(4):485-7.

**Mabbott NA, Mackay F, Minns F, Bruce ME.** Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med.* 2000 Jul;6(7):719-20.

**Mabbott NA, Young J, McConnell I, Bruce ME.** Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol.* 2003 Jun;77(12):6845-54.

**MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, Chattergoon MA, Baine Y, Higgins TJ, Ciccarelli RB, Coney LR, Ginsberg RS, Weiner DB.** First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis.* 1998 Jul;178(1):92-100.

**Mach JP, Carrel S, Merenda C, Sordat B, Cerottini JC.** In vivo localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice. *Nature.* 1974 Apr 19;248(450):704-6.

**Mach JP, Chatal JF, Lumbroso JD, Buchegger F, Forni M, Ritschard J, Berche C, Douillard JY, Carrel S, Herlyn M, et al.** Tumor localization in patients by radiolabeled monoclonal antibodies against colon carcinoma. *Cancer Res.* 1983 Nov;43(11):5593-600.

**Magri G, Clerici M, Dall'Ara P, Biasin M, Caramelli M, Casalone C, Giannino ML, Longhi R, Piacentini L, Della Bella S, Gazzuola P, Martino PA, Della Bella S, Pollera C, Puricelli M, Servida F, Crescio I, Boasso A, Ponti W, Poli G.** Decrease in pathology and progression of scrapie after immunisation with synthetic prion protein peptides in hamsters. *Vaccine.* 2005 Apr 22;23(22):2862-8.

**Mahato RI, Takakura Y, Hashida M.** Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1997;14(2):133-72.

**Maloy KJ, Powrie F.** Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2001 Sep;2(9):816-22.

**Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J.** 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol.* 1994 Apr-Jun;8(2-3):121-7.

**Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR.** Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett.* 2002 Feb 13;512(1-3):25-8.

**Maruyama H, Ataka K, Higuchi N, Sakamoto F, Gejyo F, Miyazaki J.** Skin-targeted gene transfer using in vivo electroporation. *Gene Ther.* 2001 Dec;8(23):1808-12.

**Matano T, Kano M, Nakamura H, Takeda A, Nagai Y.** Rapid appearance of secondary immune responses and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA prime/Sendai virus vector boost regimen. *J Virol.* 2001 Dec;75(23):11891-6.

**Mathiesen I.** Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Ther.* 1999 Apr;6(4):508-14.

**Matsuda T, Cepko CL.** Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 6;101(1):16-22.

**Matsumoto T, Komori K, Shoji T, Kuma S, Kume M, Yamaoka T, Mori E, Furuyama T, Yonemitsu Y, Sugimachi K.** Successful and optimized in vivo gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse. *Gene Ther.* 2001 Aug;8(15):1174-9.

**Matucci A, Zanusso G, Gelati M, Farinazzo A, Fiorini M, Ferrari S, Andrighetto G, Cestari T, Caramelli M, Negro A, Morbin M, Chiesa R, Monaco S, Tridente G.** Analysis of mammalian scrapie protein by novel monoclonal antibodies recognizing distinct prion protein glycoforms: an immunoblot and immunohistochemical study at the light and electron microscopic levels. *Brain Res Bull.* 2005 Mar 15;65(2):155-62.

**McKenzie D, Kaczowski J, Marsh R, Aiken J.** Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection. *J Virol.* 1994 Nov;68(11):7534-6.

**Melchers F, Rolink AR.** B cell tolerance--how to make it and how to break it. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;305:1-23.



**Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Manuelidis L, Manuelidis EE.** Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*. 1983 Dec 1-7;306(5942):474-6.

**Mir LM, Belehradek M, Domenge C, Orlowski S, Poddevin B, Belehradek J Jr, Schwaab G, Luboinski B, Paoletti C.** [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial] *C R Acad Sci III*. 1991;313(13):613-8.

**Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D.** High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 13;96(8):4262-7.

**Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D.** High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 13;96(8):4262-7.

**Molina F, Laune D, Gougat C, Pau B, Granier C.** Improved performances of spot multiple peptide synthesis. *Pept Res*. 1996 May-Jun;9(3):151-5.

**Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F, Aguzzi A, Weissmann C.** Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*. 2000 May 19;288(5469):1257-9.

**Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F, Aguzzi A, Weissmann C.** Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*. 2000 May 19;288(5469):1257-9.

**Moore RC, Hope J, McBride PA, McConnell I, Selfridge J, Melton DW, Manson JC.** Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat Genet*. 1998 Feb;18(2):118-25.

**Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT.** Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Nov;81(21):6851-5.

**Mosmann TR, Coffman RL.** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.

**Mossman SP, Pierce CC, Watson AJ, Robertson MN, Montefiori DC, Kuller L, Richardson BA, Bradshaw JD, Munn RJ, Hu SL, Greenberg PD, Benveniste RE, Haigwood NL.** Protective immunity to SIV challenge elicited by vaccination of macaques with multigenic DNA vaccines producing virus-like particles. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 Apr;20(4):425-34.

**Moya KL, Hassig R, Creminon C, Laffont I, Di Giamberardino L.** Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrPc in peripheral nerve. *J Neurochem.* 2004 Jan;88(1):155-60.

**Muller S, Kehm R, Handermann M, Jakob NJ, Bahr U, Schroder B, Darai G.** Testing the possibility to protect bovine PrPC transgenic Swiss mice against bovine PrPSc infection by DNA vaccination using recombinant plasmid vectors harboring and expressing the complete or partial cDNA sequences of bovine PrPC. *Virus Genes.* 2005 Mar;30(2):279-96.

*n*

---

**Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, Furukawa H, Takahashi M, Yamauchi A, Kataoka Y.** Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004;17(3):158-63.

**Neuberger M, Bruggemann M.** Monoclonal antibodies. Mice perform a human repertoire. *Nature.* 1997 ; 386 (6620) : 25-6.

**Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH.** Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1982;1(7):841-5.

**Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP.** Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):345-8.

**Nguyen van Binh P, Duc HT.** Analyses and perspectives in cancer immunotherapy. *Biomed Pharmacother.* 2006 Nov;60(9):621-8.

**Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ.** Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Nov 27;772:30-9.

**Nicklas W.** Aluminum salts. *Res Immunol.* 1992 Jun;143(5):489-94; discussion 574.

**Nikles D, Bach P, Boller K, Merten CA, Montrasio F, Heppner FL, Aguzzi A, Cichutek K, Kalinke U, Buchholz CJ.** Circumventing tolerance to the prion protein (PrP): vaccination with PrP-displaying retrovirus particles induces humoral immune responses against the native form of cellular PrP. *J Virol.* 2005 Apr;79(7):4033-42.

**Nishida N, Harris DA, Vilette D, Laude H, Frobert Y, Grassi J, Casanova D, Milhavet O, Lehmann S.** Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol.* 2000 Jan;74(1):320-5.

**Nitschke C, Flechsig E, van den Brandt J, Lindner N, Luhrs T, Dittmer U, Klein MA.** Immunisation strategies against prion diseases: Prime-boost immunisation with a PrP DNA vaccine containing foreign helper T-cell epitopes does not prevent mouse scrapie. *Vet Microbiol.* 2007 Apr 5.

0

---

**Oboznaya MB, Gilch S, Titova MA, Koroev DO, Volkova TD, Volpina OM, Schatzl HM.** Antibodies to a nonconjugated prion protein peptide 95-123 interfere with PrP( Sc ) propagation in prion-infected cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2007 May;27(3):271-84.

**Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al.** A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* 1985 Apr;40(4):735-46.

**Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al.** A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* 1985 Apr;40(4):735-46.

**O'Garra A, Vieira P.** Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):801-5.

**Otten G, Schaefer M, Doe B, Liu H, Srivastava I, zur Megede J, O'Hagan D, Donnelly J, Widera G, Rabussay D, Lewis MG, Barnett S, Ulmer JB.** Enhancement of DNA vaccine potency in rhesus macaques by electroporation. *Vaccine.* 2004 Jun 23;22(19):2489-93.

P

---

**Padiolleau-Lefevre S, Alexandrenne C, Dkhissi F, Clement G, Essono S, Blache C, Couraud JY, Wijkhuisen A, Boquet D.** Expression and detection strategies for an scFv fragment retaining the same high affinity than Fab and whole antibody: Implications for therapeutic use in prion diseases. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(8):1888-96.

**Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al.** Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):10962-6.

**Passalacqua G, Durham SR; Global Allergy and Asthma European Network.** Allergic rhinitis and its impact on asthma update: allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Apr;119(4):881-91.

**Pauly PC, Harris DA.** Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem.* 1998 Dec 11;273(50):33107-10.

**Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB.** Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature.* 2001 Aug 16;412(6848):739-43.

**Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB.** Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature.* 2001 Aug 16;412(6848):739-43.

**Perrier V, Solassol J, Crozet C, Frobert Y, Mourton-Gilles C, Grassi J, Lehmann S.** Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPC degradation. *J Neurochem.* 2004 Apr;89(2):454-63.

**Perrier V, Solassol J, Crozet C, Frobert Y, Mourton-Gilles C, Grassi J, Lehmann S.** Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPC degradation. *J Neurochem.* 2004 Apr;89(2):454-63.

**Pietersz GA, Tang CK, Apostolopoulos V.** Structure and design of polycationic carriers for gene delivery. *Mini Rev Med Chem.* 2006 Dec;6(12):1285-98.

**Pinkas L, Robins PD, Forstrom LA, Mahoney DW, Mullan BP.** Clinical experience with radiolabelled monoclonal antibodies in the detection of colorectal and ovarian carcinoma recurrence and review of the literature. *Nucl Med Commun.* 1999 Aug;20(8):689-96.

**Pitard B, Pollard H, Agbulut O, Lambert O, Vilquin JT, Cherel Y, Abadie J, Samuel JL, Rigaud JL, Menoret S, Anegon I, Escande D.** A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum Gene Ther.* 2002 Sep 20;13(14):1767-75.

**Plank C, Mechtler K, Szoka FC Jr, Wagner E.** Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther.* 1996 Aug 1;7(12):1437-46.

**Pluckthun A, Pack P.** New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology.* 1997 ; 3 (2) : 83-105.

**Pluckthun A, Skerra A.** Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli. *Methods Enzymol.* 1989 ; 178 : 497-504.

**Polymenidou M, Heppner FL, Pelliccioli EC, Urich E, Miele G, Braun N, Wopfner F, Schatzl HM, Becher B, Aguzzi A.** Humoral immune response to native eukaryotic prion protein correlates with anti-prion protection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14670-6.

**Powell K.** DNA vaccines--back in the saddle again? *Nat Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):799-801.

**Powrie F, Maloy KJ.** Immunology. Regulating the regulators. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1030-1.

**Presta LG.** Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Aug 7;58(5-6):640-56.

**Primus FJ, Wang RH, Goldenberg DM, Hansen HJ.** Localization of human GW-39 tumors in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 1973 Nov;33(11):2977-82.

**Prusiner SB.** Molecular biology of prion diseases. *Science.* 1991 Jun 14;252(5012):1515-22.

**Prusiner SB.** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982 Apr 9;216(4542):136-44.

**R**

---

**Race R, Chesebro B.** Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature*. 1998 Apr 23;392(6678):770.

**Race R, Oldstone M, Chesebro B.** Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol*. 2000 Jan;74(2):828-33.

**Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC.** Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol*. 2005 Sep;23(9):1073-8.

