

UNIVERSITE DU QUEBEC

**Mémoire présenté à
l'Institut Armand-Frappier
comme exigence partielle
de la Maîtrise en
Virologie et Immunologie**

par

ZOÏ COUTSINOS

**ETUDE DES MODES D'INDUCTION D'UNE IMMUNITE MUCOSALE
CONTRE LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE
CHEZ LA SOURIS ET LE LAPIN**

Juillet 1994

A MES PARENTS

EVANGELINE ET CONSTANTIN

ET MON PETIT FRERE

DIMITRI

*Dans les champs de l'observation,
le hasard ne favorise
que les esprits préparés*

LOUIS PASTEUR

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES ABREVIATIONS	viii
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES TABLEAUX	xix
SOMMAIRE	xxii
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. CARACTERISTIQUES DU VIH	7
1.1 Classification	7
1.2 Morphologie	8
1.3 Organisation et expression des gènes du VIH	9
1.3.1 Gènes structuraux	10
1.3.2 Gènes de régulation et gènes accessoires	11
1.3.2.1 Phase précoce du cycle viral	11
1.3.2.2. Phase tardive du cycle viral	12
1.4 Hétérogénéité génétique	13
1.5 Tropisme cellulaire	14
1.6 Modes de transmission	17
1.7 Mécanismes impliqués dans la transmission sexuelle du VIH	20
2. LES MUQUEUSES ET L'IMMUNITE MUCOSALE	24
2.1. Le système immunitaire mucosal: sites inductifs et sites effecteurs	25
2.1.1 Les sites inductifs	26
2.1.2 Les sites effecteurs	28
2.2 Les immunoglobulines dans les sécrétions mucosales: structure et fonctions	30
2.2.1 Structure des IgA-S	30
2.2.2 Fonctions des IgA-S	32
3. PROPHYLAXIE	36

3.1	Défis dans le développement d'un vaccin anti-VIH	36
3.2	Épitopes antigéniques du VIH	39
3.3	Stratégies de vaccination	42
3.3.1	Particules virales atténuées	42
3.3.2	Particules virales inactivées	44
3.3.3	Virus recombinants	46
3.3.4	Peptides synthétiques	48
3.3.5	Anticorps anti-idiotypiques	49
3.3.6	Sous-unités virales naturelles et recombinantes	51
	MATERIEL ET METHODES	57
1.	ETAPES PRINCIPALES	58
2.	PRODUCTION ET PURIFICATION	
	DES GLYCOPROTEINES VIRALES gp 160/120	58
2.1	Infection des cellules CEM par le VIH-1 et production virale	58
2.2	Isolement des glycoprotéines virales	59
2.3	Purification des glycoprotéines virales	60
2.4	Caractérisation des glycoprotéines virales gp 160/120 ...	61
2.4.1	Dosage des protéines par spectrophotométrie: méthode Bio-Rad	61
2.4.2	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	62
3.	PREPARATIONS VACCINALES	64
3.1	Production des immunosomes-VIH	64
3.2	Caractérisation des immunosomes-VIH	65
3.3	Préparation des capsules entériques	66
3.4	Préparation des suppositoires vaginaux	66
4.	MODELE ANIMAL	67
4.1	La souris	67
4.2	Le lapin	68
5.	IMMUNISATIONS DES ANIMAUX	68
5.1	Immunisations mucoales	68
5.1.1	Immunisation par voie orale	68
5.1.2	Immunisation par voie vaginale	69
5.1.3	Immunisation intraluminale	69
5.1.3.1	Directe par laparotomie	69

5.1.3.2	Indirecte par capsules entériques	71
5.2	Immunisations parentérales	71
5.2.1	Immunisation intramusculaire	71
5.2.2	Immunisation intrapéritonéale	72
5.2.3	Immunisation intradermique	72
6.	PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	72
6.1	Chez la souris	72
6.1.1	Salive	72
6.1.2	Sérum	73
6.1.3	Sécrétions intestinales	74
6.1.4	Homogénat intestinal	74
6.2	Chez le lapin	75
6.2.1	Sérum	75
6.2.2	Sécrétions intestinales	75
6.2.2.1	Induction de diarrhée	75
6.2.2.2	Traitement des sécrétions intestinales	76
6.2.3	Salive	77
6.2.4	Larmes	77
6.2.5	Urine	77
6.2.6	Sécrétions vaginales	78
6.2.7	Mucus du colon et du grêle, appendice	78
7.	ANALYSE DES ECHANTILLONS	78
7.1	Test immunoenzymatique-ELISA	79
7.2	Test d'immunofluorescence indirecte	80
7.3	Evaluation du pouvoir neutralisant des anticorps	81
7.3.1	Test de neutralisation classique sur cellules CEM	81
7.3.2	Test de neutralisation sur cellules HeLa-CD4-LTR-βgal	82
	RESULTATS	84
1.	PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DES GLYCOPROTEINES DU VIH-1	85
2.	PREPARATION ET CARACTERISATION DES IMMUNOSOMES VIH	86
3.	EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET SYSTEMIQUE	

ANTI-VIH DANS LE MODELE SOURIS	87
3.1 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à une intervention parentérale	87
3.2 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à des interventions mucosales	88
3.2.1 Immunisations orales	88
3.2.1.1 Effet de la durée des immunisations	88
3.2.1.2 Effet de la fréquence des immunisations...	89
3.2.2 Immunisation intraluminale	89
3.3 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à des protocoles à interventions mixtes	90
4. EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET SYSTEMIQUE ANTI-VIH DANS LE MODELE LAPIN	92
4.1 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à différents protocoles d'immunisation par voie mucoale ou parentérale seulement	92
4.2 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à des combinaisons d'interventions mucosales et parentérales	94
4.3 Evolution des titres d'anticorps sériques au cours des protocoles d'immunisation	98
5. EVALUATION DU POUVOIR NEUTRALISANT DES ANTICORPS..	100
5.1 Test de neutralisation utilisant les cellules CEM	100
5.2 Test de neutralisation utilisant les cellules HeLa-CD4-LTR-βgal	101
6. RESUME DES RESULTATS	102
DISCUSSION	104
1. EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET HUMORALE ANTI-VIH SUITE A UNE INTERVENTION PARENTERALE	105
2. EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET HUMORALE ANTI-VIH SUITE A DES INTERVENTIONS MUCOSALES	107
3. EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET HUMORALE ANTI-VIH SUITE A DES PROTOCOLES A INTERVENTIONS MIXTES	111
4. EVALUATION DU POUVOIR NEUTRALISANT DES ANTICORPS	117

CONCLUSION	119
REMERCIEMENTS	123
FIGURES	126
TABLEAUX	160
BIBLIOGRAPHIE	189
ANNEXES	223
ANNEXE I	224
ANNEXE II	226
ANNEXE III	227
ANNEXE IV	230

LISTE DES ABREVIATIONS

A ₂₃₀	:	Absorbance à 230 nm
A ₂₆₀	:	Absorbance à 260 nm
aa	:	Acide aminé
ADCC	:	"Antibody dependant cell cytotoxicity" (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps)
<i>ad libitum</i>	:	A volonté
AIDS	:	"Acquired immunodeficiency syndrome" (syndrome de l'immunodéficience acquise)
Ala	:	Alanine
Anti-Id	:	Anticorp anti-idiotypique
Arg	:	Arginine
ARV	:	"AIDS-related viruses"
BALT	:	"Bronchial-associated lymphoid tissue" (organes lymphoïdes annexés aux voies respiratoires)
BCG	:	<i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin
β-gal	:	β-galactosidase
BIV	:	"Bovine immunodeficiency virus" (virus de l'immunodéficience bovine)
BSA	:	Albumine bovine sérique
°C	:	Degré Celcius
Ca ⁺⁺	:	Ion calcium
CAEV	:	"Caprine arthritis and encephalitis virus" (virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre)
Caps	:	Capsules entériques
cDNA	:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Chaîne α	:	Chaîne lourde alpha

Chaîne κ	:	Chaîne légère kappa
Chaîne λ	:	Chaîne légère lambda
CHO	:	"Chinese hamster ovary" (ovaire de hamster chinois)
cm	:	Centimètre (10^{-2} mètre)
CO ₂	:	Dioxyde de carbone
-COOH	:	Extrémité carboxylique
DICT ₅₀	:	Dose infectieuse à 50% en culture de tissus
DL-PGL	:	"Poly-DL-lactide -co-glycolide"
DMEM	:	"Dulbecco's modified eagle medium"
DNA	:	Acide désoxyribonucléique
D.O.	:	Densité optique
DOC	:	Acide désoxycholique
DPP IV	:	Dipeptidyl peptidase IV
EDTA	:	Ethylène diamine tétraacétate de sodium
EIAV	:	"Equine infectious anemia virus" (virus de l'anémie infectieuse équine)
ELISA	:	"Enzyme-linked immunosorbant assay"
<i>env</i>	:	"Envelope gene" (gène de l'enveloppe)
<i>et al.</i>	:	et collaborateurs
Fc	:	Fragment cristallisable
FIV	:	"Feline immunodeficiency virus" (virus de l'immunodéficience féline)
g	:	Gravité terrestre
<i>gag</i>	:	"Group-specific antigen gene" (gène codant pour l'antigène spécifique de groupe)

GALT	:	"Gut-associated lymphoid tissue" (organes lymphoïdes annexés au tube digestif)
Gly	:	Glycine
gp	:	Glycoprotéine
HA	:	Hémagglutinine
HCl	:	Acide chlorhydrique
HEPES	:	Acide N'-2-hydroxyéthylpiperazide-N'éthanesulfonique
HIV	:	"Human immunodeficiency virus" (virus de l'immunodéficience humaine)
HSV-2	:	Virus herpes simplex de type 2
HTLV-III	:	"Human T-cell lymphotropic virus type III"
H ₂ O	:	Eau
H ₂ SO ₄	:	Acide sulfurique
ID	:	Intradermique
IG	:	Intra-gastrique
Ig	:	Immunoglobuline
IgA	:	Immunoglobuline A
IgA-S	:	IgA sécrétoire
IgD	:	Immunoglobuline D
IgE	:	Immunoglobuline E
IgG	:	Immunoglobuline G
IgM	:	Immunoglobuline M
IL	:	Intraluminal
IL-2	:	Interleukine-2
IL-4	:	Interleukine-4
IL-5	:	Interleukine-5

IL-6	:	Interleukine-6
IM	:	Intramusculaire
IMS	:	Immunosome
<i>intra partum</i>	:	Lors de l'accouchement
<i>in utero</i>	:	Dans l'utérus
intest.	:	Intestinal
IP	:	Intrapéritonéal
IT	:	Intratrachéal
IV	:	Intraveineux
IVa	:	Intravaginal
k	:	Kilo (mille)
KCL	:	Chlorure de potassium
kDa	:	Kilodaltons
kg	:	Kilogramme (10^3 grammes)
KLH	:	"Keyhole limpet hemocyanin"
L	:	Litre
LAV	:	"Lymphadenopathy-associated virus"
LTR	:	"Long terminal repeats" (séquences répétitives aux extrémités)
M	:	Molaire
m ²	:	Mètre carré
mAb	:	Anticorps monoclonal
MALT	:	"Mucosal-associated lymphoid tissue" (organes lymphoïdes annexés aux muqueuses)
mg	:	Milligramme (10^{-3} gramme)
µg	:	Microgramme (10^{-6} gramme)
Mg ⁺⁺	:	Ion magnésium

MHC-II	:	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
mIgA	:	IgA monomérique
mL	:	Millilitre (10^{-3} litre)
μ L	:	Microlitre (10^{-6} litre)
mm	:	Millimètre (10^{-3} mètre)
μ m	:	Micromètre (10^{-6} mètre)
mM	:	Millimolaire (10^{-3} molaire)
μ mol	:	Micromole (10^{-6} mole)
MOI	:	Indice de multiplicité d'infection
Mr	:	Masse moléculaire relative
mRNA	:	Acide ribonucléique messenger
N	:	Normal
NaCl	:	Chlorure de sodium
ND	:	Non déterminé
<i>nef</i>	:	"Negative regulator factor gene" (gène codant pour le facteur de régulation négatif)
Nef	:	"Negative regulator factor" (facteur de régulation négatif)
-NH ₂	:	Extrémité amine
(NH ₄) ₂ SO ₄	:	Sulfate d'ammonium
ng	:	Nanogramme (10^{-9} grammes)
nm	:	Nanomètre (10^{-9} mètre)
OGP	:	β -D-octyl-glucopyranoside
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
OPD	:	Ortho-phénylènediamine dihydrochlorure
p	:	Protéine
PBS	:	Solution saline tamponée contenant des ions phosphates

PEG	:	Polyéthylèneglycol
p.i.	:	Post infection
pIgA	:	IgA polymérique
PC	:	Phosphatidylcholine
PCR	:	"Polymerase chain reaction" (réaction de polymérisation en chaîne)
Phe	:	Phénylalanine
PMSF	:	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PND	:	"Principal neutralizing determinant" (déterminant principal de neutralisation)
<i>pol</i>	:	"Polymerase gene" (gène de la polymérase)
<i>post partum</i>	:	Après l'accouchement
PP	:	Plaqué de Peyer
Pro	:	Proline
<i>rev</i>	:	"Regulator of viron protein expression gene" (gène codant pour le régulateur de l'expression des protéines virales)
Rev	:	"Regulator of viron protein expression" (régulateur de l'expression des protéines virales)
RNA	:	Acide ribonucléique
rpm	:	Révolutions par minute
RPMI	:	"Roswell Park Memorial Institute"
RT	:	Transcriptase inverse
S.	:	Sécrétions
SALT	:	"Skin-associated lymphoid tissue" (organes lymphoïdes annexés à la peau)
SC	:	Pièce sécrétoire

SDS	:	Dodécyl sulfate de sodium
SIDA	:	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SIV	:	"Simien immunodeficiency virus" (virus de l'immunodéficience simienne)
<i>S.mutans</i>	:	<i>Streptococcus mutans</i>
TEMED	:	N-N-N'-N'-tétraméthyléthylènediamine
TAR	:	"Trans-activating responsive element"
<i>tat</i>	:	"Trans-activating transcriptional regulator gene" (gène codant pour le régulateur activant en <i>trans</i> la transcription)
Tat	:	"Trans-activating transcriptional regulator" (régulateur activant en <i>trans</i> la transcription)
V3	:	Troisième boucle hypervariable
VIH	:	Virus de l'immunodéficience humaine
VIH-1	:	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	:	Virus de l'immunodéficience humaine de type 2
<i>vif</i>	:	"Virion infectivity factor gene" (gène codant pour le facteur déterminant l'infectivité du virus)
Vif	:	"Virion infectivity factor" (facteur déterminant l'infectivité du virus)
<i>vpr</i>	:	"Viral protein R gene" (gène codant pour la protéine virale R)
Vpr	:	"Viral protein R" (protéine virale R)
<i>vpu</i>	:	"Viral protein U gene" (gène codant pour la protéine virale U)
Vpu	:	"Viral protein U" (protéine virale U)
%	:	Pourcentage
<	:	Plus petit que

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Représentation schématique du VIH	127
Figure 2:	Organisation génomique du VIH-1	129
Figure 3:	Le système immunitaire mucosal	131
Figure 4:	Profil électrophorétique des glycoprotéines virales purifiées et des immunosomes VIH	133
Figure 5:	Morphologie de l'immunosome VIH-1 et du VIH-1	135
Figures 6 et 7:	Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IVa-IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	137
Figure 8:	Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IM-IVa avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	140
Figure 9:	Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation Caps-IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	142
Figure 10:	Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IM-Caps avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	144
Figure 11:	Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	146
Figure 12:	Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IM-Caps-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	148
Figure 13:	Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IM-IVa-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	150

Figure 14:	Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation Oral-IM-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	152
Figure 15:	Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation Caps-IM-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin.....	154
Figure 16:	Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IVa-IM-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	156
Figure 17:	Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IL-IM-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole à une intervention parentérale par voie IM ou IP avec l'IMS-VIH-1 chez la souris	161
Tableau II:	Effet de la <i>durée</i> des immunisations orales avec l'IMS-VIH-1 sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1 chez la souris	163
Tableau III:	Effet de la <i>fréquence</i> des immunisations orales avec l'IMS-VIH-1 sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1 chez la souris	165
Tableau IV:	Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole à une seule immunisation IL et à une combinaison d'interventions IL-IM avec l'IMS-VIH-1 chez la souris	167
Tableau V:	Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 selon deux protocoles d'immunisation inversés par voies orale et IM avec l'IMS-VIH-1 chez la souris	169
Tableau VI:	Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 selon deux protocoles d'immunisation inversés par voies orale et IM avec l'IMS-VIH-1 chez la souris	171
Tableau VII:	Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 selon différentes voies mucosales d'immunisation avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	173
Tableau VIII:	Effet de la durée des immunisations intravaginales avec l'IMS-VIH-1 sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1 chez le lapin	175
Tableau IX:	Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon deux protocoles d'immunisation inversés par voies IVa et IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin.....	177
Tableau X:	Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon deux protocoles d'immunisation inversés par voies IM et orale par capsules entériques avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	179

Tableau XI:	Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon différents protocoles d'immunisation par voie mucoale-parentérale avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin	181
Tableau XII:	Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA et évaluation de leur activité neutralisante sur cellules CEM	183
Tableau XIII:	Titrage du VIH-1 sur la lignée cellulaire HeLa-CD4-LTR-βgal	185
Tableau XIV:	Evaluation de l'activité neutralisante des anticorps spécifiques du VIH-1 utilisant la lignée cellulaire HeLa-CD4-LTR-βgal	187

SOMMAIRE

Dans la dernière décennie, des efforts sans précédent à l'échelle mondiale ont été déployés pour comprendre et combattre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la maladie qu'il induit. Bien que les campagnes de prévention et d'information aient été importantes, le nombre de cas ne cesse d'augmenter. L'absence d'une cure et l'issue fatal du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) font que le développement d'un vaccin s'impose comme une nécessité des plus grandes.