**Reik LM, Maines SL, Ryan DE, Levin W, Bandiera S, Thomas PE.** A simple, non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. Isolation of monoclonal antibodies against cytochrome P450 isozymes. *J Immunol Methods*. 1987 Jun 26;100(1-2):123-30.

**Rheinnecker M, Hardt C, Ilag LL, Kufer P, Gruber R, Hoess A, Lupas A, Rottenberger C, Pluckthun A, Pack P.** Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *J Immunol*. 1996 ; 157 (7) : 2989-97.

**Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, Costa P, Mathiesen I, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R, La Monica N, Fattori E.** Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 25;96(11):6417-22.

**Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, Manson KH, Kalish ML, Lifson JD, Rizvi TA, Lu S, Hu SL, Mazzara GP, Panicali DL, Herndon JG, Glickman R, Candido MA, Lydy SL, Wyand MS, McClure HM.** Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat Med*. 1999 May;5(5):526-34.

**Rols MP, Bachaud JM, Giraud P, Chevreau C, Roche H, Teissie J.** Electrochemotherapy of cutaneous metastases in malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2000 Oct;10(5):468-74.

**Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, et al.** Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med.* 1990 Aug 30;323(9):570-8.

**Rosset MB, Ballerini C, Gregoire S, Metharom P, Carnaud C, Aucouturier P.** Breaking immune tolerance to the prion protein using prion protein peptides plus oligodeoxynucleotide-CpG in mice. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5168-74.

**Roux E, Metchnikoff M.** Sur la propriété bactéricide du sang de rat. *Annales de l'Institut Pasteur.* 1891 : 479-486.

**Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, Crosti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rugarli C, Manfredi AA.** Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol.* 1998 Nov 1;161(9):4467-71.

## S

---

**Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T.** Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:18-32.

**Sandhu JS.** Protein engineering of antibodies. *Crit Rev Biotechnol.* 1992;12(5-6):437-62.

**Satkauskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, Miklavcic D, Mir LM.** Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. *Mol Ther.* 2002 Feb;5(2):133-40.

**Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E.** Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science.* 1996 Jul 19;273(5273):352-4.

**Scarpino S, Di Napoli A, Stoppacciaro A, Antonelli M, Pilozi E, Chiarle R, Palestro G, Marino M, Facciolo F, Rendina EA, Webster KE, Kinkel SA, Scott HS, Ruco L.** Expression of autoimmune regulator gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol.* 2007 Jun 22.

**Scheerlinck JP, Karlis J, Tjelle TE, Presidente PJ, Mathiesen I, Newton SE.** In vivo electroporation improves immune responses to DNA vaccination in sheep. *Vaccine.* 2004 Apr 16;22(13-14):1820-5.

**Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, Gansbacher B, Plank C.** Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 2002 Jan;9(2):102-9.

**Scherman D, Bessodes M, Cameron B, Herscovici J, Hofland H, Pitard B, Soubrier F, Wils P, Crouzet J.** Application of lipids and plasmid design for gene delivery to mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol.* 1998 Oct;9(5):480-5.

**Schratzberger P, Krainin JG, Schratzberger G, Silver M, Ma H, Kearney M, Zuk RF, Brisken AF, Losordo DW, Isner JM.** Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle. *Mol Ther.* 2002 Nov;6(5):576-83.

**Schuster M, Nechansky A, Kircheis R.** Cancer immunotherapy. *Biotechnol J.* 2006 Feb;1(2):138-47.

**Schwarz A, Kratke O, Burwinkel M, Riemer C, Schultz J, Henklein P, Bamme T, Baier M.** Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. *Neurosci Lett.* 2003 Oct 30;350(3):187-9.

**Sethi S, Lipford G, Wagner H, Kretzschmar H.** Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet.* 2002 Jul 20;360(9328):229-30.

**Siberil S, Dutertre CA, Boix C, Bonnin E, Menez R, Stura E, Jorieux S, Fridman WH, Teillaud JL.** Molecular aspects of human Fc $\gamma$ R interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett.* 2006 Aug 15;106(2):111-8.

**Sigurdsson B.** A chronic encephalitis of sheep. *Br.Vet.J.* 1954;110:341-54.

**Sigurdsson EM, Brown DR, Daniels M, Kascsak RJ, Kascsak R, Carp R, Meeker HC, Frangione B, Wisniewski T.** Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol.* 2002 Jul;161(1):13-7.



**Simoons ML, de Boer MJ, van den Brand MJ, van Miltenburg AJ, Hoorntje JC, Heyndrickx GR, van der Wieken LR, de Bono D, Rutsch W, Schaible TF, et al.** Randomized trial of a GPIIb/IIIa platelet receptor blocker in refractory unstable angina. European Cooperative Study Group. *Circulation*. 1994 Feb;89(2):596-603.

**Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F.** Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2001 Aug;182:190-200.

**Solfrosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Maslah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA.** Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1514-6.

**Souan L, Tal Y, Felling Y, Cohen IR, Taraboulos A, Mor F.** Modulation of proteinase-K resistant prion protein by prion peptide immunization. *Eur J Immunol*. 2001 Aug;31(8):2338-46.

**STASNEY J, CANTAROW A, PASCHKIS KE.** Production of neoplasms by injection of fractions of mammalian neoplasms. *Cancer Res*. 1950 Dec;10(12):775-82.

**Strugnell RA, Drew D, Mercieca J, DiNatale S, Firez N, Dunstan SJ, Simmons CP, Vadolas J.** DNA vaccines for bacterial infections. *Immunol Cell Biol*. 1997 Aug;75(4):364-9.

7

---

**Tacket CO, Roy MJ, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R.** Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine*. 1999 Jul 16;17(22):2826-9.

**Tagliavini F, Forloni G, Colombo L, Rossi G, Girola L, Canciani B, Angeretti N, Giampaolo L, Peressini E, Awan T, De Gioia L, Ragg E, Bugiani O, Salmona M.** Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro. *J Mol Biol*. 2000 Jul 28;300(5):1309-22.

**Tal Y, Souan L, Cohen IR, Meiner Z, Taraboulos A, Mor F.** Complete Freund's adjuvant

immunization prolongs survival in experimental prion disease in mice. *J Neurosci Res.* 2003 Jan 15;71(2):286-90.

**Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R, Weissman JS.** Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature.* 2004 Mar 18;428(6980):323-8.

**Tang DC, DeVit M, Johnston SA.** Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 1992 Mar 12;356(6365):152-4.

**Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Aoki M, Yamamoto S, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R.** Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther.* 2002 Mar;9(6):372-80.

**Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB.** Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell.* 1995 Oct 6;83(1):79-90.

**Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA.** Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003 May;4(5):346-58.

**Thompson C, Powrie F.** Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2004 Aug;4(4):408-14.

**Thullier P, Lafaye P, Megret F, Deubel V, Jouan A, Mazie JC.** A recombinant Fab neutralizes dengue virus *in vitro*. *J Biotechnol.* 1999 ; 69 (2-3) : 183-90.

**Timares L, Takashima A, Johnston SA.** Quantitative analysis of the immunopotency of genetically transfected dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13147-52.

**Titomirov AV, Sukharev S, Kistanova E.** In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Jan 17;1088(1):131-4.

**Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ.** Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods.* 2001 ; 248 (1-2) : 47-66.

**Tollefsen S, Tjelle T, Schneider J, Harboe M, Wiker H, Hewinson G, Huygen K, Mathiesen I.** Improved cellular and humoral immune responses against Mycobacterium tuberculosis antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation. *Vaccine*. 2002 Sep 10;20(27-28):3370-8.

**Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, Uejima H, Ohguma A, Tanaka S, Oshimura M, Ishida I.** Double transchromosomal mice : Maintenance of two individual human chromosome fragments containing immunoglobulin heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000 ; 97, 722-727.

**Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL.** Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol*. 1997 May 15;158(10):4529-32.

**Tymciu S, Durieux-Alexandrenne C, Wijkhuisen A, Creminon C, Frobert Y, Grassi J, Couraud JY, Boquet D.** Enhancement of antibody responses in DNA vaccination using a vector encoding a universal T-helper cell epitope. *DNA Cell Biol*. 2004 Jun;23(6):395-402.

**Tymciu S, Wijkhuisen A, Sagot MA, Frobert Y, Grassi J, Creminon C, Couraud JY, Boquet D.** Use of DNA immunization to produce polyclonal antibodies against the native human neurokinin-1 receptor for substance P. *J Neuroimmunol*. 2002 Jul;128(1-2):23-30.

*u*

---

**Uchida N, Sutton RE, Frieria AM, He D, Reitsma MJ, Chang WC, Veres G, Scollay R, Weissman IL.** HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 29;95(20):11939-44.

**Ulmer JB, Deck RR, Dewitt CM, Donnelly JJ, Liu MA.** Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology*. 1996 Sep;89(1):59-67.

**Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Fu TM, Donnelly JJ, Caulfield MJ, Liu MA.** Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity. *Vaccine*. 1997 Jun;15(8):839-41.

**Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, et al.** Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993 Mar 19;259(5102):1745-9.

**Ulmer JB, Wahren B, Liu MA.** Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med*. 2006 May;12(5):216-22.

*V. W*

---

**van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP.** Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol*. 1996 May;34(5):1228-31.

**van Rheede T, Smolenaars MM, Madsen O, de Jong WW.** Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Mol Biol Evol*. 2003 Jan;20(1):111-21.

**Verhoeyen M, Milstein C, Winter G.** Reshaping human antibodies : grafting an antilysozyme activity. *Science*. 1988 ; 239 (4847) : 1534-6.

**Vermout S, Denis M, Losson B, Mignon B.** Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann. Méd. Vét.* 2003; 147:393-401.

**Waldmann TA.** Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med*. 2003 Mar;9(3):269-77.

**Wang B, Merva M, Dang K, Ugen KE, Boyer J, Williams WV, Weiner DB.** DNA inoculation induces protective in vivo immune responses against cellular challenge with HIV-1 antigen-expressing cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10 Suppl 2:S35-41.

**Wang B, Ugen KE, Srikantan V, Agadjanyan MG, Dang K, Refaeli Y, Sato AI, Boyer J, Williams WV, Weiner DB.** Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May 1;90(9):4156-60.

**Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, Jones TR, Hobart P, Margalith M, Ng J, Weiss WR, Sedegah M, de Taisne C, Norman JA, Hoffman SL.** Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science*. 1998 Oct 16;282(5388):476-80.

**Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths TG, Pacchione SJ, Barnum AB, Harper LB, Pauley CJ, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Rizzuto G, Ciliberto G, Fattori E, Monica NL, Manam S, Ledwith BJ.** Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther.* 2004 Apr;11(8):711-21.

**Weeratna RD, Wu T, Efler SM, Zhang L, Davis HL.** Designing gene therapy vectors: avoiding immune responses by using tissue-specific promoters. *Gene Ther.* 2001 Dec;8(24):1872-8.

**Weir AN, Nesbitt A, Chapman AP, Popplewell AG, Antoniw P, Lawson AD.** Formatting antibody fragments to mediate specific therapeutic functions. *Biochem Soc Trans.* 2002 ; 30 (4) : 512-6.

**Weissmann C, Enari M, Klohn PC, Rossi D, Flechsig E.** Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99 Suppl 4:16378-83.

**Weissmann C.** A 'unified theory' of prion propagation. *Nature.* 1991 Aug 22;352(6337):679-83.

**Wells GA, Dawson M, Hawkins SA, Green RB, Dexter I, Francis ME, Simmons MM, Austin AR, Horigan MW.** Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec.* 1994 Jul 9;135(2):40-1.

**White AR, Enever P, Tayebi M, Mushens R, Linehan J, Brandner S, Anstee D, Collinge J, Hawke S.** Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature.* 2003 Mar 6;422(6927):80-3.

**Will H, Cattaneo R, Koch HG, Darai G, Schaller H, Schellekens H, van Eerd PM, Deinhardt F.** Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature.* 1982 Oct 21;299(5885):740-2.

**Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL.** Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465-8.

**Wood KJ, Sakaguchi S.** Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):199-210.

X. Y. Z

**Xi YG, Ingrosso L, Ladogana A, Masullo C, Pocchiari M.** Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation. *Nature*. 1992 Apr 16;356(6370):598-601.

**Xing Z, Carters TJ.** Heterologous boost vaccines for bacillus Calmette-Guerin prime immunization against tuberculosis. *Expert Rev Vaccines*. 2007 Aug;6(4):539-46.

**Xu L, Sanchez A, Yang Z, Zaki SR, Nabel EG, Nichol ST, Nabel GJ.** Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med*. 1998 Jan;4(1):37-42.

**Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S.** Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Vaccine*. 2006 Apr 5;24(15):2815-23.

**Yasuda K, Wagner H, Takakura Y.** Role of immunostimulatory DNA and TLR9 in gene therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2006;23(2):89-110.

**Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J.** Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res*. 1992 ; 52 (12) : 3402-8.

**Yokoyama T, Itohara S, Yuasa N.** Detection of species specific epitopes of mouse and hamster prion proteins (PrPs) by anti-peptide antibodies. *Arch Virol*. 1996;141(3-4):763-9.

**Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ.** Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):18997-9007.

**Zanusso G, Liu D, Ferrari S, Hegyi I, Yin X, Aguzzi A, Hornemann S, Liemann S, Glockshuber R, Manson JC, Brown P, Petersen RB, Gambetti P, Sy MS.** Prion protein expression in different species: analysis with a panel of new mAbs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8812-6.

**Zeira E, Manevitch A, Khatchatourians A, Pappo O, Hyam E, Darash-Yahana M, Tavor E, Honigman A, Lewis A, Galun E.** Femtosecond infrared laser-an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression. *Mol Ther*. 2003 Aug;8(2):342-50.

**Zeira E, Manevitch A, Manevitch Z, Kedar E, Gropp M, Daudi N, Barsuk R, Harati M, Yotvat H, Troilo PJ, Griffiths Ii TG, Pacchione SJ, Roden DF, Niu Z, Nussbaum O, Zamir G, Papo O, Hemo I, Lewis A, Galun E.** Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization. *FASEB J.* 2007 Jun 15

**Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, Dean DA, Liu D.** Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther.* 2004 Apr;11(8):675-82.

**Zhang L, Nolan E, Kreitschitz S, Rabussay DP.** Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Aug 15;1572(1):1-9.

**Zhang L, Widera G, Blecher S, Zaharoff DA, Mossop B, Rabussay D.** Accelerated immune response to DNA vaccines. *DNA Cell Biol.* 2003 Dec;22(12):815-22.

## **VI. ANNEXES**



# Guidance for Industry

## Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications

### DRAFT GUIDANCE

**This guidance document is being distributed for comment purposes only.**

Submit comments on this draft guidance by the date provided in the *Federal Register* notice announcing the availability of the draft guidance. Submit comments to the Division of Dockets Management (HFA-305), Food and Drug Administration, 5630 Fishers Lane, rm. 1061, Rockville, MD 20852. You should identify all comments with the docket number listed in the notice of availability that publishes in the *Federal Register*.

Additional copies of this draft guidance are available from the Office of Communication, Training and Manufacturers Assistance (HFM-40), 1401 Rockville Pike, Rockville, MD 20852-1448, or by calling 1-800-835-4709 or 301-827-1800, or from the Internet at <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

For questions on the content of this draft guidance, contact Herbert A. Smith, Ph.D., at (301) 827-3070.

U.S. Department of Health and Human Services  
Food and Drug Administration  
Center for Biologics Evaluation and Research  
February 2005

---

*Contains Nonbinding Recommendations**Draft – Not for Implementation***TABLE OF CONTENTS**

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>MANUFACTURING ISSUES .....</b>	<b>2</b>
	<b>A. Product Manufacture .....</b>	<b>3</b>
	<b>B. Bulk Plasmid Product Release Testing .....</b>	<b>3</b>
	<b>C. Final Product Release Testing .....</b>	<b>4</b>
<b>III.</b>	<b>DNA VACCINE MODIFICATIONS.....</b>	<b>5</b>
	<b>A. Changes to the Insert or Vector.....</b>	<b>5</b>
	<b>B. DNA Sequence Analysis .....</b>	<b>5</b>
<b>IV.</b>	<b>PRECLINICAL IMMUNOGENICITY AND SAFETY.....</b>	<b>6</b>
	<b>A. General Considerations .....</b>	<b>6</b>
	<b>B. Immunogenicity.....</b>	<b>6</b>
	<b>C. Autoimmunity .....</b>	<b>6</b>
	<b>D. Tolerance .....</b>	<b>7</b>
	<b>E. Challenge/Protection, Cytokines, Prime/Boost .....</b>	<b>7</b>
	<b>F. Local Reactogenicity and Systemic Toxicity Studies .....</b>	<b>7</b>
	<b>G. Biodistribution and Integration Analysis .....</b>	<b>8</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>9</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERENCES: REGULATIONS AND APPLICABLE GUIDANCE DOCUMENTS, AND RELEVANT PUBLICATIONS .....</b>	<b>10</b>

*Contains Nonbinding Recommendations*

*Draft – Not for Implementation*

## **Guidance for Industry**

### **Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications**

*This draft guidance, when finalized, will represent the Food and Drug Administration's (FDA's) current thinking on this topic. It does not create or confer any rights for or on any person and does not operate to bind FDA or the public. You can use an alternative approach if the approach satisfies the requirements of the applicable statutes and regulations. If you want to discuss an alternative approach, contact the appropriate FDA staff. If you cannot identify the appropriate FDA staff, call the appropriate number listed on the title page of this guidance.*

#### **I. INTRODUCTION**

In December 1996, FDA issued a guidance document, "Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications," to assist the developers of DNA vaccines. That document delineated the manufacturing, preclinical, and clinical issues relevant to the development of DNA vaccines, and described potential safety concerns that we, FDA's Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), recommended vaccine developers address prior to the initiation of phase 1 clinical studies. The recommendations for DNA vaccine manufacture and testing provided in that document were based on our experiences with other types of vaccines and DNA-based products, including gene therapy agents.

In the intervening years, we have concurred with the initiation of phase 1 clinical studies of DNA vaccines for a number of infectious disease indications including malaria, hepatitis B, and human immunodeficiency virus (HIV). The initiation of phase 1 clinical studies is predicated on you, the manufacturers and/or sponsors of vaccine clinical studies, documenting the quality and consistency of plasmid manufacture, combined with extensive preclinical safety studies. Considerable clinical experience has been accumulated since the issuance of the above 1996 guidance on plasmid DNA vaccines, and we need to update that guidance. This guidance, when finalized, will update and replace the 1996 guidance document.

FDA helps ensure that clinical studies provide critical information on vaccine safety and immunogenicity without placing undue or unreasonable demands on vaccine study sponsors. Ongoing interactions between FDA and vaccine study sponsors are designed to achieve these goals. This update to the 1996 Points to Consider document describes our current recommendations for the development and testing of DNA vaccines.

**Contains Nonbinding Recommendations***Draft – Not for Implementation*

For the purposes of this document, DNA vaccines are defined as purified preparations of plasmid DNA designed to contain one or more genes from a pathogen as well as regulatory genetic elements to enable production in a bacterial host system. Typically, these plasmids possess DNA sequences necessary for selection and replication in bacteria. In addition, they contain eukaryotic promoters and enhancers as well as transcription termination/polyadenylation sequences to promote gene expression in vaccine recipients, and may contain immunomodulatory elements. DNA vaccines are biological products as set forth in section 351 of the Public Health Service Act (PHS) (42 U.S.C. 262) and are regulated by CBER. The principal regulations applicable to DNA vaccines are located in 21 CFR Parts 210, 211, 600, 601, and 610. Other guidance documents are available from CBER and may contain information that is relevant to DNA vaccines. Some of these documents are listed below and additional guidance documents may be found on the CBER website (<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>) or the CDER website (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>).

This document is intended to assist you in your development of DNA vaccines to prevent infectious diseases. This guidance is not necessarily applicable to DNA vaccines for the treatment of established diseases (infectious or malignant), since subjects with ongoing disease may require more aggressive therapy with a different margin of safety than prophylactic vaccines administered to healthy individuals. Applications for DNA vaccines designed to prevent or treat infectious diseases should be submitted to CBER's Office of Vaccines Research and Review (OVRR) where primary review responsibility is assigned. Plasmid DNA products intended for non-infectious therapeutic indications are not addressed in this guidance. Applications for these products should be submitted to CBER's Office of Cellular, Tissue and Gene Therapies (OCTGT).

FDA's guidance documents, including this guidance, do not establish legally enforceable responsibilities. Instead, guidances describe FDA's current thinking on a topic and should be viewed only as recommendations, unless specific regulatory or statutory requirements are cited. The use of the word *should* in FDA's guidances means that something is suggested or recommended, but not required.

**II. MANUFACTURING ISSUES**

The following sections describe the manufacturing information we recommend that you submit to us for a new DNA vaccine product for clinical study under an Investigational New Drug Application (IND).

***Contains Nonbinding Recommendations******Draft – Not for Implementation*****A. Product Manufacture**

We recommend that the manufacturing summary describe all components used during manufacture as well as those present in the final product. We recommend that you provide detailed descriptions of the plasmid construction, including the source and diagrams of all plasmids used, and all intermediate recombinant DNA cloning procedures. We recommend that the DNA sequence of the entire plasmid be provided by direct sequencing of the plasmid present in the Master Cell Bank (MCB). During production, other methods of sequence verification, such as restriction enzyme mapping and polymerase chain reaction (PCR) may be employed at intermediate steps.

We recommend that you describe the genotype, phenotype, source of the bacterial cells and the procedures to construct master and working cell banks used for production. Specific guidance for the establishment of MCBs and Working Cell Banks (WCBs) is described in the “Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals (1993)”.<sup>1</sup> We recommend that you test both the MCBs and WCBs to ensure that they are free from bacteriophage and other adventitious agent contamination, and that you establish the genetic stability of the MCB and WCB.

We recommend that the description of the manufacturing process be sufficiently detailed to enable an assessment of the safety of the product. If changes in product manufacture occur during the development of plasmid products intended for clinical studies and preclinical lots manufactured for safety evaluation, we recommend that you provide a clear summary illustrating all differences between lots of vaccine used in preclinical studies and those intended for use in clinical studies.

**B. Bulk Plasmid Product Release Testing**

If bulk and final product are the same (i.e., if production runs yield one lot and no further steps in formulation are performed), then testing as described below may be redundant and unnecessary. We recommend that you test bulk plasmid products for the properties described below, and that you use standard assay(s) of adequate specificity and sensitivity. We recommend that you evaluate assay methods by testing known amounts of reference materials or spiked samples, or by other appropriate measures, and that you submit to CBER data documenting assay performance. In addition to bulk and final product release testing, we recommend that you also perform in-process testing to ensure manufacturing consistency and product safety. Prior to the initiation of phase 1 clinical studies, we recommend that you initiate stability testing as early as possible to support use of the product for the duration of the proposed clinical investigation.