Les modèles expérimentaux de vaccin contre le VIH et d'autres lentivirus, notamment le SIV et le FIV, qui sont présentement en évaluation sont constitués soit de particules virales atténuées ou inactivées, de virus recombinants exprimant certains gènes du VIH, de peptides synthétiques dans des épitopes choisis, d'anticorps anti-idiotypiques, de sous-unités virales naturelles ou recombinantes et d'immunosomes-VIH et -SIV. Jusqu'à présent, la majorité des études de vaccination dans lesquelles une immunité protectrice a été rapportée dans les modèles chimpanzé-VIH, macaque-SIV et chat-FIV, les auteurs ont suivi des protocoles d'immunisation parentérale et l'épreuve a été intraveineuse. Or, bien que le VIH puisse être transmis par le sang et les dérivés sanguins (voie parentérale), les contacts homo- et hétérosexuels représentent la voie principale de transmission du virus. Il a été clairement démontré que le virus peut pénétrer les muqueuses génitales et colorectales même si celles-ci sont dépourvues de lésions. En général, les muqueuses représentent une barrière physique et une barrière immunologique qui protège avec efficacité l'organisme contre les pathogènes rencontrés en ces lieux. Etant donné que l'immunité au niveau des muqueuses n'est pas stimulée par les protocoles d'immunisation conventionnels, et vue la transmission sexuelle du VIH, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle

l'induction d'une immunité mucoale associée à l'immunité humorale et cellulaire pourrait s'avérer essentielle à la protection contre l'infection par le VIH. Peu de travaux ont été publiés concernant les conditions optimales d'immunisation capables de stimuler le système immunitaire dans sa totalité.

Dans notre projet, utilisant les immunosomes-VIH comme vaccin, nous avons voulu définir les paramètres requis pour obtenir une stimulation maximale à la fois de l'immunité mucoale et systémique chez les animaux de laboratoire. Nous avons d'abord évalué, chez la souris, les paramètres tels que le nombre, la voie, le type, la durée des immunisations ainsi que l'intervalle entre chacune d'elles. Différentes combinaisons de vaccinations mucoale-parentérale et parentérale-mucoale ont été aussi analysées. Les protocoles qui nous ont semblé les plus performants ont été ensuite évalués chez le lapin. Nous avons déterminé le titre et l'isotype des anticorps qui reconnaissent spécifiquement le VIH dans les échantillons prélevés dans le sang et dans les différents compartiments mucaux. De plus, l'activité neutralisante des anticorps de certains échantillons a été évaluée par deux méthodes différentes.

Nous avons montré que les immunisations parentérales seules ne stimulent pas l'immunité mucoale, malgré qu'elles induisent la production d'anticorps sériques. Au contraire, il est possible d'induire à la fois une forte réponse systémique et mucoale par un protocole à interventions mucales seulement. Cette réponse, qui est dépendante de la fréquence et la durée des immunisations, est encore plus élevée lorsque les interventions mucales et parentérales sont combinées. En général, les protocoles où les immunisations mucales précèdent l'intervention intramusculaire semblent être plus efficaces à cet effet. Par ailleurs, le système immunitaire est vigoureusement stimulé

lorsqu'une intervention intradermique suit les immunisations mucoales et intramusculaire. Ceci est démontré par les titres considérables des anticorps de tous les isotypes au niveau du sérum et des différents compartiments mucoaux. Les anticorps qui sont induits reconnaissent spécifiquement le VIH et sont capables de neutraliser l'infectivité du virus *in vitro*. Nos résultats montrent que les immunisations mucoales et par voie intradermique devraient être sérieusement considérées dans l'établissement de protocoles d'immunisation contre le VIH chez l'humain.

INTRODUCTION

Dans l'histoire de la recherche biomédicale, le VIH est vraisemblablement le virus qui a été le plus intensément étudié. L'infection et la maladie fatale qu'il cause se sont étendues à l'échelle mondiale comme un fléau des plus insidieux. Le VIH lui-même ne tue pas l'individu, cependant l'immunosuppression qu'il provoque rend celui-ci vulnérable aux infections opportunistes et à certains néoplasmes (Rosenberg et Fauci, 1989).

L'infection primaire par le VIH est associée à une virémie aigüe. Entre 50 à 70% des individus infectés développent un syndrome aigu qui ressemble à la mononucléose infectieuse, trois à six semaines après l'infection initiale. Celle-ci est caractérisée par un ou plusieurs des symptômes suivants: fièvre, transpiration, myalgie, léthargie, malaise, anorexie, nausée, diarrhée, infections, maux de tête et encéphalite (Tindal et Cooper, 1991). Durant ce stade, une immunité humorale et cellulaire spécifique du VIH se développe et est accompagnée d'une réduction considérable de la virémie. La séroconversion est suivie d'une période de latence, dix ans en moyenne, durant laquelle les individus sont pour la plupart asymptomatiques. Bien que la virémie soit difficilement détectable durant cette période, la réplication virale dans les organes lymphoïdes est considérable. Utilisant la méthode de polymérisation en chaîne (PCR) ainsi que la PCR-transcriptase inverse (RT-PCR) Pantaleo *et al.* (1993) ont montré que chez les patients infectés par le VIH, la charge virale est de cinq à dix fois plus élevée dans les ganglions lymphatiques que dans le sang périphérique. Par ailleurs, la période de latence est caractérisée par la détérioration progressive du système immunitaire, manifestée particulièrement par la déplétion des lymphocytes T-auxiliaires. L'inévitable conséquence est l'évolution de la maladie, un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) associé à un néoplasme assez rare et à des infections opportunistes. Ces dernières sont la cause principale de la morbidité et

la mortalité des patients. Les médicaments qui sont utilisés réussissent à prolonger la vie des individus infectés, mais ne sont pas une guérison. La thérapie clinique est pour la plupart palliative. A l'heure actuelle, la prévention demeure l'unique espoir de vaincre cette maladie.

Malgré de nombreux défis rencontrés dans le développement d'un vaccin contre de VIH, plusieurs stratégies de vaccination expérimentales dans les modèles chimpanzé-VIH, macaque-SIV et chat-FIV ont montré des résultats très prometteurs. Une protection contre l'infection virale initiale suite à divers protocoles d'immunisation a été rapportée utilisant à titre de vaccin des particules virales atténuées (Daniel *et al.*, 1992) ou inactivées (Carlson *et al.*, 1990; Cranage *et al.*, 1992a, 1992b; Desrosiers *et al.*, 1989; Fultz *et al.*, 1992; Girard *et al.*, 1991, 1992; Johnson *et al.*, 1992a; Murphey-Corb *et al.*, 1989, 1992; Putkonen *et al.*, 1991, 1992; Stott *et al.*, 1991b; Yamamoto *et al.*, 1991, 1993), un virus recombinant (Cranage *et al.*, 1992b; Hu *et al.*, 1992) et des sous-unités virales naturelles ou recombinantes (Berman *et al.*, 1990). La vaccination, même si elle n'est pas protectrice, réduit la charge virale et ainsi prolonge la vie des animaux (Marthas *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989; Murphey-Corb *et al.*, 1992; Sutjipto *et al.*, 1990). Dans la majorité des études de vaccination qui ont rapporté une protection contre le VIH, le SIV et le FIV, l'épreuve virale a été par voie parentérale. Celle-ci, cependant, ne représente pas la voie de transmission principale du VIH qui se fait par contacts sexuels. En effet l'étude de Marthas et Miller (1992) a montré que les macaques vaccinés par voie parentérale étaient protégés contre une épreuve intraveineuse, mais pas contre une épreuve intravaginale. Ces observations associées de la démonstration que le virus peut être transmis à travers des muqueuses génitales intactes montrent la nécessité d'induire une immunité en ces lieux.

L'importance de l'immunité associée aux muqueuses et son rôle protecteur contre les agents pathogènes rencontrés en ces lieux sont bien documentés. Les immunisations parentérales stimulent la synthèse d'anticorps sériques, mais ont tendance à être inefficaces dans l'induction d'anticorps au niveau des muqueuses (Coutsinos et Thibodeau, 1993; McDermott *et al.*, 1990; Thibodeau *et al.*, 1992a, 1992b). Ces observations suggèrent que les interventions parentérales seules sont insuffisantes pour induire une protection contre les infections transmises à travers les muqueuses.

Vue la transmission sexuelle du VIH et la pertinence de l'immunité mucosale, une bonne stratégie de vaccination devrait induire une immunité mucosale, en plus d'une immunité systémique. A ce jour, il existe peu de travaux qui traitent spécifiquement de stratégies optimales pour armer les deux bras du système immunitaire, l'immunité systémique et mucosale. Notre projet de recherche vise donc à étudier, chez la souris et le lapin, les modes d'induction d'une immunité mucosale spécifique au VIH associée à une forte immunité systémique. Nous utiliserons à titre de vaccin l'immunosome-VIH (IMS-VIH) qui est constitué de vésicules phospholipidiques (liposomes) à la surface desquelles sont ancrées les glycoprotéines du VIH. Le potentiel des IMS-VIH dans la réponse immunitaire humorale a été clairement démontré (Thibodeau *et al.*, 1989). Les différents paramètres d'immunisation que nous proposons d'évaluer sont: la voie d'immunisation, le protocole, la fréquence, l'intervalle et la durée des interventions, ainsi que la dose antigénique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Il y a plus d'une décennie que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été identifié comme étant l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Cette maladie, initialement décrite en 1981 aux Etats-Unis, est le résultat d'un profond déséquilibre du système immunitaire (Rosenberg et Fauci, 1989). Les observations qui ont mené à la découverte de cette maladie étaient l'incidence d'infections opportunistes, particulièrement une pneumonie d'un type rare causée par un protozoaire, le *Pneumocystis carinii* et une tumeur du tissu conjonctif, le sarcome de Kaposi (Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.*, 1981; Siegal *et al.*, 1981), associées à une immunodéficience inexpiquée.

La première indication que le SIDA pouvait être causé par un rétrovirus a été apportée par Barré-Sinoussi *et al.* (1983) de l'Institut Pasteur de Paris lorsqu'ils ont isolé, à partir de ganglions lymphatiques d'un patient souffrant d'une lymphadénopathie, un virus qui possède une enzyme caractéristique des rétrovirus, la transcriptase inverse. Le virus isolé a été nommé LAV ("lymphadenopathy-associated virus"). Un virus ayant des propriétés lymphotropiques et cytopathogènes analogues à l'isolat français, a été isolé en 1984 par un groupe de chercheurs des Etats-Unis (Gallo *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984) à partir de cellules lymphoïdes de patients souffrants du SIDA. En raison du tropisme cellulaire de ce virus il a été appelé HTLV-III ("human T-cell lymphotropic virus type III"). Cette même année, Levy *et al.* (1984) rapportèrent l'isolation de virus similaires qu'ils nomment ARV ("AIDS-related viruses"). Ces trois virus prototypes (LAV, HTLV III et ARV) ont été, par la suite, reconnus comme faisant partie d'un même type de rétrovirus possédant les propriétés du genre lentivirus (Ratner *et al.*, 1985b).

C'est en 1986 que, sous le recommandation du comité international de taxonomie, l'agent étiologique du SIDA a été nommé HIV ("human immunodeficiency virus") ou virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en français (Coffin *et al.*, 1986).

1. CARACTERISTIQUES DU VIH

1.1 Classification

Le VIH appartient à la famille des *RETROVIRIDAE* et fait partie du genre lentivirus qui, comme son nom l'indique, est caractérisé par un développement très lent de la maladie qu'il provoque. De plus, le VIH est un virus cytolitique dont l'effet cytopathogène *in vitro* se traduit par la formation de cellules géantes, ou syncytia, suivie d'une lyse cellulaire.

Outre le VIH, le genre lentivirus regroupe d'autres virus qui causent des immunodéficiences et qui, sur le plan génétique, biologique et morphologique lui sont apparentés. Un groupe de rétrovirus simiens causant des déficiences immunitaires et des lymphomes a été identifié chez le rhésus macaque (*Macaca mulatta*) (Daniel *et al.*, 1985; Kestler *et al.*, 1988), chez le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (Kestler *et al.*, 1988) et chez le macaque "pig-tailed" (*Macaca nemestrina*) (Benveniste *et al.*, 1986).

Des lentivirus causant une déficience immunitaire ont aussi été isolés chez le chat domestique, le bovin, le cheval, la chèvre et le mouton; ce sont respectivement, le virus de l'immunodéficience féline (FIV: "feline immunodeficiency virus"), le virus de l'immunodéficience bovine (BIV: "bovine immunodeficiency virus"), le virus de l'anémie infectieuse équine

(EIAV: "equine infectious anemia virus"), le virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre (CAEV: "caprine arthritis and encephalitis virus") et le virus visna (Gonda *et al.*, 1985, 1986, 1987; Pedersen *et al.*, 1987).

1.2 Morphologie

Sur le plan de la morphologie, le VIH est un virus sphérique, enveloppé, ayant un diamètre d'environ 100 nm. Des études en microscopie électronique, après colorations négatives (Stannard *et al.*, 1987) et par coupes ultra-minces de cellules infectées (Gelderblom *et al.*, 1987, Montagnier *et al.*, 1984a, Palmer et Goldsmith, 1988) ont permis une description détaillée de sa structure. Une représentation schématique du VIH apparaît à la figure 1. Le génome viral est constitué de deux copies de RNA monocaténaire de polarité positive. Les polypeptides p6 et p7 et une enzyme la transcriptase inverse (RT) sont intimement liés au génome viral. Cette dernière est une DNA polymérase RNA dépendante qui a pour rôle de transcrire le RNA viral en DNA, nécessaire à l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Trois autres enzymes sont identifiées au niveau de la ribonucléoprotéine: une ribonucléase, une intégrase et une protéase (Greene, 1991). L'information génétique du virion est protégée par la capsidie composée de la protéine structurale phosphorylée, la p24.

L'ensemble de la capsidie et la ribonucléoprotéine qu'elle renferme forment le nucléoïde, une structure en forme de cône, dense aux électrons en microscopie électronique. La surface sous-jacente de l'enveloppe virale est tapissée d'une protéine structurale myristillée, la p17. La matrice, que forme cette protéine, est essentielle à l'intégrité du virus (Gelderblom *et al.*, 1987;

1989). Une étude récente suggère que cette matrice est requise pour l'incorporation des protéines de l'enveloppe à la surface des virions matures (Yu *et al.*, 1992). Finalement, l'enveloppe virale, dérivée de la cellule hôte, porte des trimères ou tétramères de spicules glycoprotéiques qui sont formées de gp120 liées de façon non-covalente aux gp41 qui sont ancrées dans l'enveloppe virale par leurs portions hydrophobes (Earl *et al.*, 1990; Ozel *et al.*, 1988; Pinter *et al.*, 1989; Weiss *et al.*, 1990). La membrane virale peut contenir également des protéines de la cellule hôte, incluant les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II, acquis lors du bourgeonnement à la surface cellulaire (Greene, 1991).

1.3 Organisation et expression des gènes du VIH

Ce qui distingue les lentivirus des autres rétrovirus est leur complexité génomique (figure 2). L'organisation du DNA proviral telle qu'on peut la reconstituer à partir de clonage moléculaire (Hahn *et al.*, 1984) et de séquençage (Desai *et al.*, 1986; Ratner *et al.*, 1985a) montre les trois gènes structuraux essentiels *gag*, *pol* et *env*, communs à tous les rétrovirus. Le génome viral contient en outre, d'autres gènes: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* auxquels on associe une fonction de régulation ou un rôle dans l'infectivité. L'action de ces gènes additionnels semble être à la base de la pathogénicité du VIH-1 (Greene, 1991). Des séquences répétitives (LTR, "long terminal repeats") bordent les extrémités génomiques. Celles-ci portent les éléments qui répondent aux produits des gènes *tat* et *rev*.