---

<sup>1</sup> Document is available on CBER’s website at: (<http://www.fda.gov/guidelines.htm>).

**Contains Nonbinding Recommendations***Draft – Not for Implementation*

Typically, the bulk release criteria will include tests for visual appearance and plasmid concentration. We recommend that the bulk release criteria describe the extent of circular plasmid present with establishment of a minimum specification. We recommend that you characterize the product for the extent of supercoiled plasmid in the bulk preparation and that you establish a minimum specification (preferably >80%). We recommend that you evaluate bulk plasmid preparations for the presence of bacterial host cell contaminants to include DNA, RNA, and protein and set limits for the maximum level of each of these contaminants. We generally recommend that host cell contaminants be at as low a concentration as is technically feasible. We recommend that you perform a test for pyrogenic substances and that you include the test results with the bulk release documentation. The Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test is a sensitive indicator of the presence of bacterial endotoxins and endotoxin contamination should not exceed 5.0 EU/kg body weight for the intended recipients.

We recommend that you include a test to establish the identity of the bulk product by restriction enzyme analysis in the bulk release criteria. When a single manufacturing facility is used to manufacture more than one DNA vaccine product, we recommend that you perform identity tests capable of distinguishing individual plasmids.

We recommend that you develop a potency assay. During early product development, we will allow sponsors considerable flexibility in the selection of potency assays. This could include *in vitro* measures of transfection efficiency that monitor the transcription and/or translation of the encoded gene(s). Assays that monitor *in vivo* immunogenicity of the DNA vaccine are preferred. We recommend that assays be quantitative. We recommend that as product development proceeds towards licensure, you provide evidence that *in vitro* potency correlates with *in vivo* immunogenicity. We recommend that sponsors maintain retention samples of each lot to facilitate comparisons between lots as assay development progresses. The selection and implementation of a potency assay may be discussed with CBER to ensure acceptability of the design.

**C. Final Product Release Testing**

We recommend that you test the final DNA vaccine product for potency, general safety, sterility, purity, quantity, and identity. The test methods and specifications may be the same as those employed for the bulk product release. To detect extraneous toxic contaminants potentially introduced during manufacture, we recommend that you perform the general safety test in mice and guinea pigs on each final product lot. If the plasmid product is lyophilized we recommend that you perform a test for residual moisture. We recommend that you perform a test for the presence of endotoxin on each lot of final product. In addition to final product release testing, we recommend that you also perform in-process testing to ensure manufacturing consistency and product safety.

***Contains Nonbinding Recommendations******Draft – Not for Implementation***

We recommend that you establish acceptance criteria and acceptable limits and that you report the results for each lot of vaccine to be used for clinical studies.

**III. DNA VACCINE MODIFICATIONS****A. Changes to the Insert or Vector**

Changes to the DNA sequence of the insert gene or vector sequences of a DNA vaccine would require the submission of a new IND (See section 351 of the PHS Act and 21 CFR Part 312). We recommend that you include in the IND a description of the manufacturing process and the results from preclinical safety evaluation of the new (modified) DNA vaccine.

**B. DNA Sequence Analysis**

An issue of product identity of particular relevance to DNA vaccines concerns the degree to which plasmids should be sequenced before the initiation of phase 1 clinical studies. In 1996, we recommended that manufacturers provide (at a minimum) the sequence of the protein-encoding gene insert. Based on evidence that the plasmid backbone may influence vaccine activity, and recognizing that technological advances since 1996 have facilitated DNA sequencing, we recommend that manufacturers provide the complete sequence of the plasmid before initiating phase 1 clinical studies.

Some DNA vaccines contain a complex mixture of plasmids, with each plasmid carrying a gene encoding a different antigenic protein. For example, a vaccine may contain multiple variants of a highly mutable gene (such as the gene encoding the envelope of HIV-1) or the entire genome of a microorganism may be 'shotgun cloned' into a common plasmid backbone. We advise you to establish the identity and amount of each plasmid component in the vaccine preparation to ensure lot-to-lot consistency. However, there may be instances when technical limitations prevent complete sequence information from being obtained on a heterogeneous mixture of plasmids before initiation of phase 1 clinical studies. In such instances, the amount of sequence information required will be evaluated on a case-by-case basis.

***Contains Nonbinding Recommendations******Draft – Not for Implementation***

organ-specific autoimmunity by encoding antigens (including cryptic antigens) that cross-react with self. Thus, we recommend that you continue to monitor the general well being of animals participating in preclinical immunogenicity and toxicity studies, and of all human trial participants. In cases of immunity developing against a transgene product (such as a cytokine), we recommend that you examine potential cross-reactivity with the corresponding endogenous protein. Studying an animal model using a construct containing the analogous animal gene is recommended to evaluate potential adverse effects.

**D. Tolerance**

Published studies to address whether DNA vaccines could induce neonatal tolerance yielded divergent results (see Section VI, References). Most DNA vaccines did not induce tolerance in neonatal animals, but idiosyncratic examples of neonatal tolerance have been observed (see Section VI, References). Tolerance has never been observed following vaccination of mature animals. Taken together, these studies suggest that the capacity of a DNA vaccine to induce tolerance may depend on the nature of the encoded antigen and the age at which, and frequency with which, the vaccine is administered. Based on these findings and other considerations, we recommend that prior to use of a DNA vaccine in children or newborns that: i) you first test the vaccine for safety and immunogenicity in adults, and ii) you utilize appropriate preclinical models to evaluate the potential of such vaccines to induce neonatal tolerance.

**E. Challenge/Protection, Cytokines, Prime/Boost**

When appropriate and where possible, we encourage animal challenge/protection studies with the corresponding infectious agent early in development to demonstrate the rationale for the use of the investigational vaccine. For DNA vaccines that co-express cytokine genes, you should consider specific preclinical studies in animal species responsive to the encoded human cytokine or models using the analogous animal genes to assess whether modulation of the cellular or humoral components of the immune system might result in unintended adverse consequences, such as generalized immunosuppression, chronic inflammation, autoimmunity or other immunopathology. When plasmid DNA vaccines are used in vaccination strategies employing a corresponding subunit vaccine, such as in prime and boost study designs, we recommend that you submit specific preclinical information to support the safety and tolerability of the proposed dose, schedule, and route of administration of each vaccine combination.

**F. Local Reactogenicity and Systemic Toxicity Studies**

Studies designed to assess systemic toxicity may be combined with assessment of local



***Contains Nonbinding Recommendations******Draft – Not for Implementation***

site reactogenicity. We recommend that you conduct these studies using the highest dose of vaccine planned for clinical use. You may conduct studies of additional doses to provide further support for vaccine safety. An accelerated schedule of vaccine delivery will be considered (preferably vaccination intervals of 3 to 4 weeks), and should include at least one immunization beyond that planned for clinical use. We recommend that the assessments written into the preclinical study protocols include toxicity to potential target organs, including the hematopoietic and immune systems. We recommend that preclinical studies also include clinical pathology assessments (serum chemistry, hematology, and coagulation tests), and histopathology, encompassing both gross and microscopic assessment of tissues.

We recommend that studies of local site reactogenicity include detailed clinical observations of the injection site(s) following each vaccine administration and histological evaluations of injection-site tissue obtained from biopsies or term necropsy samples. We recommend that you evaluate both short-term and persistent toxicity, preferably by studying separate cohorts of animals 2 to 3 days and 2 to 3 weeks after the final vaccination.

**G. Biodistribution and Integration Analysis**

Plasmid biodistribution, persistence and integration studies were initially recommended by CBER to determine whether subjects in DNA vaccine trials were at heightened risk from i) the long-term expression of the encoded antigen either at the site of injection or an ectopic site, and/or ii) integration of the plasmid that might increase susceptibility to malignant transformation. Publications resulting from the use of DNA vaccines in clinical studies under IND indicate that intramuscular, subcutaneous, intradermal, or particle-mediated delivery does not result in long-term persistence of plasmid at ectopic sites, and that  $\leq 30$  copies of plasmid per  $10^5$  host cells persist at the site of injection after 60 days (see Section VI, References). Before conducting biodistribution/persistence studies, you should contact FDA for advice concerning the need for these studies in particular, when: i) new or significantly modified plasmids are proposed for clinical use, and/or ii) the formulation of the DNA vaccine and/or its method/route of delivery may significantly increase cellular uptake or alter plasmid distribution.

We recommend that you conduct biodistribution/persistence studies when modifications to the vector, inserted gene, method of delivery, route of administration, or formulation significantly impact cellular uptake or immunogenicity. We recommend that all preclinical immunogenicity, toxicity and biodistribution/persistence studies evaluate the formulation and method of administration proposed for the clinical study. This would include assessing any adjuvant or active excipient in the vaccine, and/or the use of a device to administer the vaccine. A typical biodistribution study will assess the presence

***Contains Nonbinding Recommendations****Draft – Not for Implementation*

of plasmid collected from a panel of tissues at intervals of 7, 30, and 60 days post-administration. The panel of tissues typically includes the blood, heart, brain, liver, kidney, bone marrow, ovaries/testes, lung, mesenteric lymph nodes, spleen, adrenal gland, muscle at the site of administration and subcutis at the injection site. The presence of the DNA vaccine is typically evaluated using a semi-quantitative real time polymerase chain reaction (Q-PCR) study validated for sensitivity and specificity. We recommend that such assays be able to detect 1 copy of plasmid in DNA from  $10^5$  host cells.

We have determined that integration studies are not necessary when biodistribution/persistence studies demonstrate that plasmid DNA does not persist in any tissue of any animal at levels exceeding 30 copies per  $10^5$  cellular genomes at 60 days post vaccination. If the DNA plasmid persists at significantly higher copy number at any site in any animal, we recommend that you study whether the DNA has integrated into the genome of the vaccinated animal. Theoretical concerns regarding DNA vaccine integration include the risk of mutagenesis if plasmid insertion reduces the activity of a tumor suppressor or increases the activity of an oncogene. In addition, integration of a DNA vaccine may result in chromosomal instability through the induction of chromosomal breaks or rearrangements. Typically, Q-PCR is used to detect plasmid DNA in genomic DNA preparations. Specifically designed PCR primers may be used to distinguish between integrated and non-integrated plasmids.

**V. CONCLUSION**

This document is intended to inform manufacturers/sponsors about current CBER recommendations related to the development of DNA vaccines. We recommend that manufacturers/sponsors of these products concentrate their efforts on the pivotal preclinical safety issues. CBER recommends early consultation to further discuss the issues related to the development of their vaccine.