1.3.1 Gènes structuraux

Les produits des gènes structuraux, qui sont, à partir de l'extrémité 5', *gag*, *pol* et *env*, définissent la morphologie des virions matures. Le gène *gag* code pour une polyprotéine, (NH₂-p17-p24-p9-p7-COOH), dont la masse moléculaire relative (Mr) est d'environ 55 000. Ce précurseur est clivé par une protéase virale en trois protéines: la p24/25 phosphorylée, une composante majeure de la nucléocapside, la p17/18 myristylée, sous-jacente à l'enveloppe virale et la p13/15 une protéine qui est clivée lors de la maturation virale en deux polypeptides, la p6 et la p7, intimement liés au RNA génomique (Gelderblom *et al.*, 1989; Mervis *et al.*, 1988).

Le gène *pol* code pour une polyprotéine qui est clivée pour donner lieu à la p10 une protéase, la p66/51 qui est la transcriptase inverse, la p31/34 une intégrase (Di Marzo *et al.* 1986; Lightfoote *et al.*, 1986; Mous *et al.*, 1988) et une ribonucléase (Greene 1991). Ces enzymes sont activées à différentes étapes du cycle répliatif viral. La transcriptase inverse agit dans les étapes précoces de la répliation virale pour former un DNA bicaténaire (cDNA), copie du RNA viral. La synthèse du deuxième brin de DNA par la RT ne peut s'effectuer qu'après l'action de la ribonucléase qui dégrade partiellement le RNA viral qui a servi de gabarit (Greene , 1991). L'intégrase exerce son activité à l'intérieur du noyau cellulaire et est requise pour l'intégration du DNA proviral dans le génome de la cellule hôte. Enfin la protéase clive les produits des gènes *gag* et *pol* durant la phase de la maturation des particules virales.

Les protéines synthétisées par le gène *env* sont sous forme d'un précurseur d'une masse relative de 160 000. Ce précurseur est glycosylé puis clivé par une protéase cellulaire en deux polypeptides de 120 kDa et de 41 kDa,

qui sont transportés à la surface cellulaire (Kozarsky *et al.*, 1989; Willey *et al.*, 1988). La gp41, une glycoprotéine transmembranaire est liée d'une façon non-covalente à la gp120 qui est exposée à la surface des virions matures.

1.3.2 Gènes de régulation et gènes accessoires

1.3.2.1 Phase précoce du cycle viral

La phase précoce précède et permet la réplication du génome viral (Girard *et al.*, 1989). L'étape initiale dans l'expression des gènes du VIH est la stimulation de la cellule hôte. Cette stimulation, qu'elle soit d'origine exogène ou endogène, induit l'expression de facteurs transcriptionnels notamment la famille NF- κ B des protéines d'attachement au DNA (Greene *et al.*, 1989; Lenardo et Baltimore, 1989). Ces protéines qui normalement contrôlent l'expression des gènes cellulaires (Böhnlein *et al.*, 1988; Hoyos *et al.*, 1989) s'attachent aux LTR du génome proviral (Nabel et Baltimore, 1987) et augmentent ainsi l'expression des gènes du VIH. Les gènes de régulation du VIH sont les premiers à être transcrits et traduits. Un des gènes précoces qui est exprimé est le gene *tat*. Le produit d'expression de *tat* interagit en *trans* avec la séquence nucléotidique TAR ("trans activating responsive element") présente dans la séquence de tête ("leader") des RNA messagers viraux (Rosen *et al.*, 1985). La protéine Tat serait impliquée dans l'activation de plusieurs étapes au cours de la transcription et post-transcription, incluant l'initiation de la transcription, l'élongation, la stabilisation et le transport des mRNA ainsi que dans l'efficacité de la traduction (Wong-Stall, 1990). Cette protéine est essentielle à la réplication virale; en effet, des mutants défectifs dans le gène *tat*

ne peuvent donner une progéniture virale, à moins que Tat soit fournie en *trans* (Dayton *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1986a).

Le gène *nef* est également exprimé à la phase précoce de la réplication virale. Le produit d'expression du gène *nef*, est une protéine myristyllée qui, contrairement à Tat, n'est pas essentielle à la réplication virale. Lorsqu'elle est produite, cette protéine ralentit la transcription des gènes viraux. En effet, des mutants défectifs du gène *nef* se répliquent 2 à 10 fois mieux que le virus de type sauvage (Fisher *et al.*, 1986b ; Luciw *et al.*, 1987).

Un autre gène qui est exprimé pendant la phase précoce de la réplication virale est *vpr*. Des études récentes suggèrent que le produit de ce gène fonctionne comme un activateur transcriptionnel (Vaishnav et Wong-Staal, 1991). Comme Nef, cette protéine n'est pas indispensable pour la réplication virale. Il est à noter que Vpr est la première protéine de régulation de rétrovirus qui est associée aux particules virales. Les autres protéines comme Tat, Rev, Nef, Vif et Vpu, ne sont pas associées aux virions matures (Vaishnav et Wong-Staal, 1991).

1.3.2.2 Phase tardive du cycle viral

La phase tardive du cycle viral accompagne et suit la réplication du génome viral (Girard *et al.*, 1989). La transition entre l'expression des gènes précoces du virus et la phase tardive du cycle viral semble être dépendante du produit du gène *rev*, une phosphoprotéine (Sodroski *et al.*, 1986). Une délétion dans le gène *rev* conduit à une abolition de la synthèse des protéines structurales sans pour autant affecter la synthèse des protéines de régulation

(Tat et Nef) (Wong-Staal, 1990). L'analyse des RNA messagers produits par des cellules transfectées avec des DNA proviraux mutants indique que le profil des mRNA est modifié. Comme le gène *tat*, *rev* est essentiel à la réplication virale et à l'expression des gènes de structure.

Des études récentes ont révélé l'existence d'une protéine virale chimère Tev (Benko *et al.*, 1990) ou Tnv (Salfeld *et al.*, 1990). Un épissage anormal conduit à l'expression de trois gènes différents du VIH-1 et produit une protéine chimère, constituée du premier exon du gène *tat*, d'une petite région du gène *env* et du deuxième exon du gène *rev*. Cette protéine semble conserver les fonctions biologiques de Tat et Rev. Cependant son importance et son rôle précis dans le cycle réplcatif du VIH-1 ne sont pas connus.

Les protéines dérivées des gènes *vif* et *vpu* semblent avoir des rôles fonctionnels importants pendant la phase de la morphogénèse virale. La protéine Vif est nécessaire pour la production de virus infectieux (Fisher *et al.*, 1987). En effet, des mutants dans le gène *vif* produisent des particules virales qui sont 1000 fois moins infectieuses que les virus sauvages (Strebel *et al.*, 1987). Le produit du gène *vpu* semble jouer un rôle dans le bourgeonnement des virions à la surface des cellules (Klimkait *et al.*, 1990). Des mutations à l'intérieur du gène *vpu* conduisent à la production de virus dont le bourgeonnement à la surface de la cellule hôte est incomplet.

1.4 Hétérogénéité génétique

Le VIH réussit à échapper la surveillance immunitaire en produisant une population virale extrêmement hétérogène. Cette variabilité génomique

est le résultat d'erreurs commises par la transcriptase inverse, l'enzyme responsable de la réplication du génome viral. En effet, celle-ci ne possède pas un mécanisme qui corrige les erreurs qui ont lieu pendant la réplication. Il survient environ une erreur par 10000 nucléotides copiés, soit une incorporation incorrecte par génome par cycle de réplication (Dougherty et Temin, 1988). La recombinaison génétique entre les virions contribue aussi, mais très peu, à la génération de la diversité virale. Il existe une disparité quant à la nature des mutations ainsi que le taux de divergence parmi les différents gènes du VIH. La majorité des changements qui ont lieu au niveau des gènes *gag* et *pol* sont des mutations silencieuses, tandis que plus de la moitié des changements nucléotidiques au niveau du gène *env*, se traduisent par des changements d'acides aminés (Vaishnav et Wong-staal, 1991). La plus grande hétérogénéité de séquence est observée au niveau des gènes codant pour les glycoprotéines de l'enveloppe et les protéines de régulation (Martins *et al.*, 1991; Meyerhans *et al.*, 1989; Myers et Pavlakis, 1992). Cette variabilité génétique se traduit par une hétérogénéité antigénique et biologique, notamment en ce qui concerne le tropisme cellulaire (Von Briesen *et al.*, 1990), la cinétique de la réplication virale (Fenyo *et al.*, 1988), et l'effet cytopathogène (Cheng-Mayer *et al.*, 1988; Tersmette *et al.*, 1989).

1.5 Tropisme cellulaire du VIH

Les observations initiales de la déplétion sélective des lymphocytes T auxiliaires chez les patients atteints du SIDA (Gottlieb *et al.*, 1981; Siegal *et al.*, 1981), ainsi que la destruction des ces même cellules lors d'une infection par le VIH *in vitro* (Klatzmann *et al.*, 1984) ont suggéré que le VIH avait un tropisme pour cette population cellulaire. Dans une suite d'expériences *in vitro*, il a été

montré que des anticorps monoclonaux dirigés contre certains épitopes de la molécule CD4 pouvaient inhiber l'infectivité du VIH (Dalglish *et al.*, 1984 ; Klazmann *et al.*, 1984; McDougal *et al.*, 1985). Par ailleurs, une immunoprécipitation de complexes gp120-CD4 lors d'une incubation avec des anticorps dirigés contre une ou l'autre des protéines (McDougal *et al.*, 1986) a démontré que lorsque les lymphocytes T-auxiliaires sont exposés au VIH, la liaison virus-récepteur implique la glycoprotéine virale gp120 et la molécule CD4. Le rôle essentiel que joue la molécule CD4 dans la fixation et l'internalisation du VIH a finalement été démontré par Maddon *et al.* (1986). En effet, ce groupe de chercheurs ont rapporté qu'une transfection de cellules humaines de type épithéliales (HeLa) ou lymphocytaires (Raji et HSB2) (CD4⁻, donc non permissives au VIH) avec le gène qui code pour la molécule CD4, rend celles-ci susceptibles à l'infection par le VIH.

Le VIH n'est pas seulement lymphotropique, mais plutôt polytropique. Bien que la molécule CD4 soit exprimée principalement à la surface des lymphocytes T-auxiliaires matures (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984; McDougal *et al.*, 1986), elle est aussi présente à la surface de plusieurs autres types cellulaires tel que les lymphocytes B (Levy *et al.*, 1985a; Montagnier *et al.*, 1984b), les monocytes/macrophages (Asjö *et al.*, 1987; Clapham *et al.*, 1987; Levy *et al.*, 1985a; Nicholson *et al.*, 1986), les cellules de Langerhans (Tschachler *et al.*, 1987), les cellules dendritiques (Rappersberger *et al.* 1988), les cellules endothéliales, nerveuses et cérébrales (Gray, 1989), les cellules gliales (Cheng-Mayer *et al.*, 1987; Dewhurst *et al.*, 1987) et certaines lignées cellulaires colorectales (Adachi *et al.*, 1987 ; Nelson *et al.* 1988). Ces cellules sont également susceptibles à une infection par le VIH-1. Cependant, d'autres données

expérimentales suggèrent qu'une composante cellulaire autre que la molécule CD4 pourrait être requise pour l'infection virale. En effet, certains types cellulaires tels que des cellules neurales (Harouse *et al.*, 1989) et certaines lignées cellulaires hépatiques (Cao *et al.* 1990) ne possèdent pas de CD4 à leur surface mais sont néanmoins susceptibles à l'infection par le VIH. Par ailleurs, des expériences de transfection de cellules humaines et murines avec le gène qui code pour la molécule CD4 rend les premières seulement susceptibles à l'infection virale (Maddon *et al.*, 1986). L'hypothèse qu'une autre molécule soit impliquée, soutenue par plusieurs études (Bhat *et al.*, 1991; Harouse *et al.*, 1991; McKeating *et al.*, 1990; Yahy *et al.*, 1992), a été récemment démontrée par les expériences de Callebaut *et al.* (1993). Leur étude montre que la molécule CD26, ou dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), est le second récepteur cellulaire pour le VIH. Cette protéase dont l'expression augmente considérablement lors de l'activation des lymphocytes T (Mattern *et al.*, 1991; Schön *et al.*, 1989), clive ses substrats au niveau de séquences d'acides aminés spécifiques qui ont été identifiées et qui sont hautement conservées au niveau de la boucle V3 du VIH-1, VIH-2 ainsi que des souches simiennes (Callebaut *et al.*, 1993). Des anticorps monoclonaux (mAb) dirigés contre la molécule CD26 ainsi que des inhibiteurs peptidiques spécifiques (dont les séquences sont dérivées de la boucle V3) de cette protéase, particulièrement le tripeptide isoleucine-proline-isoleucine, inhibent à plus de 85% l'entrée du VIH dans les cellules CEM. Un pourcentage d'inhibition comparable a été obtenu lorsque des mAb dirigés contre la molécule CD4 ont été utilisés. Des résultats comparables ont été obtenus lorsque d'autres lignées cellulaires lymphoblastiques (MOLT4 et Jurkat) et monocytaire (U937) ont été utilisées. Par ailleurs, la co-expression des molécules CD4 et CD26 humaines dans des cellules murines (NIH 3T3) rend

celles-ci permissives à l'infection par le VIH-1 et le VIH-2. La production virale à partir de ces cellules est plus élevée comparativement aux cellules NIH 3T3 transfectées avec le gène codant pour le CD4 ou le CD26. Ces résultats expérimentaux suggèrent que la protéine cellulaire CD26 est un co-récepteur requis pour la pénétration du VIH dans les cellules CD4⁺ par son interaction avec la boucle V3.

1.6 Les modes de transmission du VIH

Au cours de la dernière décennie, le VIH et le syndrome qu'il induit se sont progressivement étendus à l'ensemble des continents sous la forme d'une pandémie frappant des millions d'hommes, de femmes et d'enfants. L'organisation mondiale de la santé estime que le nombre d'individus atteints se chiffre à au delà de 15 millions (OMS, 1992). Avant même que le VIH soit isolé, ses modes de transmission avaient déjà été établis. Des études épidémiologiques à l'échelle mondiale ont permis de mieux connaître ces modes de transmission qui sont regroupés en trois catégories principales: la transmission sexuelle, la transmission par voie sanguine et la transmission verticale d'une mère infectée à son enfant. En effet, les principaux véhicules de propagation du VIH sont le sang et les sécrétions sexuelles. Le virus est également détecté, mais en moindre quantité, dans la salive, les larmes, la sueur, l'urine et le lait maternel (Levy 1993). Cette quantité reste, cependant, au-dessous du seuil nécessaire pour provoquer l'infection. C'est ainsi que les contacts personnels étroits, autres que sexuels, avec des individus infectés ne présentent aucune preuve de transmission du VIH. Cependant, la capacité infectieuse d'une personne déjà atteinte, ou/et la susceptibilité de l'hôte au VIH peuvent être accrues en présence de facteurs concomitants tels que l'état

du système immunitaire, la virulence de la souche et la présence de lésions ainsi que des infections par d'autres microorganismes (Alexander, 1990).

Le mode principal de transmission du VIH est la voie sexuelle. Les statistiques, rapportées par Santé et Bien-être Social Canada, estiment que ce type de transmission est responsable d'au moins 80% des cas de SIDA chez les hommes et 63% chez les femmes. Initialement décrite comme limitée aux contacts homosexuels, la transmission hétérosexuelle est maintenant bien documentée. Il est clairement établi que les relations sexuelles avec pénétration anale ou vaginale, qu'elles soient hétérosexuelles ou homosexuelles, peuvent transmettre le VIH. La fragilité naturelle des muqueuses génitales fait qu'elles sont souvent le siège de micro-lésions et de micro-inflammations. Ceci permet donc le contact du virus présent dans le liquide séminal (Alexander, 1990; Anderson et Pudney, 1992) ou les sécrétions vaginales (Alexander, 1990) avec le courant sanguin de la personne non-contaminée. Les relations anales seraient les plus infectantes car elles sont les plus traumatisantes. La présence d'ulcères génitaux ou d'autres inflammations favorisent aussi la transmission du VIH. Ces pathologies, non seulement perturbent l'intégrité de l'épithélium génital mais aussi peuvent augmenter la population de cellules cibles pour le VIH par le recrutement de lymphocytes et de macrophages en ces lieux. D'autres co-facteurs susceptibles de jouer un rôle dans la transmission du VIH ont été proposés. Ce sont le stade de l'infection ou de la maladie, le niveau d'expression virale systémique et les effets hormonaux du cycle menstruel (Miller et Gardner, 1991). Cependant, il a été démontré que le VIH est capable de franchir la barrière physique des muqueuses génitales même si celles-ci sont dépourvues de lésions. Stewart *et*

al. (1985) rapportent que certaines femmes ont été contaminées par le VIH suite à des inséminations artificielles (une technique aucunement traumatisante), avec du liquide séminal d'un donneur infecté. Le liquide séminal est non seulement un réservoir du virus, mais il semble avoir aussi une activité immunosuppressive. Alexander (1988, 1990) rapporte une série d'expériences *in vitro* démontrant que le liquide séminal inhibe la transformation blastique et la synthèse du DNA induite par des mitogènes et des antigènes, supprime la réponse humorale des plasmocytes et inhibe l'activité cytotoxique des cellules NK. De plus, le liquide séminal contient une forte concentration de prostaglandines. L'absorption anale de ces substances est connue pour avoir un effet supprimeur sur la sécrétion de lymphokines et de monokines (Bray *et al.*, 1974; Kurland *et al.*, 1978), sur l'activité cytotoxique médiée par les cellules T et les cellules NK, ainsi que sur la fonction des macrophages (Alexander, 1990). Prises dans leur ensemble ces études indiquent que le liquide séminal diminue ou inhibe l'immunité au niveau des muqueuses génitales augmentant ainsi la probabilité d'infection. De plus, ces résultats peuvent aussi expliquer l'inégalité de la fréquence de transmission virale hétérosexuelle qui existe entre les deux sexes puisque le risque qu'une femme acquiert le VIH d'un individu infecté est de huit à dix fois plus élevé comparé au risque de transmission de femme à homme (Forrest, 1992).