*Contains Nonbinding Recommendations**Draft – Not for Implementation***VI. REFERENCES: REGULATIONS AND APPLICABLE GUIDANCE DOCUMENTS, AND RELEVANT PUBLICATIONS**

- **U.S. CODE OF FEDERAL REGULATIONS**

- 21 CFR PART 50 - Protection of Human Subjects
- 21 CFR PART 56 - Institutional Review Boards
- 21 CFR PART 58 - Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies
- 21 CFR PART 210 - Current Good Manufacturing Practice in Manufacturing, Processing, Packing, or Holding of Drugs; General
- 21 CFR PART 211 - Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals
- 21 CFR PART 312 - Investigational New Drug Application
- 21 CFR PART 600 - Biological Products: General
- 21 CFR PART 601 - Licensing
- 21 CFR PART 610 - General Biological Products Standards

- **POINTS TO CONSIDER DOCUMENTS**

- Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology (4/85)
- Supplement to the Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology: Nucleic Acid Characterization and Genetic Stability (4/92)
- Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals (7/93)
- Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use (2/97)

- **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH) DOCUMENTS**

- ICH; Guideline for Industry: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products (9/94)
- ICH; Guideline for Industry: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products: Addendum on Toxicity to Male Fertility (4/96)
- ICH; Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products (2/04)

*Contains Nonbinding Recommendations**Draft – Not for Implementation***VI. REFERENCES: REGULATIONS AND APPLICABLE GUIDANCE DOCUMENTS, AND RELEVANT PUBLICATIONS**

- **U.S. CODE OF FEDERAL REGULATIONS**

- 21 CFR PART 50 - Protection of Human Subjects
- 21 CFR PART 56 - Institutional Review Boards
- 21 CFR PART 58 - Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies
- 21 CFR PART 210 - Current Good Manufacturing Practice in Manufacturing, Processing, Packing, or Holding of Drugs; General
- 21 CFR PART 211 - Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals
- 21 CFR PART 312 - Investigational New Drug Application
- 21 CFR PART 600 - Biological Products: General
- 21 CFR PART 601 - Licensing
- 21 CFR PART 610 - General Biological Products Standards

- **POINTS TO CONSIDER DOCUMENTS**

- Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology (4/85)
- Supplement to the Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology: Nucleic Acid Characterization and Genetic Stability (4/92)
- Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals (7/93)
- Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use (2/97)

- **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH) DOCUMENTS**

- ICH; Guideline for Industry: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products (9/94)
- ICH; Guideline for Industry: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products: Addendum on Toxicity to Male Fertility (4/96)
- ICH; Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products (2/04)

*Contains Nonbinding Recommendations**Draft – Not for Implementation*

- **PUBLICATIONS RELEVANT TO THE ISSUE OF PLASMID DNA BIODISTRIBUTION AND PERSISTENCE:**
  - Kim BM, Lee DS, Choi JH, Kim CY, Son M, Suh YS, Baek KH, Park KS, Sung YC, Kim WB. In vivo kinetics and biodistribution of a HIV-1 DNA vaccine after administration in mice. *Arch Pharm Res.* 2003 Jun; 26(6): 493-8
  - Pilling AM, Harman RM, Jones SA, McCormack NA, Lavender D, Haworth R. The assessment of local tolerance, acute toxicity, and DNA biodistribution following particle-mediated delivery of a DNA vaccine to minipigs. *Toxicol Pathol.* 2002 May-Jun; 30(3): 298-305.
  - Bureau MF, Naimi S, Torero Ibad R, Seguin J, Georger C, Arnould E, Maton L, Blanche F, Delaere P, Scherman D. Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jan 20; 1676(2): 138-48.
  - Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths TG, Pacchione SJ, Barnum AB, Harper LB, Pauley CJ, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Rizzuto G, Ciliberto G, Fattori E, Monica NL, Manam S, Ledwith BJ. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther.* 2004 Apr; 11(8): 711-21.
  - Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Schock HB, Zhang H, Faris JE, Way PA, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol (Basel).* 2000; 104: 33-43.
  - Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology.* 2000; 43(4-6): 258-72.

## Alignement de la séquence de p3-PrP1-229 clone D3 avec la séquence théorique de la PrPc humaine

### 1) Alignement des séquences protéiques

	1				50
Séquence_3	LNLSLVPSSD	PATMANLGCW	MLVLFVATWS	DLGLCKKRPK	PGGWNTGGSR
PrP1-229_D3-T7_2	...LAWYELG	SATMANLGCW	MLVLFVATWS	DLGLCKKRPK	PGGWNTGGSR
Consensus	...lawpeld	pATMANLGCW	MLVLFVATWS	DLGLCKKRPK	PGGWNTGGSR
	51				100
Séquence_3	YPGQGSPPGN	RYPPQGGGGW	GQPHGGGWGQ	PHGGGWGQPH	GGGWGQPHGG
PrP1-229_D3-T7_2	YPGQGSPPGN	RYPPQGGGGW	GQPHGGGWGQ	PHGGGWGQPH	GGGWGQPHGG
Consensus	YPGQGSPPGN	RYPPQGGGGW	GQPHGGGWGQ	PHGGGWGQPH	GGGWGQPHGG
	101				150
Séquence_3	GWGQGGGTHS	QWNKPSKPKT	NMKHMAGAAA	AGAVVGGLGG	YMLGSAMSRP
PrP1-229_D3-T7_2	GWGQGGGTHS	QWNKPSKPKT	NMKHMAGAAA	AGAVVGGLGG	YVLGSAMSRP
Consensus	GWGQGGGTHS	QWNKPSKPKT	NMKHMAGAAA	AGAVVGGLGG	YmLGSAMSRP
	151				200
Séquence_3	IIHFGSDYED	RYYRENMHRY	PNQVYYRPM	EYSNQNNFVH	DCVNITIKQH
PrP1-229_D3-T7_2	IIHFGSDYED	RYYRENMHRY	PNQVYYRPM	EYSNQNNFVH	DCVNITIKQH
Consensus	IIHFGSDYED	RYYRENMHRY	PNQVYYRPM	EYSNQNNFVH	DCVNITIKQH
	201				250
Séquence_3	TVTTTTKGEN	FTETDVKMME	RVVEQMCITQ	YERESQAYYQ	RGHSGGRSSL
PrP1-229_D3-T7_2	TVTTTTKGEN	FTETDVKMME	RVVEQMCITQ	YERESQAYYQ	RGHSGGRSSL
Consensus	TVTTTTKGEN	FTETDVKMME	RVVEQMCITQ	YERESQAYYQ	RGHSGGRSSL
	251				300
Séquence_3	EG.....	.....	.....	.....	.....
PrP1-229_D3-T7_2	EGPFKPADQP	RLCLLVASHL	LFAPPPCLPP	WKVPLPLSFP	NKMRKLRHIV
Consensus	EG.....	.....	.....	.....	.....

### 2) Alignement des séquences nucléotidiques

	1				50
Séquence	GTTTAACTT	AAGCTTGTA	CCGAGCTCG	ATCCGCCAC	CATGGCGAAC
PrP1-229_D3-T7	.....CTT	A.GCTTGTA	C.GAGCTCG	ATCC.GCCAC	CATGGCGAAC
Consensus	.....CTT	A.GCTTGTA	C.GAGCTCG	ATCC.GCCAC	CATGGCGAAC
	51				100
Séquence	CTTGGCTGCT	GGATGCTGGT	TCTCTTTGTG	GCCACATGGA	GTGACCTGGG
PrP1-229_D3-T7	CTTGGCTGCT	GGATGCTGGT	TCTCTTTGTG	GCCACATGGA	GTGACCTGGG
Consensus	CTTGGCTGCT	GGATGCTGGT	TCTCTTTGTG	GCCACATGGA	GTGACCTGGG
	101				150
Séquence	CCTCTGCAAG	AAGCGCCGA	AGCCTGGAGG	ATGGAACACT	GGGGCAGCC
PrP1-229_D3-T7	CCTCTGCAAG	AAGCGCCGA	AGCCTGGAGG	ATGGAACACT	GGGGCAGCC
Consensus	CCTCTGCAAG	AAGCGCCGA	AGCCTGGAGG	ATGGAACACT	GGGGCAGCC
	151				200
Séquence	GATACCCGGG	GCAGGGCAGC	CCTGGAGGCA	ACCGTACCC	ACCTCAGGGC
PrP1-229_D3-T7	GATACCCGGG	GCAGGGCAGC	CCTGGAGGCA	ACCGTACCC	ACCTCAGGGC
Consensus	GATACCCGGG	GCAGGGCAGC	CCTGGAGGCA	ACCGTACCC	ACCTCAGGGC
	201				250
Séquence	GGTGGTGGCT	GGGGCAGCC	TCATGGTGGT	GGCTGGGGGC	AGCCTCATGG
PrP1-229_D3-T7	GGTGGTGGCT	GGGGCAGCC	TCATGGTGGT	GGCTGGGGGC	AGCCTCATGG
Consensus	GGTGGTGGCT	GGGGCAGCC	TCATGGTGGT	GGCTGGGGGC	AGCCTCATGG

	251				300
Séquence	TGGTGGCTGG	GGGCAGCCCC	ATGGTGGTGG	CTGGGGACAG	CCTCATGGTG
PrP1-229_D3-T7	TGGTGGCTGG	GGGCAGCCCC	ATGGTGGTGG	CTGGGGACAG	CCTCATGGCG
Consensus	TGGTGGCTGG	GGGCAGCCCC	ATGGTGGTGG	CTGGGGACAG	CCTCATGGcG
	301				350
Séquence	GTGGCTGGGG	TCAAGGAGGT	GGCACCCACA	GTCAGTGGAA	CAAGCCGAGT
PrP1-229_D3-T7	GTGGCTGGGG	TCAAGGAGGT	GGCACCCACA	GTCAGTGGAA	CAAGCCGAGT
Consensus	GTGGCTGGGG	TCAAGGAGGT	GGCACCCACA	GTCAGTGGAA	CAAGCCGAGT
	351				400
Séquence	AAGCCAAAAA	CCAACATGAA	GCACATGGCT	GGTGTGCAG	CAGCTGGGGC
PrP1-229_D3-T7	AAGCCAAAAA	CCAACATGAA	GCACATGGCT	GGTGTGCAG	CAGCTGGGGC
Consensus	AAGCCAAAAA	CCAACATGAA	GCACATGGCT	GGTGTGCAG	CAGCTGGGGC
	401				450
Séquence	AGTGGTGGGG	GGCCTTGGCG	GCTACATGCT	GGGAAGTGCC	ATGAGCAGGC
PrP1-229_D3-T7	AGTGGTGGGG	GGCCTTGGCG	GCTACATGCT	GGGAAGTGCC	ATGAGCAGGC
Consensus	AGTGGTGGGG	GGCCTTGGCG	GCTACaTGCT	GGGAAGTGCC	ATGAGCAGGC
	451				500
Séquence	CCATCATACA	TTTCGGCAGT	GACTATGAGG	ACCGTTACTA	TCGTGAAAAC
PrP1-229_D3-T7	CCATCATACA	TTTCGGCAGT	GACTATGAGG	ACCGTTACTA	TCGTGAAAAC
Consensus	CCATCATACA	TTTCGGCAGT	GACTATGAGG	ACCGTTACTA	TCGTGAAAAC
	501				550
Séquence	ATGCACCGTT	ACCCCAACCA	AGTGTACTAC	AGGCCCATGG	ATGAGTACAG
PrP1-229_D3-T7	ATGCACCGTT	ACCCCAACCA	AGTGTACTAC	AGGCCCATGG	ATGAGTACAG
Consensus	ATGCACCGTT	ACCCCAACCA	AGTGTACTAC	AGGCCCATGG	ATGAGTACAG
	551				600
Séquence	CAACCAGAAC	AACTTTGTGC	ACGACTGCGT	CAATATCACA	ATCAAGCAGC
PrP1-229_D3-T7	CAACCAGAAC	AACTTTGTGC	ACGACTGCGT	CAATATCACA	ATCAAGCAGC
Consensus	CAACCAGAAC	AACTTTGTGC	ACGACTGCGT	CAATATCACA	ATCAAGCAGC
	601				650
Séquence	ACACGGTCAC	CACAACCACC	AAGGGGGAGA	ACTTCACCGA	GACCGACGTT
PrP1-229_D3-T7	ACACGGTCAC	CACAACCACC	AAGGGGGAGA	ACTTCACCGA	GACCGACGTT
Consensus	ACACGGTCAC	CACAACCACC	AAGGGGGAGA	ACTTCACCGA	GACCGACGTT
	651				700
Séquence	AAGATGATGG	AGCGCGTGGT	TGAGCAGATG	TGTATCACCC	AGTACGAGAG
PrP1-229_D3-T7	AAGATGATGG	AGCGCGTGGT	TGAGCAGATG	TGTATCACCC	AATACGAGAG
Consensus	AAGATGATGG	AGCGCGTGGT	TGAGCAGATG	TGTATCACCC	AaTACGAGAG
	701				750
Séquence	GGAAATCTCAG	GCCTATTACC	AGAGAGGATG	ATGACACAGT	GGCGGCCGCT
PrP1-229_D3-T7	GGAAATCTCAG	GCCTATTACC	AGAGAGGATG	ATGACACAGT	GGCGGCCGCT
Consensus	GGAAATCTCAG	GCCTATTACC	AGAGAGGATG	ATGACACAGT	GGCGGCCGCT
	751				800
Séquence	CGAGTCTAGA	GGGC.....	.....	.....	.....
PrP1-229_D3-T7	CGAGTCTAGA	GGGCCCGTTT	AAACCCGCTG	ATCAGCCTCG	ACTGTGCCTT
Consensus	CGAGTCTAGA	GGGC.....	.....	.....	.....

## Alignement de la séquence de p3-PrP1-229 clone D5 avec la séquence théorique de la PrPc humaine

### 1) Alignement des séquences protéiques

	1		50
Séquence_3	LNLSLVPSSD	PATMANLGCW	MLVLFVATWS DLGLCKKRPK PGGWNTGGSR
PrP1-229_D5-T7_3	.....SD	PATMANLGCW	MLVLFVATWS DLGLCKKRPK PGGWNTGGSR
Consensus	.....SD	PATMANLGCW	MLVLFVATWS DLGLCKKRPK PGGWNTGGSR
	51		100
Séquence_3	YPGQGSPPGN	RYPPQGGGW	GQPHGGGWGQ PHGGGWQPH GGGWGQPHGG
PrP1-229_D5-T7_3	YPGQGSPPGN	RYPPQGGGW	GQPHGGGWGQ PHGGGWQPH GGGWGQPHGG
Consensus	YPGQGSPPGN	RYPPQGGGW	GQPHGGGWGQ PHGGGWQPH GGGWGQPHGG
	101		150
Séquence_3	GWQGGGTHS	QWNKPSKPKT	NMKHMAGAAA AGAVVGGLGG YMLGSAMSRP
PrP1-229_D5-T7_3	GWQGGGTHS	QWNKPSKPKT	NMKHMAGAAA AGAVVGGLGG YVLGSAMSRP
Consensus	GWQGGGTHS	QWNKPSKPKT	NMKHMAGAAA AGAVVGGLGG YmLGSAMSRP
	151		200
Séquence_3	IIHFGSDYED	RYYRENMHRY	PNQVYRPM D EYSNQNNFVH DCVNITIKQH
PrP1-229_D5-T7_3	IIHFGSDYED	RYYRENMHRY	PNQVYRPM D EYSNQNNFVH DCVNITIKQH
Consensus	IIHFGSDYED	RYYRENMHRY	PNQVYRPM D EYSNQNNFVH DCVNITIKQH
	201		250
Séquence_3	TVTTTTKGEN	FTETDVKMME	RVVEQMCITQ YERESQAYYQ RGHSGGRSSL
PrP1-229_D5-T7_3	TVTTTTKGEN	FTETDVKMME	RVVEQMCITQ YERESQAYYQ RGHSGGRSSL
Consensus	TVTTTTKGEN	FTETDVKMME	RVVEQMCITQ YERESQAYYQ RGHSGGRSSL
	251		300
Séquence_3	EG.....	.....	.....
PrP1-229_D5-T7_3	EGPFKPADQP	RLCLLVASHL	LFAPPPCLPP WRVPLPLSFS NEEIASHCLS
Consensus	EG.....	.....	.....

### 2) Alignement des séquences nucléotidiques

	1		50
Séquence	GTTTAAACTT	AAGCTTGGTA	CCGAGCTCGG ATCCCGCCAC CATGGCGAAC
PrP1-229_D5-T7	.....	.....	....GCTCGG ATCCCGCCAC CATGGCGAAC
Consensus	.....	.....	....GCTCGG ATCCCGCCAC CATGGCGAAC
	51		100
Séquence	CTTGGCTGCT	GGATGCTGGT	TCTCTTTGTG GCCACATGGA GTGACCTGGG
PrP1-229_D5-T7	CTTGGCTGCT	GGATGCTGGT	TCTCTTTGTG GCCACATGGA GTGACCTGGG
Consensus	CTTGGCTGCT	GGATGCTGGT	TCTCTTTGTG GCCACATGGA GTGACCTGGG
	101		150
Séquence	CCTCTGCAAG	AAGCGCCCGA	AGCCTGGAGG ATGGAACACT GGGGGCAGCC
PrP1-229_D5-T7	CCTCTGCAAG	AAGCGCCCGA	AGCCTGGAGG ATGGAACACT GGGGGCAGCC
Consensus	CCTCTGCAAG	AAGCGCCCGA	AGCCTGGAGG ATGGAACACT GGGGGCAGCC
	151		200
Séquence	GATACCCGGG	GCAGGGCAGC	CCTGGAGGCA ACCGCTACCC ACCTCAGGGC
PrP1-229_D5-T7	GATACCCGGG	GCAGGGCAGC	CCTGGAGGCA ACCGCTACCC ACCTCAGGGC
Consensus	GATACCCGGG	GCAGGGCAGC	CCTGGAGGCA ACCGCTACCC ACCTCAGGGC
	201		250
Séquence	GGTGGTGGCT	GGGGGCAGCC	TCATGGTGGT GGCTGGGGGC AGCCTCATGG
PrP1-229_D5-T7	GGTGGTGGCT	GGGGGCAGCC	TCATGGTGGT GGCTGGGGGC AGCCTCATGG
Consensus	GGTGGTGGCT	GGGGGCAGCC	TCATGGTGGT GGCTGGGGGC AGCCTCATGG



	251				300
Séquence	TGGTGGCTGG	GGGCAGCCCC	ATGGTGGTGG	CTGGGGACAG	CCTCATGGTG
PrP1-229_D5-T7	TGGTGGCTGG	GGGCAGCCCC	ATGGTGGTGG	CTGGGGACAG	CCTCATGGCG
Consensus	TGGTGGCTGG	GGGCAGCCCC	ATGGTGGTGG	CTGGGGACAG	CCTCATGGcG
	301				350
Séquence	GTGGCTGGGG	TCAAGGAGGT	GGCACCCACA	GTCAGTGGAA	CAAGCCGAGT
PrP1-229_D5-T7	GTGGCTGGGG	TCAAGGAGGT	GGCACCCACA	GTCAGTGGAA	CAAGCCGAGT
Consensus	GTGGCTGGGG	TCAAGGAGGT	GGCACCCACA	GTCAGTGGAA	CAAGCCGAGT
	351				400
Séquence	AAGCCAAAAA	CCAACATGAA	GCACATGGCT	GGTGTCTCAG	CAGCTGGGGC
PrP1-229_D5-T7	AAGCCAAAAA	CCAACATGAA	GCACATGGCT	GGTGTCTCAG	CAGCTGGGGC
Consensus	AAGCCAAAAA	CCAACATGAA	GCACATGGCT	GGTGTCTCAG	CAGCTGGGGC
	401				450
Séquence	AGTGGTGGGG	GGCCTTGGCG	GCTACATGCT	GGGAAGTGCC	ATGAGCAGGC
PrP1-229_D5-T7	AGTGGTGGGG	GGCCTTGGCG	GCTACATGCT	GGGAAGTGCC	ATGAGCAGGC
Consensus	AGTGGTGGGG	GGCCTTGGCG	GCTACaTGCT	GGGAAGTGCC	ATGAGCAGGC
	451				500
Séquence	CCATCATACA	TTTCGGCAGT	GACTATGAGG	ACCGTTACTA	TCGTGAAAAC
PrP1-229_D5-T7	CCATCATACA	TTTCGGCAGT	GACTATGAGG	ACCGTTACTA	TCGTGAAAAC
Consensus	CCATCATACA	TTTCGGCAGT	GACTATGAGG	ACCGTTACTA	TCGTGAAAAC
	501				550
Séquence	ATGCACCGTT	ACCCCAACCA	AGTGTACTAC	AGGCCCATGG	ATGAGTACAG
PrP1-229_D5-T7	ATGCACCGTT	ACCCCAACCA	AGTGTACTAC	AGGCCCATGG	ATGAGTACAG
Consensus	ATGCACCGTT	ACCCCAACCA	AGTGTACTAC	AGGCCCATGG	ATGAGTACAG
	551				600
Séquence	CAACCAGAAC	AACTTTGTGC	ACGACTGCGT	CAATATCACA	ATCAAGCAGC
PrP1-229_D5-T7	CAACCAGAAC	AACTTTGTGC	ACGACTGCGT	CAATATCACA	ATCAAGCAGC
Consensus	CAACCAGAAC	AACTTTGTGC	ACGACTGCGT	CAATATCACA	ATCAAGCAGC
	601				650
Séquence	ACACGGTCAC	CACAACCACC	AAGGGGGAGA	ACTTCACCGA	GACCGACGTT
PrP1-229_D5-T7	ACACGGTCAC	CACAACCACC	AAGGGGGAGA	ACTTCACCGA	GACCGACGTT
Consensus	ACACGGTCAC	CACAACCACC	AAGGGGGAGA	ACTTCACCGA	GACCGACGTT
	651				700
Séquence	AAGATGATGG	AGCGCGTGGT	TGAGCAGATG	TGTATCACCC	AGTACGAGAG
PrP1-229_D5-T7	AAGATGATGG	AGCGCGTGGT	TGAGCAGATG	TGTATCACCC	AGTACGAGAG
Consensus	AAGATGATGG	AGCGCGTGGT	TGAGCAGATG	TGTATCACCC	AGTACGAGAG
	701				750
Séquence	GGAAATCTCAG	GCCTATTACC	AGAGAGGATG	ATGACACAGT	GGCGGCCGCT
PrP1-229_D5-T7	GGAAATCTCAG	GCCTATTACC	AGAGAGGATG	ATGACACAGT	GGCGGCCGCT
Consensus	GGAAATCTCAG	GCCTATTACC	AGAGAGGATG	ATGACACAGT	GGCGGCCGCT
	751				800
Séquence	CGAGTCTAGA	GGGC.....	.....	.....	.....
PrP1-229_D5-T7	CGAGTCTAGA	GGGCCCGTTT	AAACCCGCTG	ATCAGCCTCG	ACTGTGCCTT
Consensus	CGAGTCTAGA	GGGC.....	.....	.....	.....