La transmission du VIH par voie sanguine couvre la contamination par les produits sanguins, ou leurs dérivés, et la toxicomanie. La transmission du VIH, par des transfusions sanguines et/ou l'injection de produits sanguins, est devenue aujourd'hui une éventualité exceptionnelle en raison du criblage obligatoire depuis novembre 1985 de tous les échantillons de sang (Hirsch et

Curran, 1990). Toutefois, le risque ne peut être totalement écarté car, le test étant basé sur la présence des anticorps anti-VIH, un donneur récemment infecté peut avoir un résultat négatif.

Le partage d'aiguilles et d'accessoires contaminés par le VIH est responsable de la majorité des transmissions par voie parentérale. De plus, toute substance (drogue ou alcool par exemple) qui peut modifier la capacité d'un individu à prendre des mesures de prévention augmente aussi le risque de transmission du VIH.

La transmission verticale du VIH d'une mère séropositive à son enfant peut avoir lieu *in utero*, pendant la grossesse à travers le placenta, *intra partum* (lors de l'accouchement) ou *post partum* par le lait maternel (Douglas et King, 1992). La forme la plus fréquente d'acquisition du virus est lors du passage de l'enfant dans la filière génitale ou il est exposé au sang de la mère. En tenant compte des facteurs de risques impliqués dans la transmission verticale du VIH tels que l'anomalie du placenta et la virémie maternelle, une mère séropositive a de 15 à 40% de risque de transmettre l'infection à son bébé.

1.7 Mécanismes impliqués dans la transmission sexuelle du VIH

Dans le but de mieux étudier les mécanismes impliqués dans la transmission sexuelle du VIH et de définir si celui-ci est capable de franchir la barrière physique des muqueuses, des modèles animaux ont été établis offrant un système contrôlé dans lequel une gamme de paramètres peuvent être étudiés. En 1986 Fultz *et al.* ont réussi à infecter un chimpanzé femelle suite à une exposition de la muqueuse vaginale à la souche LAV-1 du VIH

extracellulaire; une exposition parallèle des muqueuses orales avec la même souche n'a pas établi une infection.

L'importance de la barrière physique représentée par les muqueuses génitales a été mise en évidence dans les travaux de Miller *et al.* (1989) et Cranage *et al.* (1992c) chez le rhesus macaque: entre 10^3 à 10^4 unités infectieuses supplémentaires sont requises pour causer une infection à travers les muqueuses génitales (Miller *et al.*, 1989) et colorectales (Cranage *et al.*, 1992c); la dose virale requise pour une infection intraveineuse se situe entre une et dix unités infectieuses. Cette barrière physique ralentit la dissémination du virus. Lors d'une exposition génitale, les particules virales sont initialement limitées aux ganglions lymphatiques génitaux, au contraire, quand le virus est administré par voie intraveineuse il a accès à un grand nombre de tissus lymphoïdes. Cependant, dès que l'infection est établie, tous les animaux développent un syndrome d'immunodéficience, qu'ils aient été infectés par voie génitale ou intraveineuse.

Bien que les modes de transmission du VIH soient établis, les mécanismes par lesquels le virus envahit les muqueuses commencent à peine d'être élucidés. Des études immunohistochimiques, pour révéler les caractéristiques morphologiques des parois génitales, ont été effectuées chez le macaque (Amerongen *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1992a,b,c) et la souris (Parr *et al.*, 1991; Parr et Parr, 1991). Les populations cellulaires qui ont été identifiées dans ces régions sont les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules de Langerhans/dendritiques. Des analyses de biopsies de tissus cervicaux obtenus de femmes infectées au VIH (Pomerantz *et al.*, 1988) et de macaques femelles infectées au SIV (Miller *et al.*, 1992c) indiquent que les cellules infectées étaient

les lymphocytes T, les macrophages et les cellules de Langerhans. Etant donné que les macrophages et les cellules de Langerhans/dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène, on a émis l'hypothèse à l'effet que ces cellules seraient les cibles primaires (Miller *et al.*, 1992b) et les véhicules intermédiaires dans l'infection virale. Selon cette hypothèse, les cellules cibles infectées migrent aux ganglions lymphatiques génitaux où elles présentent l'antigène aux lymphocytes CD4⁺ initiant ainsi la réponse immune. Mais, comme ces cellules sont infectées, elles transmettent le virus aux lymphocytes T-CD4⁺. Le virus se réplique alors initialement dans les ganglions lymphatiques génitaux et migre aux ganglions lymphatiques proximaux et éventuellement, passant par le canal thoracique, va dans le courant sanguin. Une fois dans le courant sanguin, les particules virales infectent les tissus lymphoïdes systémiques (rate, thymus, moelle osseuse, ganglions lymphatiques) causant ainsi une infection systémique.

Quant à la transmission du VIH par voie colorectale les expériences d'Amérogen *et al.* (1991) indiquent que la porte d'entrée du VIH, en ces lieux, serait les cellules M (figure 3). Dans cette étude, les chercheurs, utilisant des explants mucosaux de plaques de Peyer de souris et de lapin, démontrent que le VIH adhère à la membrane luminale des cellules M, est internalisé, puis livré aux espaces transépithéliaux qui contiennent des lymphocytes et des macrophages. Ce transport rapide du VIH à travers la mince barrière des cellules M, qui sont nombreuses au niveau des muqueuses rectales humaines, serait particulièrement efficace pour livrer les particules virales aux cellules cibles sous-jacentes.

Les cellules épithéliales colorectales semblent elles aussi jouer un rôle dans la transmission du VIH. Bourinbair et Phillips (1991) ont établi un système *in vitro* constitué d'un épithélium confluent originalement dérivé du petit intestin d'un fœtus humain âgé de deux mois. Ils ont exposé ces entérocytes pendant des périodes variables à des promonocytes (Bourinbair et Phillips, 1991) ou des lymphocytes (Phillips et Bourinbair, 1992) infectés par le VIH ou à du virus extracellulaire. Leurs résultats suggèrent que le contact physique entre l'épithélium et les cellules infectées engendre un relargage directionnel de particules virales dans la zone inter-cellulaire. Les observations morphologiques indiquent que le virus séquestré dans ces lieux est internalisé par les cellules épithéliales (Bourinbair et Phillips, 1991).

Lorsque les infections, de cellules à cellules, sont comparées aux infections par du VIH extracellulaire, ces dernières paraissent moins efficaces. Bien que les sécrétions génitales de patients infectés par le VIH contiennent du virus extracellulaire et intracellulaire, la contribution de chacune de ces formes dans la transmission virale par voie sexuelle reste controversée (Bourinbair et Phillips 1991; Miller *et al.*, 1992_{a,b,c}).

Même si tous les mécanismes par lesquels le VIH peut envahir l'organisme ne sont pas connus, les résultats expérimentaux montrent clairement que le virus peut traverser la barrière physique que constitue les muqueuses génitales et colorectales. Il existe, cependant, un autre type de barrière auquel le virus doit se confronter. Celle-ci est de nature immunologique et joue un rôle important dans les défenses mucosales. La prochaine section sera consacrée à cette barrière immunologique qui est aussi appelée l'immunité mucoale.

2. LES MUQUEUSES ET L'IMMUNITÉ MUCOSALE

Les muqueuses représentent la plus grande surface de contact entre l'environnement naturellement agressif et l'organisme. Chez l'homme cette superficie est au-delà de 400 m²; plus de deux cent fois la surface de la peau (Childers *et al.*, 1989). Étant donné que la majorité des pathogènes rencontrés par l'organisme sont respirés ou ingérés, ces membranes épithéliales, qui recouvrent les différents conduits naturels en contact avec l'extérieur, ont élaboré des mécanismes très efficaces pour se protéger des agents pathogènes.

L'anatomie même des muqueuses fait qu'elles agissent comme barrière physique. Ce rôle passif est complété par un rôle plus dynamique de barrière immunologique. En fait, la plus grande composante du système immunitaire de l'organisme se situe au niveau des muqueuses. Le nombre total de cellules lymphoïdes, incluant les lymphocytes, plasmocytes et cellules accessoires dans la lamina propria et l'épithélium de l'intestin grêle humain est nettement supérieur au nombre de cellules présentes dans tous les autres tissus lymphoïdes pris dans leur ensemble. En effet, il existe environ 10¹⁰ plasmocytes par mètre d'intestin grêle comparativement à 2,5 x 10¹⁰ plasmocytes pour l'ensemble de la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques (Brandtzaeg, 1989; Childers *et al.*, 1989).

L'immunité au niveau des muqueuses se présente sous deux aspects fonctionnels: l'immunité naturelle et l'immunité acquise. L'immunité naturelle est exercée par les cellules phagocytaires, les cellules NK ainsi que des facteurs solubles tels que le complément, l'interféron et les enzymes protéolytiques. Ce type d'immunité est constitutive, non spécifique et

n'augmente pas d'intensité suite à une réinfection. Par contre, l'immunité acquise est spécifique et augmente significativement d'intensité lors d'une réexposition à un microorganisme donné. Les principaux effecteurs et médiateurs de cette immunité sont les lymphocytes T et B ainsi que les immunoglobulines et les lymphokines sécrétées par ces cellules lorsqu'elles sont activées. Ces deux types d'immunité forment ensemble la barrière immunologique au niveau des muqueuses.

L'existence d'une immunité protectrice mucoale (ou locale) a été initialement proposée en 1919 par Besredka qui observa que des lapins étaient protégés contre des dysentéries fatales suite à une immunisation orale avec le bacille shiga tué. De plus, cette immunité ne semblait pas être associée à l'immunité systémique. Depuis ces observations, un grand nombre d'études ont démontré que l'immunité au niveau des muqueuses joue un rôle primordial dans la protection et, est gérée par des mécanismes distincts de ceux impliqués dans l'immunité systémique. Dans le cadre de ce projet, nous avons analysé de plus près les différents modes d'induction d'une immunité spécifique au niveau des muqueuses. Comme l'immunité mucoale est principalement assurée par une classe particulière d'immunoglobulines, les IgA sécrétoires (IgA-S) nous introduirons brièvement le système responsable de leur induction.

2.1 Le système immunitaire mucoal: sites inductifs et sites effecteurs

Le système immunitaire mucoal (MALT: "mucosal-associated lymphoid tissue") regroupe l'ensemble des organes lymphoïdes annexés au tube digestif (GALT: "gut-associated lymphoid tissue"), aux voies respiratoires

(BALT: "bronchial-associated lymphoid tissue"), à la peau (SALT: "skin-associated lymphoid tissue") et aux voies urogénitales. Il existe des relations plus étroites entre les divers systèmes lymphoïdes associés aux muqueuses qu'entre le MALT et l'immunité systémique (Mestecky et McGhee, 1987).

Le MALT peut être divisé en deux sites principaux: les sites inductifs et les sites effecteurs (figure 3). Les sites inductifs sont les endroits où l'antigène est rencontré et où les réponses immunes initiales sont induites. Les sites effecteurs, disséminés dans l'organisme, sont les lieux où les cellules sensibilisées, telles que les lymphocytes T et les plasmocytes producteurs d'anticorps ont migré et protègent les muqueuses contre l'invasion par les microorganismes.

2.1.1. Les sites inductifs

Les sites inductifs, situés dans les divers tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, sont une source de précurseurs lymphocytaires capables de subir une stimulation directe par l'antigène, de proliférer et de migrer vers les sites effecteurs où ils se différencient en cellules immunocompétentes (Mestecky, 1987) (figure 3). La majorité des études de ces régions ont été effectuées au niveau du GALT, qui est collectivement représenté par les plaques de Peyer, l'appendice et les petits nodules lymphoïdes (Mestecky et McGhee, 1987). Les sites majeurs d'induction d'une immunité mucosale sont les plaques de Peyer (PP). Leur morphologie et le cycle de migration des lymphocytes vont être brièvement expliqués en raison de leurs importance et aussi parce que les stratégies d'immunisation évaluées dans ce projet sont basées sur ces principes.

Les plaques de Peyer sont des amas de tissus lymphoïdes situés tout le long de l'intestin dans le tissu conjonctif sous-épithélial au niveau de zones dépourvues de villosité (Mestecky et McGhee, 1987). La structure des PP inclut une région en forme de dôme constituée de lymphocytes et de macrophages ainsi que des régions sous-jacentes riches en lymphocytes B et T (Mestecky et McGhee, 1987). L'épithélium recouvrant le dôme des PP est unique; il contient des cellules M ("Microfold" (M) ou "follicle associated epithelial (FAE) cells") qui sont capables de capter les antigènes de la lumière intestinale et de les livrer sans les dégrader aux tissus lymphoïdes sous-jacents (Kiyono *et al.*, 1992; McGhee et Mestecky, 1990), où a lieu l'induction de la réponse immune. Ces tissus lymphoïdes contiennent des zones folliculaires ayant des centres germinatifs enrichis de lymphocytes B et des zones interfolliculaires T-dépendantes contenant toutes les sous-populations principales de lymphocytes T (MacDonald et Spencer, 1990; McGhee et Mestecky, 1990). Les centres germinatifs des PP contiennent un très grand nombre de cellules B porteuses d'IgA-membranaire, ce qui démontre leur importance dans la réponse mucosale.

La relation entre les PP et la réponse immunitaire assurée par les IgA-S a été démontrée pour la première fois par les études de Craig et Cebra (1971) qui rapportèrent que les PP étaient des sources enrichies en cellules qui pouvaient transférer adoptivement une réponse en IgA quand elles étaient injectées à des récipiendaires irradiés.

2.1.2 Les sites effecteurs

La présence d'immunoglobulines (des IgA-S en majorité) spécifiques d'un antigène donné, dans les sécrétions comme la salive, les larmes, le lait maternel et les sécrétions vaginales, en l'absence de stimulation locale appuie l'hypothèse selon laquelle ces anticorps seraient produits localement par des plasmocytes descendants de précurseurs qui ont été sensibilisés dans un site inductif (PP) et qui ont migré par la suite dans des tissus mucosaux éloignés (Childers *et al.*, 1989) (figure 3). Ces observations ainsi que des études chez le lapin (Craig et Cebra, 1971) et plus récemment chez la souris (Bienenstock et Befus, 1980; Mestecky et McGhee, 1987) mettent en évidence un système mucosal commun lié par un cycle de migration des lymphocytes T et B indispensable au peuplement des sites effecteurs en cellules lymphoïdes matures. Ces sites, incluant la lamina propria des tractus gastro-intestinal, respiratoire et urogénital, ainsi que les glandes mammaires, salivaires et lacrymales, ont deux caractéristiques: a) ils contiennent des lymphocytes T et B et un grand nombre de plasmocytes sécréteurs d'IgA, et, b) ils sont recouverts de cellules épithéliales qui produisent la pièce sécrétoire, requise pour le transport des IgA-polymériques dans les sécrétions externes.

Il faut bien préciser que, contrairement aux ganglions lymphatiques et à la rate, la différenciation terminale des précurseurs de plasmocytes sécréteurs d'anticorps n'a pas lieu au niveau des sites inductifs mais bien après la migration dans les sites effecteurs lointains (Mestecky et McGhee, 1987). A cet égard, Robertson et Cebra (1976) ont démontré l'importance des lymphocytes des PP dans la dissémination en utilisant des boucles iléales ligaturées chez le lapin. Ces chercheurs ont établi deux boucles iléales isolées dont une contenant

une PP, sans interrompre la circulation sanguine ou lymphatique. Après l'introduction de l'antigène dans la boucle porteuse de PP, une réponse en IgA était observée dans les deux boucles, tandis qu'aucune réponse immune n'était observée lorsque l'antigène était introduit dans la boucle exempte de PP.