## Alignement de la séquence de p3-PrP1-229-TT clone D5 avec la séquence théorique de la PrPc humaine

### 1) Alignement des séquences protéiques

	1				50
Séquence	NTTHYRETQA	GRLNLSLVPS	SDPATMANLG	CWMLVLFVAT	WSDLGLCKKR
TT_D5-T7_3	.....	.....	....TMANLG	CWMLVLFVAT	WSDLGLCKKR
Consensus	.....	.....	....TMANLG	CWMLVLFVAT	WSDLGLCKKR
	51				100
Séquence	PKPGGWNTGG	SRYPGQGSFG	GNYRPPQGGG	GWGQPHGGGW	GQPHGGGWGQ
TT_D5-T7_3	PKPGGWNTGG	SRYPGQGSFG	GNYRPPQGGG	GWGQPHGGGW	GQPHGGGWGQ
Consensus	PKPGGWNTGG	SRYPGQGSFG	GNYRPPQGGG	GWGQPHGGGW	GQPHGGGWGQ
	101				150
Séquence	PHGGGWGQPH	GGGWGQGGGT	HSQWNKPSKP	KTNMKHMAGA	AAAGAVVGGI
TT_D5-T7_3	PHGGGWGQPH	GGGWGQGGGT	HSQWNKPSKP	KTNMKHMAGA	AAAGAVVGGI
Consensus	PHGGGWGQPH	GGGWGQGGGT	HSQWNKPSKP	KTNMKHMAGA	AAAGAVVGGI
	151				200
Séquence	GGYVLGSAMS	RPIIHFGSDY	EDRYRENMH	RYPNQVYYRP	MDEYSNQNNF
TT_D5-T7_3	GGYVLGSAMS	RPIIHFGSDY	EDRYRENMH	RYPNQVYYRP	MDEYSNQNNF
Consensus	GGYmLGSAMS	RPIIHFGSDY	EDRYRENMH	RYPNQVYYRP	MDEYSNQNNF
	201				250
Séquence	VHDCVNITIK	QHTVTTTTKG	ENFTETDVKM	MERVVEQMC I	TQYERESQAY
TT_D5-T7_3	VHDCVNITIK	QHTVTTTTKG	ENFTETDVKM	MERVVEQMC I	TQYERESQAY
Consensus	VHDCVNITIK	QHTVTTTTKG	ENFTETDVKM	MERVVEQMC I	TQYERESQAY
	251				300
Séquence	YQRGIQYIKA	NSKFIGITEL	RSSLEGPFKP	ADQX.....	.....
TT_D5-T7_3	YQRGIQYIKA	NSKFIGITEL	RSSLEGPFKP	ADQPRCLLV	ASHLLFAPPP
Consensus	YQRGIQYIKA	NSKFIGITEL	RSSLEGPFKP	ADQp.....	.....

### 2) Alignement des séquences nucléotidiques

	51				100
Séquence	GCTTGGTACC	GAGCTCGGAT	CCCGCCACCA	TGGCGAACCT	TGGCTGCTGG
TT_D5-T7	.....	.....	....CCACCA	TGGCGAACCT	TGGCTGCTGG
Consensus	.....	.....	....CCACCA	TGGCGAACCT	TGGCTGCTGG
	101				150
Séquence	ATGCTGGTTC	TCTTTGTGGC	CACATGGAGT	GACCTGGGCC	TCTGCAAGAA
TT_D5-T7	ATGCTGGTTC	TCTTTGTGGC	CACATGGAGT	GACCTGGGCC	TCTGCAAGAA
Consensus	ATGCTGGTTC	TCTTTGTGGC	CACATGGAGT	GACCTGGGCC	TCTGCAAGAA
	151				200
Séquence	GCGCCCGAAG	CCTGGAGGAT	GGAACACTGG	GGGCAGCCGA	TACCCGGGGC
TT_D5-T7	GCGCCCGAAG	CCTGGAGGAT	GGAACACTGG	GGGCAGCCGA	TACCCGGGGC
Consensus	GCGCCCGAAG	CCTGGAGGAT	GGAACACTGG	GGGCAGCCGA	TACCCGGGGC
	201				250
Séquence	AGGGCAGCCC	TGGAGGCAAC	CGCTACCCAC	CTCAGGGCGG	TGGTGGCTGG
TT_D5-T7	AGGGCAGCCC	TGGAGGCAAC	CGCTACCCAC	CTCAGGGCGG	TGGTGGCTGG
Consensus	AGGGCAGCCC	TGGAGGCAAC	CGCTACCCAC	CTCAGGGCGG	TGGTGGCTGG
	251				300
Séquence	GGGCAGCCTC	ATGGTGGTGG	CTGGGGGCAG	CCTCATGGTG	GTGGCTGGGG
TT_D5-T7	GGGCAGCCTC	ATGGTGGTGG	CTGGGGGCAG	CCTCATGGTG	GTGGCTGGGG
Consensus	GGGCAGCCTC	ATGGTGGTGG	CTGGGGGCAG	CCTCATGGTG	GTGGCTGGGG

	301				350
Séquence	GCAGCCCCAT	GGTGGTGGCT	GGGGACAGCC	TCATGGTGGT	GGCTGGGGTC
TT_D5-T7	GCAGCCCCAT	GGTGGTGGCT	GGGGACAGCC	TCATGGCGGT	GGCTGGGGTC
Consensus	GCAGCCCCAT	GGTGGTGGCT	GGGGACAGCC	TCATGGcGGT	GGCTGGGGTC
	351				400
Séquence	AAGGAGGTGG	CACCCACAGT	CAGTGGAAACA	AGCCGAGTAA	GCCAAAAACC
TT_D5-T7	AAGGAGGTGG	CACCCACAGT	CAGTGGAAACA	AGCCGAGTAA	GCCAAAAACC
Consensus	AAGGAGGTGG	CACCCACAGT	CAGTGGAAACA	AGCCGAGTAA	GCCAAAAACC
	401				450
Séquence	AACATGAAGC	ACATGGCTGG	TGCTGCAGCA	GCTGGGGCAG	TGGTGGGGGG
TT_D5-T7	AACATGAAGC	ACATGGCTGG	TGCTGCAGCA	GCTGGGGCAG	TGGTGGGGGG
Consensus	AACATGAAGC	ACATGGCTGG	TGCTGCAGCA	GCTGGGGCAG	TGGTGGGGGG
	451				500
Séquence	CCTTGGCGGC	TACATGCTGG	GAAGTGCCAT	GAGCAGGCC	ATCATACATT
TT_D5-T7	CCTTGGCGGC	TACGTGCTGG	GAAGTGCCAT	GAGCAGGCC	ATCATACATT
Consensus	CCTTGGCGGC	TACaTGCTGG	GAAGTGCCAT	GAGCAGGCC	ATCATACATT
	501				550
Séquence	TCGGCAGTGA	CTATGAGGAC	CGTTACTATC	GTGAAAACAT	GCACCGTTAC
TT_D5-T7	TCGGCAGTGA	CTATGAGGAC	CGTTACTATC	GTGAAAACAT	GCACCGTTAC
Consensus	TCGGCAGTGA	CTATGAGGAC	CGTTACTATC	GTGAAAACAT	GCACCGTTAC
	551				600
Séquence	CCCAACCAAG	TGTACTACAG	GCCCATGGAT	GAGTACAGCA	ACCAGAACAA
TT_D5-T7	CCCAACCAAG	TGTACTACAG	GCCCATGGAT	GAGTACAGCA	ACCAGAACAA
Consensus	CCCAACCAAG	TGTACTACAG	GCCCATGGAT	GAGTACAGCA	ACCAGAACAA
	601				650
Séquence	CTTTGTGCAC	GACTGCGTCA	ATATCACAAT	CAAGCAGCAC	ACGGTCACCA
TT_D5-T7	CTTTGTGCAC	GACTGCGTCA	ATATCACAAT	CAAGCAGCAC	ACGGTCACCA
Consensus	CTTTGTGCAC	GACTGCGTCA	ATATCACAAT	CAAGCAGCAC	ACGGTCACCA
	651				700
Séquence	CAACCACCAA	GGGGGAGAAC	TTCACCGAGA	CCGACGTTAA	GATGATGGAG
TT_D5-T7	CAACCACCAA	GGGGGAGAAC	TTCACCGAGA	CCGACGTTAA	GATGATGGAG
Consensus	CAACCACCAA	GGGGGAGAAC	TTCACCGAGA	CCGACGTTAA	GATGATGGAG
	701				750
Séquence	CGCGTGGTTG	AGCAGATGTG	TATCACCCAG	TACGAGAGGG	AATCTCAGGC
TT_D5-T7	CGCGTGGTTG	AGCAGATGTG	TATCACCCAG	TACGAGAGGG	AGTCTCAGGC
Consensus	CGCGTGGTTG	AGCAGATGTG	TATCACCCAG	TACGAGAGGG	AaTCTCAGGC
	751				800
Séquence	CTATTACCAG	AGAGGAATCC	AGTACATCAA	GGCTAACTCC	AAATTCATCG
TT_D5-T7	CTATTACCAG	AGAGGAATCC	AGTACATCAA	GGCTAACTCC	AAATTCATCG
Consensus	CTATTACCAG	AGAGGAATCC	AGTACATCAA	GGCTAACTCC	AAATTCATCG
	801				850
Séquence	GTATCACCGA	ACTGTGACGC	TCGAGTCTAG	AGGGCCCGTT	TAAACCCGCT
TT_D5-T7	GTATCACCGA	ACTGTGACGC	TCGAGTCTAG	AGGGCCCGTT	TAAACCCGCT
Consensus	GTATCACCGA	ACTGTGACGC	TCGAGTCTAG	AGGGCCCGTT	TAAACCCGCT
	851				900
Séquence	GATCAGC...	.....	.....	.....	.....
TT_D5-T7	GATCAGCCTC	GACTGTGCCT	TCTAGTTGCC	AGCCATCTGT	TGTTTGCCCC
Consensus	GATCAGC...	.....	.....	.....	.....