Il apparaît donc que, toutes les cellules immunocompétentes incluant les lymphocytes auxiliaires (CD4⁺CD8⁻), les cellules T-cytotoxiques (CD4⁻CD8⁺), les cellules B-IgA⁺ et les cellules présentatrices d'antigène (macrophages, cellules dendritiques, cellules B MHC-II⁺) sont présentes au niveau des sites inductifs et sont commises dans l'induction et la régulation de cellules effectrices, responsables des réponses humorales et cellulaires, qui assurent la protection au niveau des différents sites effecteurs (Kiyono *et al.*, 1992; McGhee et Mestecky, 1990). Plus précisément, la réponse des lymphocytes B depuis la sensibilisation initiale, l'expansion clonale et la différenciation terminale en plasmocytes sécréteurs d'IgA est gouvernée par les lymphocytes T qui agissent soit directement sur les cellules B ou par l'intermédiaire de cytokines (IL-2, IL-4, IL-5 et IL-6) (McGhee et Mestecky, 1990), de modulateurs endocriniens (cholecystokinine, estrogènes et corticostéroïdes) et de certains neurotransmetteurs (substance P et VIP) (Kiyono *et al.*, 1992).

Pour atteindre et coloniser les sites effecteurs, les cellules T et B, une fois sensibilisées par l'antigène, quittent les sites inductifs par les vaisseaux lymphatiques afférents et gagnent les ganglions lymphatiques mésentériques. Là, il y a maturation des cellules. Pour les lymphocytes B ceci se traduit par une transformation en proplasmocytes renfermant des Ig-intracytoplasmiques (Mestecky et McGhee, 1987). Ces derniers gagnent par la suite la circulation systémique en empruntant les vaisseaux lymphatiques afférents drainés par le

canal thoracique. Enfin, les lymphocytes vont coloniser les sites effecteurs. Sous l'influence antigénique, il y a expansion clonale des cellules B puis production et sécrétion d'immunoglobulines.

2.2 Les immunoglobulines dans les sécrétions mucoales: Structure et fonctions

Des immunoglobulines de tous les isotypes ont été identifiées dans les sécrétions qui baignent les muqueuses. Leur formation et leur distribution relative, cependant, sont remarquablement différentes de celles mesurées dans le sérum. Les immunoglobulines de type IgA sont les anticorps les plus abondants dans les sécrétions externes. Un grand nombre d'études immunohistochimiques (Brandtzaeg, 1989; McGhee et Mestecky, 1990; Mestecky et McGhee, 1987) ont montré qu'environ 80% des plasmocytes présents dans les sites effecteurs des muqueuses secrètent des IgA. Ces anticorps sont localement produits et sécrétés par transport sélectif. Au contraire, la transsudation passive à partir du sérum plutôt que le transport actif des immunoglobulines dérivées du plasma est principalement responsable de la présence d'IgA monomériques, IgG, IgD et IgE dans les sécrétions (McGhee et Mestecky, 1990).

2.2.1 Structure des IgA-S

Les immunoglobulines d'isotype IgA sont divisées en deux sous-classes: les IgA₁ et IgA₂, qui ont une distribution caractéristique dans l'organisme. Les IgA sériques sont pour l'essentiel des IgA₁, monomériques, tandis que les IgA₂, pour la plupart dimériques, sont prédominants au niveau des muqueuses

respiratoires, gastro-intestinales, urogénitales ainsi que dans le lait maternel (le colostrum notamment), la salive et les larmes (Childers *et al.*, 1989).

A l'instar des autres immunoglobulines les IgA-S sont constitués de deux chaînes lourdes α et deux chaînes légères (κ ou λ) liées entre elles par des ponts disulfures. Une caractéristique des IgA est leur habilité de former des polymères en vertu d'une extension c-terminale de la chaîne α contenant un groupement cystéine qui participe à la formation de ponts disulfures entre deux monomères (Mestecky et McGhee, 1987). Les IgA polymériques (pIgA) sont souvent sous forme de dimères, quoique, des trimères, tétramères et pentamères sont aussi produits mais en plus faibles quantités. Dans leur forme sécrétée les IgA-S sont associés avec deux polypeptides: la chaîne J et la pièce sécrétoire (SC). Ces molécules sont synthétisées dans des cellules différentes. La chaîne J, élaborée dans les plasmocytes, s'attache d'une façon covalente à la portion Fc de l'IgA formant ainsi un pont disulfure. La pièce sécrétoire, une glycoprotéine dont la synthèse a lieu dans les cellules épithéliales, est enroulée en écharpe autour des fragments Fc des immunoglobulines (Mestecky et McGhee, 1987). Des études immunochimiques chez l'homme et le lapin (Mestecky, 1987) suggèrent que les pIgA sont assemblés à partir des sous-unités monomériques à l'intérieur des plasmocytes sous-épithéliaux sécréteurs d'IgA, avant l'acquisition de la pièce sécrétoire et le transport dans les sécrétions externes. Le modèle de transport des anticorps dans les sécrétions externes est un processus actif. Brièvement, la pièce sécrétoire, exprimée à la surface basolatérale des cellules épithéliales, fonctionne comme récepteur pour les pIgA qui s'unit par son fragment extra-cellulaire au complexe IgA-chaîne J, élaboré par les plasmocytes de la sous-muqueuse. L'ensemble SC-IgA-chaîne J

est internalisé par la cellule épithéliale et migre vers le pôle apical de celle-ci pour être finalement excrété dans la lumière mucosale. L'ensemble des étapes impliquées dans ce transport actif se produit en 30 à 60 minutes environ (Mestecky et McGhee, 1987). Des études sur la cinétique de l'acheminement des anticorps monoclonaux depuis le sérum jusqu'aux sécrétions mucosales (Mazanec *et al.*, 1987, 1989) montrent que les pIgA sont véhiculés par un transport actif. Notamment, Renegar et Small (1991b) rapportent que les pIgA sont transportés de 10 à 100 fois plus efficacement comparé aux anticorps monomériques (mIgA et IgG₁) ayant la même spécificité antigénique.

2.2.2 Fonctions des IgA-S.

Les IgA sécrétoires jouent un rôle important dans l'immunité mucosale parce qu'ils sont présents au site de contact initial de l'agent pathogène et, par conséquent, représentent la première ligne de défense contre les infections.

Le caractère multimérique des IgA leur permet d'avoir une plus grande affinité et avidité pour l'antigène ainsi qu'un pouvoir neutralisant plus élevé que les monomères correspondants. L'importance de la structure moléculaire des IgA-S dans la neutralisation virale a été montrée dans les études avec le virus influenza A (Taylor *et al.*, 1987). Taylor *et al.* (1987) ont comparé le pouvoir neutralisant d'IgA-S inactes, avec les mêmes IgA-S après leur dissociation en monomères. Les IgA-S anti-HA intactes empêchèrent l'attachement viral tandis que les IgA monomériques permirent l'attachement, la pénétration et l'accumulation du génome viral dans les cellules.

De plus, la résistance de ces molécules à la dégradation protéolytique, conférée par la pièce sécrétoire, préserve leurs fonctions biologiques et ainsi leur donne des avantages fonctionnels.

Par ailleurs, les IgA-S jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité des surfaces mucosales. Les complexes immuns formés par l'association des IgA-S aux antigènes sont incapables d'activer le complément (ni par voie classique, ni par voie alterne) (McGhee et Mestecky, 1990) et ainsi préviennent les réactions inflammatoires locales.

La première démonstration que les immunoglobulines de type IgA exercent une action protectrice contre les infections microbiennes a été établie par les travaux de Mazanec *et al.* (1987). Ces chercheurs rapportèrent qu'une instillation nasale d'IgA monoclonaux, spécifiques du virus de Sendai, protégea les souris contre une épreuve virale intra-nasale. Renegar *et al.* (1991a; 1991b) ont également fait, chez la souris, un transfert passif d'IgA polymériques spécifiques pour l'hémagglutinine H1 du virus influenza et ils ont obtenu une protection contre une épreuve intra-nasale avec le virus homologue. Cette protection était abolie en administrant par voie intra-nasale un antisérum dirigé contre la chaîne α des IgA.

Le rôle protecteur des IgA-S a été appuyé par les études de Winner *et al.* (1991), qui développèrent une stratégie d'immunisation passive au niveau des surfaces mucosales qui mime de près la production et la sécrétion normale des IgA-S dans les muqueuses. Ces chercheurs ont produit des hybridomes sécréteurs d'IgA polymériques à partir de la fusion de cellules sécrétrices d'IgA, provenant des PP, avec une lignée myélomateuse. Lorsque l'hybridome sous-

cutané ("back pack tumors") est introduit dans des souris syngéniques, il induit un transport continu d'IgA polymériques monoclonaux dans les sécrétions mucosales. Par ce modèle d'immunisation, le rôle protecteur des IgA-S contre des infections mucosales virales (Weltzin *et al.*, 1989) et bactériennes (Michetti *et al.*, 1992; Steffen et Ebersole, 1992), a été démontré.

Récemment, l'efficacité protectrice des IgA anti-virus de Sendai a été comparée à celle des IgG suite à une application topique d'anticorps monoclonaux dans le tractus respiratoire de souris (Mazanec *et al.*, 1992b). Les résultats expérimentaux indiquent que les IgA et IgG avaient une efficacité équivalente quant à la protection lors d'une épreuve virale intra-nasale. Ainsi, le rôle protecteur des IgA-S n'est pas seulement relié aux fonctions inhérentes de ces immunoglobulines, puisque les anticorps monoclonaux de type IgA et IgG sont également efficaces pour protéger contre une infection virale intra-nasale (Mazanec *et al.*, 1992b), mais, repose également sur l'existence d'un transport transépithélial des IgA polymériques, qui n'est pas disponible aux autres immunoglobulines monomériques (Mazanac *et al.*, 1992a).

Même si le rôle protecteur des IgA-S est bien établi, les mécanismes par lesquels ces molécules parviennent à prévenir l'infection commencent à peine à être élucidés. Le mécanisme classique de neutralisation pour les IgA-S ainsi que pour les autres immunoglobulines est l'attachement des anticorps à la surface du pathogène prévenant ainsi son attachement et son internalisation dans les cellules de l'épithélium mucosal. Récemment, Kaetzel *et al.* (1991) ont proposé un autre mécanisme par lequel les IgA peuvent protéger les muqueuses. Ils ont démontré *in vitro* que des complexes antigène-IgA pouvaient être transportés à travers des cellules épithéliales depuis la surface

basolatérale jusqu'à la surface apicale. Mazanec *et al.* (1992a) ont proposé un troisième mécanisme: la neutralisation intracellulaire. Il est connu que les muqueuses épithéliales sont la porte d'entrée d'un grand nombre de microorganismes, notamment les virus. Sachant que les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires et étant donné que les pIgA sont transportés à travers les cellules épithéliales, il est possible que les pIgA puissent se complexer avec les protéines virales nouvellement synthétisées à l'intérieur des cellules épithéliales infectées prévenant ainsi l'assemblage et le relargage des virions. En effet, quand des feuillettes de cellules polarisées (exprimant le récepteur pour les immunoglobulines polymériques) sont infectées sur la surface apicale avec le virus de Sendai et que des IgA monoclonaux anti-virus Sendai sont ajoutés à la surface basolatérale, des complexes intracellulaires IgA-protéines virales peuvent être localisés après un certain temps (Mazanec *et al.*, 1992a).

Un grand nombre d'études soulignent le rôle primordial du MALT dans la protection contre des infections mucoales. Une meilleure compréhension de son fonctionnement nous permettra de tirer avantage de ce système dans le but ultime de protéger l'organisme contre les infections transmises par voie mucoale. Etant donné que la voie sexuelle représente le mode principal de transmission du VIH, une immunité mucoale pourrait s'avérer essentielle à la protection contre l'infection.

3. PROPHYLAXIE

Face à la propagation mondiale du VIH et à l'issue fatale de la maladie qu'il induit, une des priorités internationales est de définir et mettre au point des interventions et des approches efficaces destinées à combattre et à prévenir l'infection virale. Les médicaments pour traiter les infections opportunistes, qui sont la conséquence de la défaillance progressive du système immunitaire, réussissent à prolonger la vie des personnes infectées, mais, malheureusement, il n'existe jusqu'à présent aucun traitement permettant la guérison de la maladie et l'infection. Seule la prévention de l'infection virale initiale peut arrêter la progression de cette pandémie. Les deux façons d'atteindre cet objectif sont l'éducation et la vaccination.

Le défi auquel fait face les programmes d'éducation et de renseignements est de modifier, à l'échelle mondiale, le comportement des individus. Ce défi est encore plus grand lorsque l'on considère les complexités sociales, économiques, religieuses, culturelles et politiques qui existent dans les différents pays. Malgré les efforts nationaux et internationaux de prévention et de contrôle du SIDA, cette maladie reste encore un problème mondial. Bien que la diffusion des renseignements soit indispensable, un vaccin efficace représente certainement l'arme la plus importante pour freiner cette pandémie.

3.1 Défis dans le développement d'un vaccin anti-VIH

Dans toutes les approches thérapeutiques ou de prophylaxie, les caractéristiques biologiques et moléculaire de l'agent pathogène doivent être

prises en considération. Il existe plusieurs défis dans le développement d'un vaccin anti-VIH. Entre les différents isolats viraux il existe un haut degré de polymorphisme génétique surtout à l'intérieur du gène codant pour les protéines virales de l'enveloppe. Des rapports récents indiquent que la variation *in vivo* du VIH-1 est très rapide. Le taux de mutation du virus est estimé être entre 0,1 à 1% par année (Nowak *et al.*, 1991). C'est ainsi qu'un nombre relativement grand de variants génétiques évoluent en parallèle et coexistent pendant l'infection chronique (Fisher *et al.*, 1988; Saag *et al.*, 1988). Bien que la variabilité du VIH ne peut être négligée, elle ne représente pas un défi insurmontable dans le développement d'un vaccin anti-VIH. Notamment, le poliovirus et tous les autres virus à RNA subissent des variations antigéniques aussi fréquentes que le VIH et pourtant il existe d'excellents vaccins protecteurs.

Par ailleurs, un vaccin contre le VIH doit induire une réponse immunitaire, non seulement contre le virus mais également contre les cellules infectées. A cet égard, le transfert du VIH de macrophages à des lymphocytes a été démontré par Gupta *et al.* (1989). De plus, le VIH est transmis de monocytes ou de lymphocytes à des cellules épithéliales pendant un contact entre les cellules (Phillips et Bourinbaiar, 1992). Dans ces deux études, la présence d'anticorps neutralisants ne bloquent pas le transfert du virus. Les résultats morphologiques (Bourinbaiar et Phillips, 1991; Phillips et Bourinbaiar, 1992) suggèrent que le contact physique entre les cellules infectées et l'épithélium engendre un relargage directionnel de particules virales. Celles-ci sont alors internalisées par les cellules épithéliales.

Une autre caractéristique du VIH qui rend difficile la production d'un vaccin est qu'une fois le génome proviral intégré dans le chromosome hôte, il échappe au système immunitaire puisqu'il demeure sous forme de DNA-proviral.

Parmi d'autres défis dans le développement d'un vaccin contre le VIH est l'absence d'un modèle animal qui nous permettrait d'évaluer le pouvoir protecteur des préparations vaccinales. Le chimpanzé est l'espèce animale la plus proche de l'homme qui peut être infecté par le VIH. Toutefois, bien que des anomalies immunologiques soient observées, les animaux ne développent pas la maladie. A ce jour, le macaque représente le modèle animal le mieux connu. En effet, on peut observer l'apparition d'une pathologie similaire au SIDA après infection par le SIV. L'avantage de ce modèle est que l'on peut, non seulement vérifier la prévention de l'infection suite à une vaccination et à une épreuve virale, mais aussi d'étudier la prévention ou le délai dans le développement de la maladie.

Malgré ces défis, un grand nombre de modèles expérimentaux de vaccins, contre le VIH, le SIV et le FIV, sont évalués présentement: 1) les particules virales atténuées, ou 2) inactivées, 3) les virus recombinants exprimant certains gènes du VIH, 4) les peptides synthétiques dans des épitopes choisis, 5) les anticorps anti-idiotypiques, 6) les sous-unités virales naturelles et recombinantes et les immunosomes-VIH et -SIV.

3.2 Épitopes antigéniques du VIH

De nombreux épitopes antigéniques ont été identifiés au niveau des protéines structurales et de régulation du VIH. Parmi ceux-ci, un grand nombre se sont montrés capables de stimuler le système immunitaire par l'induction d'anticorps neutralisants, l'activation de lymphocytes T-cytotoxiques ainsi que par la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC: "antibody dependant cell cytotoxicity"). D'autres épitopes, cependant, sont impliqués dans l'induction de phénomènes immunopathologiques néfastes à l'organisme tels que la synthèse d'anticorps facilitants (Robinson *et al.*, 1988) qui potentialisent l'infection virale à faibles dilutions, la production d'anticorps impliqués dans les réponses autoimmunes (Golding *et al.*, 1989) et l'anergie des lymphocytes T (Fauci, 1988). A la lumière de ces observations, il faut s'assurer, dans la conception de vaccins sous-unitaires, que les domaines du VIH qui donnent lieu à des réponses protectrices soient présents, tandis que ceux qui induisent des effets non désirables soient exclus. Si l'on pouvait déterminer pour chaque protéine du VIH les épitopes indispensables à son activité vaccinale, on pourrait théoriquement envisager de fabriquer un vaccin réduit à ses unités minimales.

Les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH, la gp120 et la gp41, sont des cibles majeures dans la stimulation du système immunitaire. La gp120, qui est responsable de la reconnaissance du récepteur cellulaire et de l'induction d'anticorps neutralisants, est particulièrement intéressante. Un épitope très important dans la gp120 est le déterminant principal de neutralisation (PND: "principal neutralizing determinant"), situé au niveau de la troisième boucle hypervariable du VIH (V3) (aa: 308 à 338). Bien que cette boucle soit variable,

un tétrapeptide, Gly-Pro-Gly-Arg, à la région centrale ainsi que deux résidus de cystéine à la base de la boucle sont hautement conservés d'une souche du VIH à l'autre. La boucle V3 est une région fonctionnelle importante du VIH; sa délétion conduit à la génération d'un virus qui a perdu son infectivité. De plus, des mutations à l'intérieur de cette région produisent un virus dont l'infectivité est considérablement réduite (Bolognesi, 1990). Il a été rapporté que des anticorps monoclonaux spécifiques de la boucles V3 avaient une activité neutralisante (Broliden *et al.*, 1990; Durda *et al.*, 1990; Gorny *et al.*, 1991; Linsley *et al.*, 1988; Matsushita *et al.*, 1988; Ohno *et al.*, 1991; Skinner *et al.*, 1988). Des immunisations de lapins, avec un peptide de 13 acides aminés ou avec l'hexapeptide Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe de la boucle V3, ont induits la production d'anticorps capables de neutraliser des isolats divergeants du VIH (Javaherian *et al.*, 1992a). De plus, des anticorps anti-idiotypiques monoclonaux, image interne du PND, ont induit la production d'anticorps neutralisants chez le lapin (Fung *et al.*, 1990). Récemment, l'étude de Callebaut *et al.* (1993) suggère que la boucle V3 interagissait avec la molécule CD26, un co-récepteur pour l'entrée du VIH dans la cellule hôte. En effet, des peptides dont la séquence en acides aminés était identique à des régions conservées de la boucle V3 du VIH-1 et VIH-2, bloquent l'activité enzymatique du CD26 et empêchent la pénétration du virus dans la cellule hôte.

L'activité neutralisante observée dans les sérums de patients infectés par le VIH-1 est principalement dirigée contre la boucle V3 (Böttiger *et al.*, 1990; Kenealy *et al.*, 1989). Cette région ainsi que le segment c-terminal de la gp120 sont les sites les plus immunogéniques de la glycoprotéine chez les patients infectés (Mathiesen *et al.*, 1989; Wahren *et al.*, 1989). La glycosylation des

protéines virales semblerait aussi définir des régions de neutralisation étant donné que des anticorps monoclonaux dirigés contre la chaîne oligosaccharidique peuvent inhiber l'infection au VIH *in vitro* (Hansen *et al.*, 1990, 1991). Kang *et al.* (1991) ont rapportés que, dans des pools de sérums de patients infectés par VIH-1, les anticorps dirigés contre la région V3 sont plus efficaces dans la neutralisation comparativement à des anticorps neutralisants dirigés contre d'autres épitopes de la gp120. La délétion de un ou plusieurs domaines variables de la gp120, incluant de la région V3, montrent qu'au moins deux autres de ces domaines sont capables d'induire des anticorps neutralisants *in vivo* (Haigwood *et al.*, 1990). Lorsque toutes les régions hypervariables sont délétées, l'antigène qui résulte est incapable de stimuler la synthèse d'anticorps neutralisants. Jusqu'à présent, la p17 est la seule protéine, autre que la gp160/120, qui a montré un potentiel d'induire des anticorps neutralisants (Papsidero *et al.*, 1989; Sarin *et al.*, 1986).

La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps spécifiques au VIH a été observée dans la majorité des sérums d'individus infectés par le VIH-1. Les cellules activées, qui expriment les antigènes du VIH à leur surface, sont des cibles possibles pour l'ADCC. Ainsi les produits des gènes *gag* et *pol*, qui ne sont généralement pas exprimés à la surface des cellules cibles, sont vraisemblablement peu impliqués dans l'ADCC. Au contraire, plusieurs épitopes linéaires inducteurs de l'ADCC ont été identifiés dans la gp41 (Evans *et al.*, 1989; Gorny *et al.*, 1989; Tyler *et al.*, 1989) et dans la gp120 (Lyerly *et al.*, 1987) particulièrement au niveau de la boucle V3 (Broliden *et al.*, 1990; Liou *et al.*, 1989).

Enfin, plusieurs épitopes viraux, capables de stimuler les cellules T-cytotoxiques, ont été identifiés au niveau des produits des gènes *env* (Clerici *et al.*, 1991; Dadaglio *et al.*, 1991; Hammond *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1992c; Plata *et al.*, 1989; Siliciano *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1991), *gag* (Claverie *et al.*, 1988; Gotch *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1991; Koenig *et al.*, 1990; Littaua *et al.*, 1991; Nixon *et al.*, 1988, 1991), *pol* (Hosmalin *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1989) et *nef* (Culmann *et al.*, 1989, 1991; Hadida *et al.*, 1992; Koenig *et al.*, 1990).

L'identification des épitopes antigéniques du VIH-1 ainsi que leurs fonctions immunologiques ont permis, non seulement de mieux comprendre la relation VIH/système immunitaire, mais aussi de concevoir des candidats vaccinaux anti-VIH et de développer des meilleures stratégies de vaccination.

3.3 Stratégies de vaccination

3.3.1 Particules virales atténuées

Les vaccins atténués, pour usage humain, sont des souches virales ayant perdu toute leur pathogénicité. L'atténuation est le résultat d'une accumulation de mutations dans les gènes responsables de la virulence. Etant donné que ces mutants peuvent se répliquer dans l'organisme sans pour autant causer la maladie, la réponse immunitaire qu'ils induisent est de longue durée.

Présentement R.D. Desrosiers (1992) et son équipe développent des souches virales VIH et SIV qui possèdent des délétions génomiques multiples dans le but d'étudier, chez des primates non-humains, l'efficacité d'un vaccin atténué. Ces mutants possèdent des délétions au niveau des gènes auxiliaires (*nef*, *vpr*, *vif*, *vpx*, *vpu*) et de certains éléments de contrôle dans la région des

LTR. Cette approche est fondamentalement différente de l'approche d'atténuation classique, où les mutants sont sélectionnés suite à des passages en séries en cultures de cellules ou chez un nouvel hôte (Girard *et al.*, 1989). Dans l'approche classique, la perte de la virulence est le résultat d'accumulations de mutations. En général, les déterminants moléculaires précis, responsables de cette perte ne sont pas ou que partiellement connus. Au contraire, la méthode que proposent Desrosiers et ses collaborateurs repose sur des délétions de séquences précises. Notamment, une délétion dans le gène *nef* du SIVmac 239 se traduit par la production d'un virus qui persiste dans l'organisme au delà d'un an et induit des titres très élevés d'anticorps spécifiques au SIV (Kestler *et al.*, 1991). De plus, Daniel *et al.* (1992), utilisant cette approche, ont récemment montré que des macaques vaccinés avec un mutant SIV ayant une délétion au niveau du gène *nef*, sont protégés contre une épreuve virale homologue.

Cependant un vaccin atténué ne peut être considéré comme sécuritaire. Même si un virus non pathogène est créé, personne ne connaît les effets à long termes de la présence de rétrovirus dans l'organisme. Le génome des virus atténués peut s'intégrer dans le génome de l'hôte et ainsi établir une persistance. Une réversion à la virulence ou l'insertion possible de gènes promoteurs avec une activation subséquente de proto-oncogènes cellulaires ainsi qu'une recombinaison génétique suite à une infection avec un virus sauvage font que ce type de vaccin ne peut être considéré comme un candidat pour des essais cliniques.

3.3.2. Particules virales inactivées

Les vaccins inactivés sont constitués de particules virales dont la virulence a été supprimée par inactivation chimique (formol, β -propiolactone) ou physique (rayonnements ou chaleur) (Girard *et al.*, 1989). Une fois inactivés, les virions sont incapables de se multiplier mais leur protéines constitutives conservent, en partie, leur pouvoir immunogénique. Les résultats d'essais de vaccination dans plusieurs modèles animaux, utilisant un vaccin inactivé se sont avérés très prometteurs. Chez le macaque, des immunisations intramusculaires avec du SIV inactivé ont protégé les animaux contre une épreuve virale avec 0,1 à 10 DICT₅₀ de la souche virale sauvage homologue administrée par voie intramusculaire ou intraveineuse (Carlson *et al.*, 1990; Cranage *et al.*, 1992b; Desrosiers *et al.*, 1989; Murphey-Corb *et al.*, 1989; Putkonen *et al.*, 1991; Stott *et al.*, 1991b;). Une protection contre une épreuve virale avec un virus hétérologue a aussi été rapportée (Cranage *et al.*, 1992a,1992b; Murphey-Corb *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1992a; Putkonen *et al.*, 1992). Desrosiers *et al.* (1989) rapportent que, 10 à 18 mois post-infection, les macaques vaccinés qui avaient été infectés étaient vivants et n'avaient aucun signe clinique du SIDA simien. Au contraire, dans cette même période, neuf des dix macaques témoins étaient morts de la maladie. Des résultats rapportés par d'autres groupes de chercheurs (Marthas *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989; Murphey-corb *et al.*, 1992; Sutjipto *et al.*, 1990) semblent indiquer que la vaccination, même si elle n'est pas protectrice, réduit la charge virale et ainsi prolonge la survie des macaques.

Malgré les résultats très positifs obtenus lorsque le SIV inactivé a été utilisé à titre de vaccin, certaines observations ont mis en doute son efficacité.

En effet, dans la plupart des études (Carlson *et al.*, 1990; Cranage *et al.*, 1992a,b; Desrosiers *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1992a; Murphey-Corb *et al.*, 1989, 1992) les épreuves virales ont été effectuées dans des conditions optimales c'est à dire quelques semaines après la dernière immunisation, au sommet de leur réponse immunitaire. D'autre part, les épreuves virales ont été effectuées avec une faible dose de virus homologue infectieux (jusqu'à 10 DICT₅₀). Ces conditions ne reflètent pas nécessairement ce qui a lieu lors d'une infection naturelle: la protection établie a été contre une épreuve IV mais pas contre une épreuve intravaginale qui est la voie principale de transmission du VIH. Par ailleurs, l'interprétation des résultats de protection conférée par les immunisations avec du SIV inactivé a été mise en doute par l'étude de Stott *et al.*, (1991) qui indique qu'il existe une forte corrélation entre la protection *in vivo* et les niveaux d'anticorps dirigés contre les cellules C8166 sur lesquelles le virus a été produit. En effet, dans leur étude, deux des quatre macaques cynomolgus immunisés avec ces cellules, à titre de témoin, ont été protégés contre une épreuve virale par voie IV avec du virus extracellulaire. Quoique le titre des anticorps spécifiques aux protéines virales soit plus élevé que celui des anticorps spécifiques aux contaminants cellulaires, Murphey-Corb *et al.*(1992) n'ont pas pu établir une corrélation entre la protection et les titres d'anticorps spécifiques aux composantes virales ou cellulaires. A la lumière de ces données, certaines études de vaccination doivent être interprétées avec précaution.

Des études de protections ont aussi été rapportées dans le modèle chimpanzé/ VIH (Fultz *et al.*, 1992; Girard *et al.*, 1991, 1992). Cependant, étant donné la complexité des protocoles d'immunisation et l'utilisation de

plusieurs types de vaccins (virus inactivé, protéines recombinantes et peptides synthétiques), il a été difficile de déterminer lequel des antigènes a principalement contribué à la protection. Soulignons aussi que l'épreuve a été par voie IV. Chez le chat également, des immunisations avec du FIV inactivé ou des cellules infectées et fixées à la paraformaldéhyde ont protégé les animaux contre l'infection virale (Yamamoto *et al.*, 1991, 1993). Yamamoto *et al.*, (1993) ont rapporté une protection de 90% contre une épreuve virale par voie intrapéritonéale chez des chats immunisés avec des cellules infectées inactivées ou du virus FIV extracellulaire homologue ou hétérologue. Les chercheurs remarquèrent que la protection semblait être reliée au taux d'anticorps dirigés contre les glycoprotéines de l'enveloppe.

Un inconvénient majeur qui fait que la vaccination avec du VIH inactivé n'est pas présentement considérée pour usage humain est la possibilité d'une infectivité résiduelle due à l'inactivation incomplète de la préparation vaccinale.

3.3.3 Virus recombinants

Les techniques du génie génétique ont permis la création de particules virales chimères ayant des propriétés intéressantes pour la vaccination. La méthode consiste à insérer dans le génome d'un virus "vecteur" un ou plusieurs gènes provenant d'un autre virus ou d'une autre cellule. Le virus recombinant ainsi créé exprime l'antigène codé par le gène étranger dont il est porteur (Girard *et al.*, 1989). L'avantage d'un virus recombinant est sa grande immunogénicité par rapport aux vaccins inactivés puisque la réplication du virus entraîne une synthèse des antigènes viraux qui stimulent

continuellement le système immunitaire. Cette approche est utilisée pour le développement de vaccins recombinants du VIH. Différents vecteurs d'expressions sont présentement évalués incluant: le virus de la vaccine (Hu *et al.*, 1987), le poliovirus (Evans *et al.*, 1989), l'adenovirus (Natuk *et al.*, 1992; Nowak *et al.*, 1991), le virus de l'hépatite B (Michel *et al.*, 1990; Schlienger *et al.*, 1992), le rétrotransposon Ty de la levure (Griffiths *et al.*, 1991) et le BCG (*Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin) (Aldovini *et al.*, 1991; Fuerst *et al.*, 1992).

Les immunisations initiales de chimpanzés utilisant le virus de la vaccine contenant le gène de la gp160 ont stimulé une réponse humorale et cellulaire très prononcée contre la gp160 (Mattews et Bolognesi 1988) mais n'ont pas protégé les animaux suite à une épreuve expérimentale intraveineuse avec le VIH (Hu *et al.*, 1987). L'immunité protectrice induite par cette approche de vaccination a été démontrée, quelques années plus tard, par Hu *et al.* (1992). Dans cette étude, des macaques ont été immunisés par scarification de la peau avec le virus recombinant de la vaccine exprimant le gène de la gp160 puis ont reçu deux rappels, par voie intramusculaire, de gp160 partiellement purifiée, produite dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant. Deux semaines après le dernier rappel, le titre d'anticorps neutralisants avait augmenté par un facteur de 20. Quatre semaines après la dernière immunisation, les macaques, éprouvés par voie IV avec une faible dose de virus infectieux homologue, ont été protégés contre l'infection. Dans une étude analogue (Ahmad *et al.*, 1993), les immunisations n'ont pas protégé les macaques de l'infection mais la virémie observée chez ces animaux a été quatre à cinq fois inférieure à celle des macaques témoins non-

vaccinés. Girard *et al.* (1991) ont aussi rapporté un délai dans le développement de l'infection au VIH chez un chimpanzé vacciné avec le virus recombinant de la vaccine, exprimant le gène de la gp160, qui avait été ultérieurement immunisé avec des antigènes recombinants purifiés (gp160, Gag, Nef et Vif) et du peptide V3 couplé au KLH. Par ailleurs, Cranage *et al.* (1992b) ont récemment rapporté une protection de macaques immunisés avec des cellules infectées par le virus recombinant de la vaccine exprimant le gène *gag* puis éprouvés avec du virus extracellulaire.

Cependant, il ne faut pas perdre de vue les inconvénients qui existent dans ce type de vaccination. Les vecteurs d'expression ne sont pas complètement avirulents. Ceci pourrait causer des complications sérieuses quand ils sont administrés à des personnes immuno-compromises. De plus, l'efficacité des vecteurs lors des immunisations ultérieures peut être compromise par des réponses immunes dirigées contre les vecteurs même.