Alignement des séquences nucléotidiques des clones p3-PrP1TT C4 et p3-PrP1-229-TT D5

```

1                               50
TT_C4-T7   .....GC GAACCTTGGC TGCTGGATGC TGGTTCTCTT TGTGGCCACA
TT_D5-T7   CCACCATGGC GAACCTTGGC TGCTGGATGC TGGTTCTCTT TGTGGCCACA
Consensus  .....GC GAACCTTGGC TGCTGGATGC TGGTTCTCTT TGTGGCCACA

51                               100
TT_C4-T7   TGGAGTGACC TGGGCCTCTG CA.GAAGCGC CCGAAGCCTG GAGGATGGAA
TT_D5-T7   TGGAGTGACC TGGGCCTCTG CA.AGAAGCGC CCGAAGCCTG GAGGATGGAA
Consensus  TGGAGTGACC TGGGCCTCTG CA.GAAGCGC CCGAAGCCTG GAGGATGGAA

101                              150
TT_C4-T7   CACTGGGGGC AGCCGATACC CGGGGCAGGG CAGCCCTGGA GGCAACCCTG
TT_D5-T7   CACTGGGGGC AGCCGATACC CGGGGCAGGG CAGCCCTGGA GGCAACCCTG
Consensus  CACTGGGGGC AGCCGATACC CGGGGCAGGG CAGCCCTGGA GGCAACCCTG

151                              200
TT_C4-T7   ACCCACCTCA GGGCGGTGGT GGCTGGGGGC AGCCTCATGG TGGTGGCTGG
TT_D5-T7   ACCCACCTCA GGGCGGTGGT GGCTGGGGGC AGCCTCATGG TGGTGGCTGG
Consensus  ACCCACCTCA GGGCGGTGGT GGCTGGGGGC AGCCTCATGG TGGTGGCTGG

201                              250
TT_C4-T7   GGGCAGCCTC ATGGTGGTGG CTGGGGGCAG CCCCATGGTG GTGGCTGGGG
TT_D5-T7   GGGCAGCCTC ATGGTGGTGG CTGGGGGCAG CCCCATGGTG GTGGCTGGGG
Consensus  GGGCAGCCTC ATGGTGGTGG CTGGGGGCAG CCCCATGGTG GTGGCTGGGG

251                              300
TT_C4-T7   ACAGCCTCAT GGCGGTGGCT GGGGTCAAGG AGGTGGCACC CACAGTCAGT
TT_D5-T7   ACAGCCTCAT GGCGGTGGCT GGGGTCAAGG AGGTGGCACC CACAGTCAGT
Consensus  ACAGCCTCAT GGCGGTGGCT GGGGTCAAGG AGGTGGCACC CACAGTCAGT

301                              350
TT_C4-T7   GGAACAAGCC GAGTAAGCCA AAAACCAACA TGAAGCACAT GGCTGGTGCT
TT_D5-T7   GGAACAAGCC GAGTAAGCCA AAAACCAACA TGAAGCACAT GGCTGGTGCT
Consensus  GGAACAAGCC GAGTAAGCCA AAAACCAACA TGAAGCACAT GGCTGGTGCT

351                              400
TT_C4-T7   GCAGCAGCTG GGGCAGTGGT GGGGGCCTT GCGCGCTACG TGCTGGGAAG
TT_D5-T7   GCAGCAGCTG GGGCAGTGGT GGGGGCCTT GCGCGCTACG TGCTGGGAAG
Consensus  GCAGCAGCTG GGGCAGTGGT GGGGGCCTT GCGCGCTACG TGCTGGGAAG

401                              450
TT_C4-T7   TGCCATGAGC AGGCCATCA TACATTTCCG CAGTACTAT GAGGACCGTT
TT_D5-T7   TGCCATGAGC AGGCCATCA TACATTTCCG CAGTACTAT GAGGACCGTT
Consensus  TGCCATGAGC AGGCCATCA TACATTTCCG CAGTACTAT GAGGACCGTT








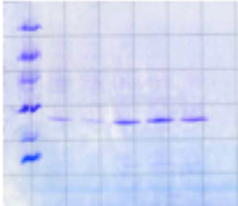
451                              500
TT_C4-T7   ACTATCGTGA AAACATGCAC CGTTACCCCA ACCAAGTGTA CTACAGGCC
TT_D5-T7   ACTATCGTGA AAACATGCAC CGTTACCCCA ACCAAGTGTA CTACAGGCC
Consensus  ACTATCGTGA AAACATGCAC CGTTACCCCA ACCAAGTGTA CTACAGGCC

501                              550
TT_C4-T7   ATGGATGAGT ACAGCAACCA GAACAACCTT GTGCACGACT GCGTCAATAT
TT_D5-T7   ATGGATGAGT ACAGCAACCA GAACAACCTT GTGCACGACT GCGTCAATAT
Consensus  ATGGATGAGT ACAGCAACCA GAACAACCTT GTGCACGACT GCGTCAATAT

551                              600
TT_C4-T7   CACAATCAAG CAGCACACGG TCAC.....
TT_D5-T7   CACAATCAAG CAGCACACGG TCACCACAAC CACCAAGGGG GAGAACTTCA
Consensus  CACAATCAAG CAGCACACGG TCAC.....










```

La purification de la protéine prion recombinante est basée sur l'affinité de la séquence répétée de cette protéine (octarepeat) pour le Nickel.

<p><b>Jour J-3</b></p> <p>Etalement</p>	 <p>Etalement du clone pTrc-hPrP24-231 sur une boîte LBA Une nuit à 37°C</p>
<p><b>Jour J-2</b></p> <p>Préculture liquide</p>	 <p>Ensemencement d'une colonie isolée dans 10ml de LBA Une nuit à 37°C 210rpm</p>
<p><b>Jour J-1</b></p> <p>Induction de l'expression</p>	 <p>2ml de préculture dans 100ml de LBA Induction vers 0,6DO (600nm): IPTG (1mM final) Une nuit à 37°C 210rpm</p>
<p><b>Jour J</b></p> <p>Récupération du lysat bactérien</p>	 10min 4000g Récupération du culot sur glace Resuspendre dans 1ml de tampon B Sonication 30s Agitation 30min à 37°C 130rpm  30min 10000g
<p><b>Jour J</b></p> <p>Extraction de la PrP recombinante</p>	 Ajouter 200µl de Ni-NTA 50% (Qiagen) pour 400µl de lysat Faire tourner 30 min à 4°C  60s 4000g 2 lavages avec le tampon de lavage 3 éluions avec 100µl de tampon d'éluion 1M imidazol
<p><b>Jour J</b></p> <p>Vérification de la pureté de la PrP recombinante</p>	 <p>Gel électrophorétique et coloration au bleu de Coomassie (Phast System, Pharmacia)  ← ~30kD</p>

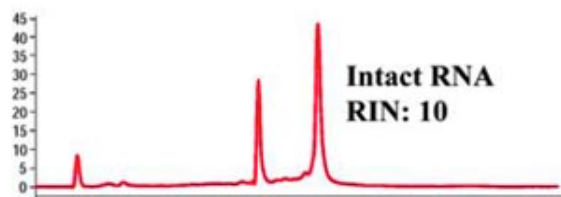
LBA : Luria Broth supplémenté avec de l'ampicilline (100µg/ml). ; IPTG : Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside. ; Tampon B : 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 8M Urée, 20mM Imidazole, pH8. ; Tampon de lavage : 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM Imidazole, pH8. ; Tampon d'éluion : 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 1M Imidazole, pH8.

Nous avons adapté le kit NucleoSpin®RNAII (Macherey Nagel) pour extraire l'ADN plasmidique et l'ARN total des extraits tissulaires.

Homogénéisation des échantillons  Lyse cellulaire		Broyage des tissus à l'aide d'un ultraturax 700µl RA1 + 7µl β-mercaptoéthanol	
Filtration du lysat	 	2min 11000g	
Traitement à la protéinase K		<b>Muscle</b> 20µl PK (Macherey-Nagel) 1180µl H <sub>2</sub> O RNase Free 10min à 55°C 3min 11000g	<b>Rate</b>  -
Ajustement des conditions de liaison de l'ARN		<b>Muscle</b> 850µl d'éthanol 100%	<b>Rate</b> 700µl d'éthanol 70%
Liaison de l'ARN	 	1min 10000g	
Lavages de la membrane de silice		1er lavage: 200µl RA2 2ème lavage: 600µl RA3 3ème lavage: 250µl RA3 1er et 2ème  1min 11000g 3ème  5min 11000g	
Elution		60µl H <sub>2</sub> O RNase Free	

L'ADN plasmidique étant un ADN de faible poids moléculaire, il va donc être élué, en partie, avec l'ARN tissulaire.

L'intégrité des ARN totaux est vérifiée à l'aide d'un bioanalyseur.



## **VII. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**



**Publications soumises à une comité de relecture :**

2007 :	<p><b><u>Alexandrenne C.</u></b>, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Hanoux V, Creminon C, Boquet D, Couraud JY.</p> <p>Generating antibodies against the native human prion protein (PrP) and circumventing immune tolerance to PrP in wild-type animals by the use of DNA immunization.</p> <p><i>J Immunol., soumis.</i></p> <p>Padiolleau-Lefevre S, <b><u>Alexandrenne C.</u></b>, Dkhissi F, Clement G, Essono S, Blache C, Couraud JY, Wijkhuisen A, Boquet D.</p> <p>Expression and detection strategies for an scFv fragment retaining the same high affinity than Fab and whole antibody: Implications for therapeutic use in prion diseases.</p> <p><i>Mol Immunol. 2007 Mar;44(8):1888-96.</i></p>
2006 :	<p>Adel-Patient K, Ah-Leung S, Bernard H, <b><u>Durieux-Alexandrenne C.</u></b>, Creminon C, Wal JM.</p> <p>Oral Sensitization to Peanut Is Highly Enhanced by Application of Peanut Extracts to Intact Skin, but Is Prevented when CpG and Cholera Toxin Are Added.</p> <p><i>Int Arch Allergy Immunol. 2006 Dec 22;143(1):10-20.</i></p>
2004 :	<p>Tymciu S, <b><u>Durieux-Alexandrenne C.</u></b>, Wijkhuisen A, Creminon C, Frobert Y, Grassi J, Couraud JY, Boquet D.</p> <p>Enhancement of antibody responses in DNA vaccination using a vector encoding a universal T-helper cell epitope.</p> <p><i>DNA Cell Biol. 2004 Jun;23(6):395-402.</i></p>
2003 :	<p>Wijkhuisen A, Tymciu S, Fischer J, <b><u>Alexandrenne C.</u></b>, Creminon C, Frobert Y, Grassi J, Boquet D, Conrath M, Couraud JY.</p> <p>Pharmacological properties of peptides derived from an antibody against the tachykinin NK1 receptor for the neuropeptide substance P.</p> <p><i>Eur J Pharmacol. 2003 May 16;468(3):175-82.</i></p>

**Communications orales :**

2007 :	<p><b><u>Alexandrenne C.</u></b>, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Hanoux V, Créminon C., Grassi J., Couraud JY, Boquet D.</p> <p>DNA vaccine against Prion diseases.</p> <p><i>DNA vaccines 2007 (Malaga, Mai 2007).</i></p>
2006 :	<p><b><u>Alexandrenne C.</u></b>, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Padiolleau-Lefevre S,</p>

	<p>Créminon C., Grassi J., Couraud JY, Boquet D.                  Immunisation génique dirigée contre les maladies à prion.  <i>Congrès de l'école doctorale innovation thérapeutique (Gif sur Yvette, mai 2006).</i></p>
--	---

**Communications écrites :**

2006 :	<p><b><u>Alexandrenne C.</u></b>, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Padiolleau-Lefevre S, Créminon C., Grassi J., Couraud JY, Boquet D.                  DNA vaccine against Prion diseases.  <i>Prion 2006 (Turin, octobre 2006).</i></p>
2005 :	<p><b><u>Alexandrenne C.</u></b>, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Morel N., Simon S., Padiolleau-Lefevre S, Créminon C., Grassi J., Couraud JY, Boquet D.                  DNA vaccine against Prion diseases: a new approach to overcome tolerance to prion protein.  <i>2<sup>nd</sup> International Dominique Dormont Conference (Paris, décembre 2005).</i></p>
2004 :	<p>Wijkhuisen A, <b><u>Alexandrenne C.</u></b>, Tymciu S, Creminon C, Frobert Y, Grassi J, Couraud JY, Boquet D.                  Antigenic presentation and antibody responses in DNA vaccination are enhanced when using a vector encoding universal T-helper cell epitope.  <i>Société française d'immunologie (Paris, novembre 2004).</i></p>