3.3.4 Peptides synthétiques

Les peptides synthétiques se sont avérés un outil indispensable dans le développement de vaccins sous-unitaires. D'une part, ils ont été utilisés pour identifier les épitopes linéaires antigéniques de plusieurs agents pathogènes et d'autre part, ils ont été évalués à titre de vaccin. Au cours des dernières années, il y a eu de grands progrès dans le développement de peptides synthétiques capables de conférer une réponse immune protectrice *in vivo* (Kast *et al.*, 1991; Snijder *et al.*, 1991). Un grand nombre de peptides synthétiques correspondant à différentes régions des protéines du VIH-1 ont été synthétisés et évalués quant à leur pouvoir d'induire une immunité protectrice *in vivo*. La plupart

des études rapportées (se référer à la section 3.2) se sont concentrées sur la boucle hypervariable V3 qui possède, non seulement des épitopes de neutralisation, mais aussi des sites reconnus par les cellules T cytotoxiques et l'ADCC.

L'induction d'une immunité protectrice *in vivo* suite à des immunisations avec des peptides synthétiques a été évaluée récemment par Shafferman *et al.* (1991). Des macaques ont été vaccinés avec des peptides correspondant à différentes régions des glycoprotéines du SIV qui montraient une immunogénicité et une haute homologie avec les séquences correspondantes du VIH. Ces peptides, produits comme des protéines de fusion associées à la β -galactosidase, ont induit la synthèse d'anticorps neutralisants chez les macaques vaccinés mais n'ont pas protégé ces derniers contre une épreuve expérimentale avec du SIV. Malgré l'absence de protection, la virémie a été plus faible voire même transitoire comparée à celle des animaux témoins.

Bien que l'utilisation des peptides synthétiques comme vaccins se soit avérée très prometteuse dans plusieurs systèmes, aucune étude *in vivo* jusqu'à présent, a réussi à démontrer le rôle protecteur de peptides synthétiques dérivés d'épitopes antigéniques du VIH ou du SIV.

3.3.5 Anticorps anti-idiotypiques

Nombreuses sont les études qui montrent que les anticorps anti-idiotypiques (anti-Id) peuvent induire une immunité protectrice contre plusieurs agents infectieux (Grzych *et al.*, 1985; Jackson *et al.*, 1990; Kennedy *et*

al., 1986; McNamara *et al.*, 1984; Sacks *et al.*, 1982; Stein et Soderstrom 1984). Le principe de ce type de vaccination repose sur la génération d'immunoglobulines anti-Id qui sont l'image interne de l'antigène. Cette approche a été explorée dans le développement d'un vaccin contre le VIH. Deux stratégies peuvent être envisagées. La première serait de produire des anti-Id qui sont l'image interne de la gp120, la molécule qui reconnaît le récepteur cellulaire. Utilisés comme vaccin ces anti-Id stimuleront, théoriquement, la synthèse d'immunoglobulines qui pourraient neutraliser l'infectivité du VIH en bloquant l'interaction gp120-CD4 (Kennedy et Attanasio 1990). L'autre stratégie serait d'immuniser les individus avec des anticorps anti-CD4. Cette vaccination induira la synthèse d'immunoglobulines anti-idiotypiques qui seraient l'image interne de la molécule CD4. Ces anticorps pourraient alors s'attacher aux glycoprotéines virales et ainsi neutraliser les virus circulants (Kennedy et Attanasio 1990). En effet, l'immunisation de souris avec une immunoglobuline anti-CD4 a induit la synthèse d'anticorps capables d'inhiber la formation de syncytia de cellules infectées par le VIH-1 et le VIH-2 (Chanh *et al.*, 1987, Dalgleish *et al.*, 1987, 1988). Cependant, ce type d'immunisation pourrait aussi induire des anticorps capables d'interférer avec le fonctionnement du CD4 (Haynes 1993) ou d'être impliqués dans des séquelles autoimmunes (Karpatkin et Nardi, 1992; Karpatkin *et al.*, 1992). Des immunoglobulines dirigées contre les anticorps anti-idiotypiques seront aussi produites rendant ainsi la vaccination inefficace. Les études sur cette approche vaccinale doivent être approfondies.

3.3.6 Sous-unités virales naturelles et recombinantes

Les antigènes viraux peuvent être isolés à partir d'une production virale *in vitro* sur des lignées cellulaires ou synthétisés par génie génétique. Les principaux systèmes d'expressions qui ont été utilisés dans la synthèse des antigènes du VIH incluent les baculovirus, *Echerichia coli*, les levures, et les cellules de mammifères (cellules CHO: "chinese hamster ovary") (Crowl *et al.*, 1985; Homsy *et al.*, 1987; Larder *et al.*, 1987). Les modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation, la myristylation et la phosphorylation des protéines exprimées sont très importantes et peuvent jouer un rôle immunomodulateur. Ainsi le système d'expression doit être choisi avec précaution pour assurer les modifications appropriées des protéines exprimées.

Le rôle majeur des glycoprotéines purifiées du VIH dans leur pouvoir d'induire une immunité protectrice a été rapporté pour la première fois par Berman *et al.* (1990). Dans cette étude, des chimpanzés immunisés avec la gp120 purifiée, exprimée dans des cellules CHO, ont été protégés contre une épreuve virale avec du virus homologue. Des études analogues chez le macaque n'ont pas été aussi prometteuses (Cranage *et al.*, 1992b; Stott *et al.*, 1991). Notamment, Cranage *et al.* (1992b) rapportent que des macaques immunisés avec la glycoprotéine recombinante (gp160 ou gp130/140) n'ont pas été protégés contre une épreuve expérimentale avec du SIV, même si les titres d'anticorps circulants neutralisants étaient plus élevés que ceux des macaques protégés, vaccinés avec du SIV inactivé. En dépit de ces résultats, plusieurs groupes de chercheurs incluent dans leurs régimes d'immunisation la gp160

ou la gp120 purifiées (Ahmad *et al.*, 1993; Fultz *et al.* 1992; Girard *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992).

Un inconvénient dans l'utilisation de protéines isolées comme vaccins est leur faible immunogénicité comparée à une quantité équivalente de ces protéines lorsqu'elles sont associées à des particules virales. En effet, l'immunogénicité des déterminants antigéniques dépend, non seulement de la séquence en acides aminés (déterminants continus), mais aussi à la structure tridimensionnelle (déterminants discontinus) de la protéine. Généralement, lors de l'extraction et la purification des protéines de l'enveloppe d'un virus, il y a une perte de l'immunogénicité. L'absence de la membrane lipidique pour assurer la conformation native des protéines semble être responsable de cette perte d'immunogénicité (Perrin *et al.*, 1984; Thibodeau *et al.*, 1984, 1989). Cette hypothèse a été confirmée par l'étude sur le pouvoir immunogénique de la protéine G du virus de la rage (Perrin *et al.*, 1985a,b). Lorsque la protéine G est injectée à des souris, elle est peu immunogène. Son immunogénicité est fortement augmentée lorsque celle-ci est incorporée dans un double feuillet phospholipidique pour former des immunosomes. L'analogie structurale entre les liposomes et les membranes biologiques fait que ces vésicules sont un vecteur adéquat pour les protéines virales. En effet, l'injection d'immunosomes à des souris stimule une forte production d'anticorps neutralisants qui protègent les animaux contre une dose létale de virus rabique lors d'une épreuve expérimentale. La technologie des immunosomes s'est révélée une approche fort intéressante dans la mise au point d'un vaccin sous-unitaire anti-VIH utilisant les glycoprotéines gp160/120 du virus. Les études de la réponse humorale de souris injectées avec des immunosomes ou

les glycoprotéines purifiées démontrent que les animaux immunisés avec les immunosomes-VIH (IMS-VIH) ont des titres en anticorps neutralisants 2 à 30 fois supérieurs à ceux induits par l'injection d'une quantité équivalente de glycoprotéines purifiées (Thibodeau *et al.*, 1989).

Etant donné que le VIH est principalement transmis par les contacts sexuels, L. Thibodeau et collaborateurs (1991, 1992a, 1992b) évaluent, depuis récemment, le potentiel des IMS-VIH à induire une réponse mucoale contre le VIH, utilisant comme modèle animal la souris et le lapin. Leurs expériences préliminaires (Thibodeau *et al.*, 1991, 1992a) ont montré que des contacts répétés des muqueuses orales avec l'IMS-VIH pouvaient induire la production d'anticorps spécifiques du VIH dans la salive. Ce type d'immunisation était également capable de sensibiliser le système immunitaire à une réponse systémique précoce suite à une immunisation par voie parentérale avec une faible dose d'antigène. Des titres très élevés d'anticorps sériques (IgA, IgG et IgM) spécifiques du VIH étaient observés; ceux-ci étaient capables de neutraliser l'infectivité du virus *in vitro*. Des études subséquentes (Coutsinos et Thibodeau, 1993; Thibodeau *et al.*, 1992b) ont montré qu'il était possible d'induire, à la fois, une forte réponse systémique ainsi que des IgA-S au niveau des muqueuses par un protocole à deux ou trois interventions. Particulièrement, ces travaux indiquaient que les immunisations mucoales semblaient être indispensables pour le développement d'une réponse immune locale. En effet, des protocoles d'immunisation, dont les interventions étaient par voie parentérale uniquement s'étaient montrés inefficaces dans la stimulation de l'immunité mucoale. Par ailleurs, les immunisations par voie intraluminale (IL), effectuées dans le cadre de ces expériences, montraient

l'importance de la sensibilisation des plaques de Peyer dans la stimulation de l'immunité mucoale. Cette observation indiquait le potentiel des capsules entériques comme vaccin oral que les auteurs proposent comme voie d'immunisation chez le lapin et le macaque. Enfin, Thibodeau *et al.* (1992b) et, Coutsinos et Thibodeau (1993) soulignent que la voie et le protocole d'immunisation sont des paramètres importants à considérer dans l'évaluation de protocoles donnés pour induire les réponses immunes à la fois mucoale et systémique.

Par ailleurs, l'efficacité des liposomes, comme vecteurs, dans l'induction d'une réponse mucoale contre *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) a été évaluée chez le rat. Dans ce modèle animal, des immunisations intragastriques avec des liposomes associés à des protéines antigéniques de (*S.mutans*) ont stimulé la synthèse d'IgA salivaires anti-*S.mutans* avec une grande efficacité ainsi que la réduction du pourcentage de cette bactérie dans les plaques dentaires comparé aux animaux qui ont reçu les antigènes seuls (Michalek *et al.*, 1992).

Les microsphère biodégradables représentent une autre approche vaccinale qui s'est avérée efficace dans la stimulation du système immunitaire (McGhee et Mestecky, 1990; Mestecky et Elridge, 1991). Le principe consiste à encapsuler l'antigène à l'intérieur de matériaux biodégradables et biocompatibles comme les polymères DL-PLG ("poly-DL-lactide-co-glycolide"). L'avantage que les microcapsules partagent avec les immunosomes est qu'elles peuvent être utilisées comme vecteurs de médicaments et porteurs d'antigènes viraux *in vivo*. Utilisant comme vaccin du SIV inactivé microencapsulé, Marx *et al.* (1993) ont été les premiers à rapporter une protection de macaques

femelles contre une épreuve virale expérimentale intravaginale avec du SIV homologue. Dans cette étude, des protocoles d'immunisation parentéral-mucosal ont été entrepris où les macaques ont reçu, dans une période de deux ans, trois IM suivi par trois immunisations intra-gastriques (IG) ou intratrachéales (IT). Deux autres groupes de macaques ont reçu, dans cette même période des vaccinations IM ou orales. Suite à une première épreuve expérimentale intravaginale, cinq des six macaques des protocoles parentéral-mucosal, le macaque du protocole IM-IM ainsi que un sur quatre macaques témoins négatifs ont été protégés contre l'infection tandis que tous les animaux du protocole oral-oral ont été infectés. Les macaques protégés ont par la suite reçu un vaccin de rappel et ont été éprouvés une deuxième fois par la même voie. Trois des quatre macaques des protocoles parentéral-mucosal ont été protégés contre cette deuxième épreuve, tandis que le macaque du protocole IM-IM a été infecté. La présence d'anticorps spécifiques du VIH dans les sécrétions vaginales des macaques protégés de l'épreuve expérimentale indiquent que l'immunité mucoale a été stimulée. Cette étude montre la nécessité d'inclure des immunisations mucoales dans les protocoles d'immunisations anti-VIH.

Jusqu'à présent, la plupart des études vaccinales qui ont rapporté une protection contre une épreuve expérimentale avec du VIH, SIV ou FIV ont suivi un protocole d'immunisation parentéral. Or, il est connu que ce régime d'immunisation stimule la synthèse d'anticorps sériques mais est peu efficace dans la génération d'une protection au niveau des muqueuses. Par ailleurs, l'importance de l'immunité mucoale dans la protection contre les infections acquises par les muqueuses est bien documentée. Basé sur ces données et

compte tenu de la transmission sexuelle du VIH et la pertinence de l'immunité mucoale, une bonne stratégie de vaccination devrait conduire à l'induction d'une immunité mucoale en plus d'une immunité systémique. Peu de travaux ont été publiés concernant les conditions optimales d'immunisation soit, le protocole, la fréquence, l'intervalle et la durée des interventions, ainsi que la dose antigénique et la voie d'immunisation. Dans le cadre de ce projet, nous avons évalué ces paramètres dans le but de stimuler le système immunitaire dans sa totalité et surtout d'induire une immunité locale au niveau des muqueuses génitales.

MATERIEL ET METHODES

1. ETAPES PRINCIPALES

Utilisant l'immunosome-VIH à titre de vaccin expérimental contre le VIH, nous avons évalué dans ce projet différents paramètres d'immunisation dans le but d'induire une immunité mucoale associée à une forte immunité systémique. Diverses voies et protocoles d'immunisation ont d'abord été évalués chez la souris et, par la suite, chez le lapin. Parmi les différentes voies qui ont été analysées citons les immunisations mucoales: orale, intravaginale et intraluminale (par capsules entériques ou par laparotomie) et les immunisations parentérales: intramusculaire et intrapéritonéale. Le nombre de vaccinations ainsi que les intervalles entre chacune d'elles ont été évalués. Les réponses immunes humorales et mucoales de même que l'activité neutralisante des anticorps produits (pour certains protocoles) ont été quantifiées et comparées. Les protocoles qui se sont avérés les plus intéressants dans le modèle souris ont été, par la suite, repris et élaborés chez le lapin.

2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES GLYCOPROTEINES VIRALES gp160/120

2.1 Infection des cellules CEM par le VIH-1 et production virale

Les glycoprotéines virales, nécessaires à la production de notre vaccin sous-unitaire, l'immunosome-VIH, ont été isolées et purifiées à partir de productions virales dans des cellules permissives à l'infection au VIH. Les conditions expérimentales pour obtenir un rendement maximal en gp160/120 ont préalablement été définies dans notre laboratoire.

La souche du VIH utilisée dans ces expériences, LAI, provient du laboratoire du Dr. Luc Montagnier. Le virus est produit sur des cellules CEM T4 clone 13 (Institut Pasteur, France); ce sous-clone est dérivé d'une lignée de lymphocytes de stade blaste II, isolée d'une culture de globules blancs recueillis du sang périphérique d'une fillette atteinte de leucémie aigüe (Foley *et al.* 1965).

Lors de la production virale à l'échelle préparative, les cellules CEM sont ajustées à une concentration de 5×10^5 cellules/mL et sont cultivées dans des bouteilles de culture en pyrex de 4 litres (Bellco Glass, N.J., E.U.) sous agitation constante pendant trois jours à 37°C. La suspension cellulaire est, par la suite, centrifugée à 1000 x g durant 10 minutes et le culot cellulaire ($1,8 \times 10^9$ cellules) est infecté par le VIH-1 à un indice de multiplicité (MOI) de 0,002 DITC₅₀. Après une heure de contact à 37°C, un volume de 3,6 L de milieu de croissance (la composition duquel est décrite à l'annexe II) est ajouté pour respecter la concentration cellulaire initiale. L'incubation se poursuit sous agitation constante à 37°C pendant 3 jours. Au troisième jour, l'agitation est arrêtée et la moitié du surnageant est remplacé par du milieu de croissance frais sans sérum foetal bovin. L'incubation se poursuit durant 24 heures. Les surnageants récoltés au troisième et quatrième jours post-infection sont utilisés pour l'isolement et la purification des glycoprotéines.

2.2 Isolement des glycoprotéines virales

Le virus et les protéines virales qui sont présents dans les surnageants clarifiés de cellules infectées, sont précipités au sulfate d'ammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, à 70% de saturation à 0°C sous agitation constante. Après une heure, le mélange est recueilli et centrifugé à 10000xg pendant 30 minutes. Les

culots de protéines sont dissouts dans du PBS, dialysés contre ce même tampon durant environ une semaine et conservés à -70°C jusqu'au moment de la purification.

2.3 Purification des glycoprotéines virales

La purification des glycoprotéines s'effectue par ultracentrifugation sur un gradient de densité de saccharose. Cette technique permet la séparation d'un mélange viral en fonction de la densité de flottaison de chacune des composantes.

Dans le but de solubiliser les membranes virales, les surnageants, préalablement précipités au sulfate ammonique, sont traités par le β -D-octylglucopyranoside (OGP: Boehringer Mannheim, Qué., Canada) et l'acide désoxycholique (DOC: Sigma, St Louis, MI, E.U.) dilués dans un tampon Tris 50 mM, pH 7,4, pour obtenir une concentration finale de 2% et 1% des détergents respectifs. Après une incubation de 30 minutes à 20°C suivie de 30 minutes à 10°C , la préparation est déposée sur des gradients linéaires de saccharose de 60 à 8% et centrifugée à 25000 rpm et 4°C pendant 44 heures (Beckman L8-80, rotor SW-28). Les gradients sont, par la suite, fractionnés par le bas à raison de 1,5 mL par fraction. Les glycoprotéines gp160/120 migrent dans les fractions 10 à 13, ce qui correspond à une concentration en saccharose de 30 à 35% soit à une densité de 1,12 à 1,16 g/mL. Ces fractions sont regroupées et dialysées pendant une semaine dans l'eau distillée-déionisée puis contre du PBS dilué 1/50 additionné de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl: Boehringer Mannheim, Qué., Canada). Les glycoprotéines purifiées sont lyophilisées et conservées dans un dessiccateur à 4°C . Elles sont reconstituées avec du PBS stérile au moment de

leur utilisation.

2.4 Caractérisation des protéines virales gp160/120

2.4.1 Evaluation de la concentration en protéines par spectrophotométrie

La quantification des protéines est effectuée par une technique colorimétrique sensible et très rapide. Celle-ci, initialement développée par Bradford en 1976, repose sur le changement différentiel de l'absorption maximale d'une solution acide de bleu de coomassie G-250, passant de 465 à 595 nm, suite aux interactions avec les groupements aminés libres des protéines. L'absorbance des échantillons à 595 nm est directement proportionnelle à la concentration en protéines, en autant que cette dernière ne dépasse pas le seuil critique.

Pour chaque expérience, une courbe étalon doit être établie à partir d'une solution d'albumine bovine sérique (BSA: BioRad, CA, E.U.) de 1 mg/mL. La concentration exacte en protéine de cette solution est évaluée par le coefficient d'extinction molaire selon la relation: concentration en protéines ($\mu\text{g/mL}$) = $(183A_{230}) - (75,8A_{260})$, A correspondant à la densité optique de l'échantillon à 230 nm et 260 nm. Des dilutions de la solution d'albumine sérique bovine (BSA) sont effectuées dans du PBS de façon à obtenir les concentrations 0 - 10 - 20 - 40 - 60 - 80 - 100 μg de protéines dans 100 μL de solution. Pour les échantillons dont la concentration en protéines est inconnue, des volumes de 25 - 50 - 75 μL sont prélevés et complétés à 100 μL avec du PBS. A ce volume on ajoute 5 mL du réactif Bio-Rad (Richmond, CA,

E.U.) préalablement dilué 1/5 dans l'eau distillée-déionisée et filtré sur papier Whatman numéro 1 pour enlever les particules en suspension. Après une incubation de 15 minutes à la température de la pièce, l'absorbance est mesurée à 595 nm dans des cuvettes de quartz, au spectrophotomètre (PMQ3 Zeiss, Allemagne). La concentration en protéines des échantillons est alors déterminée par référence à la portion linéaire de la courbe étalon.

2.4.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Le principe de l'électrophorèse repose sur la migration de particules chargées, en fonction de leur poids moléculaire, sous l'influence d'un champ électrique. Cette technique est utilisée pour faire des analyses qualitatives incluant: la présence d'une protéine, l'évaluation de son poids moléculaire et son degré de pureté.

Dans le cadre de ces expériences, l'électrophorèse en système discontinu est utilisée selon la méthode décrite par Laemmli (1970). La préparation des gels et des différents tampons est détaillée à l'annexe III. La concentration en polyacrylamide des gels de séparation varie entre 8 à 12% selon la taille des protéines à analyser; celle du gel de regroupement est constante à 4%. Les plaques de verres (18 x 16 cm: Canberra-Packard, Canada) séparées de barres d'espacement de 1,5 mm d'épaisseur, sont montées pour obtenir des gels ayant les dimensions 16 cm x 14 cm x 1,5 cm. Ces plaques sont préalablement lavées à l'acide sulfochromique (Fisher Scientific, NJ, E.U.) et rincées à l'eau distillée-déionisée puis à l'éthanol 70%.

Au cours de chaque électrophorèse, des standards de masse moléculaire

connue (BioRad, CA, E.U.) doivent être utilisés comme référence. La concentration de ces standards est calculée de façon à appliquer 0,2 µg de protéine par bande observée sur le gel. La concentration en protéine des échantillons à analyser est effectuée par le test décrit au paragraphe précédent. A un volume de 45 µL d'échantillon (10 µg), on ajoute 20 µL d'une solution de saccharose à 40% et 45 µL du tampon Tris base 5 mM, pH 7,0, contenant du SDS 0,5%, du β-mercaptoéthanol 2,5% et du glycérol 5%. Les protéines sont dénaturées par chauffage à 100°C durant 5 minutes. Lorsque les échantillons sont refroidis, on ajoute 20 µL d'une solution de bleu de bromophénol 0,005% dilué dans du saccharose 40% et on les dépose dans les puits du gel. Les gels sont immergés dans un réservoir (Hoefer Scientific Instruments, SE 600, CA, E.U.) rempli du tampon Tris base 25 mM, pH 8,5, contenant du SDS 0,1% et de glycine 192 mM. Un voltage constant de 100 volts (générateur de puissance: Pharmacia EPS 500/400) est initialement appliqué à travers les gels pendant une heure. Ceci permet le regroupement des protéines des différents puits au niveau du gel de séparation. Le voltage est ensuite baissé à 65 volts et l'électrophorèse se poursuit pendant 15 heures. La migration des protéines est arrêtée lorsque le front de migration atteint environ 5 mm du bas du gel. Les protéines ainsi séparées, sont révélées par coloration à l'argent selon la méthode décrite par Merrill *et al.* (1981). Cette étape se déroule sous agitation constante, à l'abri de la lumière, dans des plateaux en polyéthylène. Les protéines sont d'abord fixées sur le gel pendant une heure dans un mélange de méthanol 50% et d'acide acétique 10%. Après trois lavages consécutifs de 20 minutes, les gels sont placés dans un bain oxydant de bichromate de potassium 3,4 mM et d'acide nitrique 3,2 mM pendant 5 minutes puis rincés à l'eau distillée-déionisée trois fois durant 5 minutes. Les gels sont alors placés, durant

30 minutes, dans une solution de nitrate d'argent 12 mM puis rincés à l'eau distillée-déionisée à trois reprises durant une minute. Enfin, la révélation des protéines s'effectue en plaçant le gel dans une solution fraîchement préparée de carbonate de sodium 280 mM qui contient 0,05% de formaldéhyde. Les gels sont alors rincés à trois reprises durant 30 secondes avec 50 mL de cette solution puis sont laissés dans celle-ci entre 5 à 10 minutes selon la concentration des protéines et l'intensité de la coloration désirée. La coloration est arrêtée par l'immersion du gel dans une solution d'acide acétique à 3% pendant au moins 10 minutes.

3. PREPARATIONS VACCINALES

3.1 Production des immunosomes-VIH

La production des immunosomes-VIH se fait en deux étapes: la préparation des vésicules phospholipidiques, ou liposomes, suivi par l'ancrage des glycoprotéines du VIH (gp 160/120) à la surface de ces dernières.

Les liposomes composés de phosphatidylcholine (PC) et de cholestérol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, E.U.) dans un rapport molaire 7 : 1 sont préparés dans un appareil Lipoprep (Dianorm, Munich, Allemagne), un dialyseur dont le débit et la température sont ajustés à 1 mL/min et 40°C, respectivement. Une solution lipidique est d'abord préparée en diluant, à la température de la pièce et à l'abri de la lumière, 63 μmol de PC et 9 μmol de cholestérol dans de l'OGP 200 mM dilué dans du PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} à pH 7,4. Le volume final de cette solution est de 6,0 mL et la concentration en lipides de 12 $\mu\text{mol}/\text{mL}$. La préparation lipidique préchauffée à 40°C est injectée

dans la cellule de l'appareil Lipoprep et dialysée contre du PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} pendant 24 heures. Cette dialyse continue entraîne la formation de liposomes par le retrait de l'OGP du mélange lipides-détergent. Les liposomes ainsi formés sont centrifugés pendant dix minutes à 1000 rpm et 4°C (Sorvall RC-5B, rotor SS-34) afin d'éliminer les particules insolubles, puis sont conservés à 4°C.

Dans la production d'immunosomes, les protéines virales et les liposomes préformés sont utilisés dans un rapport 500 µg de protéines pour 2 µmol de lipides. Les liposomes sont fluidifiés par l'addition d'OGP à une concentration finale de 3 mM. Parallèlement, les glycoprotéines purifiées sont dissociées par l'addition d'OGP à une concentration finale n'excédant pas 100 mM. Après trente minutes d'incubation à la température de la pièce, les complexes protéines-détergent sont combinés aux liposomes fluidifiés, puis le mélange est placé dans une membrane de cellulose (Spectrum Medical Industries, CA, E.U.), préalablement traitée au glycérol à 20%, et mis à dialyser durant 24 heures à 4°C contre un gradient linéaire décroissant d'OGP (de 10 mM à 0 mM) dilué dans du PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} et additionné de tréhalose 0,3%. L'élimination progressive du détergent permet l'incorporation des glycoprotéines dans le double feuillet phospholipidique des liposomes. Les immunosomes ainsi formés sont dialysés durant 72 à 96 heures contre du PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} additionné de tréhalose à 0,3%.

3.2 Caractérisation des immunosomes

Les immunosomes sont analysés par les méthodes décrites aux paragraphes 2.4.1 et 2.4.2 . Leur morphologie est évaluée par microscopie

électronique, leur pureté par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et leur antigénicité par un test immunoenzymatique ELISA (décrit au paragraphe 7.1) en utilisant des sérums d'animaux hyperimmunisés avec les glycoprotéines virales ainsi que des sérums humains reconnus positifs pour les antigènes du VIH.

3.3 Préparation des capsules entériques

Les capsules entériques sont conçues pour résister au pH acide de l'estomac et aux enzymes protéolytiques mais peuvent se désintégrer et libérer leur contenu dans le milieu alcalin de l'intestin grêle. Leur préparation s'effectue en deux étapes: l'incorporation de l'antigène lyophilisé dans des capsules de gélatine, suivie par un enrobage de chacune d'entre elles. Chaque capsule est remplie du mélange antigénique composé de 100 µg d'immunosome-VIH lyophilisé et 170 mg de saccharose et tréhalose en proportions égales. Les capsules sont par la suite enrobées individuellement de trois couches d'une préparation à base de cellulose qui les rend résistantes au milieu acide de l'estomac et aux enzymes protéolytiques. Une fois enrobées les capsules sont conservées à 4°C dans un dessiccateur. La résistance du produit final est évalué dans des solutions de PBS ayant des pH variés. Dans les solutions acides ou neutres, les capsules restent intactes tandis qu'elles se désintègrent complètement dans les solutions alcalines.

3.4 Préparation des suppositoires vaginaux

Les suppositoires préparés pour les immunisations intravaginales de lapin sont à base de glycérine/glycérol. Chaque suppositoire est composé de

100 μ g d'IMS-VIH (soit 200 μ L d'une solution de 500 μ g/mL) et 150 μ L du mélange glycérine/glycerol pour obtenir un volume total de 350 μ L. Le rapport antigène/glycérine/glycérol est tel que les suppositoires sont solides à la température ambiante mais se désintègrent à la température corporelle. Lors de la préparation des suppositoires, le mélange glycérine/glycérol est chauffé à environ 40°C, soit à une température inférieure à la température de transition des phospholipides qui constituent les immunosomes, et ce, pour empêcher la décomposition de ces derniers. La solution finale est distribuée à raison de 350 μ L dans des seringues de 1 mL qui servent de moule. Une fois solidifiés les suppositoires sont conservés à 4°C.

La cinétique de dégradation des suppositoires a été vérifiée en les plaçant dans la paume d'une main humectée avec du PBS. Cet environnement humide tente de simuler l'environnement vaginal. Au bout d'une heure, les suppositoires sont complètement fondus.

4. MODELE ANIMAL

4.1 La souris

Des souris BALB/c femelles (Charles River, St Constant, Qué.) de 18 à 20 grammes, âgées d'environ huit semaines et exemptes de tout germes pathogènes sont maintenues dans des micro-isolateurs pendant la durée des expériences. De la nourriture pasteurisée (Prolab, de Charles River) et de l'eau traitée par osmose renversée, acidifiée (pH 3,4) puis stérilisée leur sont fournies *ad libitum*. Pour éviter les risques de contamination des animaux, toutes les interventions expérimentales s'effectuent sous des hottes biologiques.

4.2 Le lapin

Des lapins femelles "White New Zealand" (Ferme de Sélection Cunipur, St-Valérien, Qué.) de poids variant entre 2 et 3 kg et âgés d'environ dix semaines sont gardés dans les conditions conventionnelles d'animalerie. De la nourriture pasteurisée (Rabbit Chow, Purina, Charles River) et de l'eau filtrée à travers un filtre de 0,22 μm leur sont fournies *ad libitum*.

5. IMMUNISATIONS DES ANIMAUX

Différentes stratégies d'immunisation ont été entreprises, chez la souris et le lapin, afin de stimuler une immunité mucoale associée à une forte immunité systémique. Dans le cadre de ce travail, les immunosomes-VIH (IMS-VIH) sont utilisés comme vaccin. Ces derniers sont substitués par du tampon phosphate stérile sans Ca^{++} ni Mg^{++} pour les témoins négatifs. Les voies d'immunisation évaluées sont les suivantes : orale, intravaginale (IVa), intraluminaire (par laparotomie (IL) ou par capsules entériques (Caps)) intramusculaire (IM), intrapéritonéale (IP) et intradermique (ID).

5.1 Immunisations mucoales

5.1.1 Immunisation orale

L'immunisation orale est effectuée au moyen d'une seringue (Monoject, St-Louis, MI, E.U.) au bout de laquelle est placée une aiguille nourricière (20G11/2); Popper and Sons, N.Y., E.U.). Cette dernière est appropriée pour ce type d'immunisation puisque son extrémité est arrondie prévenant ainsi les blessures au niveau des muqueuses buccales. Lors de

l'immunisation, l'aiguille nourricière est délicatement introduite dans la bouche de l'animal et l'antigène (doses variables d'IMS-VIH) est lentement injecté par petits volumes (environ 10 μ L à la fois). Le déplacement simultané de l'aiguille assure que les muqueuses buccales sont entièrement recouvertes de l'antigène. Pour les témoins négatifs, un volume équivalent de PBS stérile sans Ca^{++} ni Mg^{++} est administré.

5.1.2 Immunisation intravaginale

Etant donné la contrainte physique des dimensions du vagin de souris, ce type d'immunisation a été effectué chez les lapins seulement. Sans nécessiter d'anesthésie ou de sédation, les lapins sont couchés sur le dos et tenus fermement. Le vagin et l'aiguille nourricière qui sert d'outil d'immunisation sont recouverts d'une gelée minérale lubrifiante (Carter-Wallace N.C., Ont., Canada). L'aiguille nourricière est doucement insérée dans le vagin de l'animal et le suppositoire est lentement injecté en s'assurant de bien sensibiliser toutes les parois du vagin. La dose d'IMS-VIH-1 par suppositoire est 100 μ g.

5.1.3 Immunisation intraluminale

5.1.3.1 Directe par laparotomie

L'immunisation intraluminale directe (IL), par laparotomie, est un peu plus complexe que les autres types d'immunisations, nécessitant une anesthésie générale de l'animal ainsi qu'une intervention chirurgicale. Un champ opératoire stérile est créé sous la hotte biologique pour éviter tout risque de contamination et d'infection. Une lampe chauffante placée dans ce champ

procure de la chaleur à l'animal pendant et après la chirurgie, pour prévenir l'hypothermie.

L'anesthésie varie selon l'espèce animale. Les souris sont anesthésiées par une injection IP de pentobarbital de sodium (MTC Pharmaceuticals, Ont., Canada), à raison de 60 mg par kg de poids corporel. Les lapins reçoivent un anesthésiant, la kétamine (35 à 40 mg/kg) et un analgésique et tranquilisant, la xylazine (5 mg/kg). Après que le réflexe de la patte ait disparu, l'abdomen de l'animal est désinfecté avec de l'iodovet (Rougier, Chambly, Qué., Canada), une solution topique à 10% de povidone iodée. Une incision du plan cutané médian (4 à 5 mm pour la souris et 20 à 30 mm pour le lapin) puis du plan musculaire sont faites à la hauteur de l'os iliaque. Ceci expose un petit segment de l'intestin grêle dans lequel l'antigène est injecté (30 μ g et 50 μ g d'IMS-VIH pour la souris et le lapin, respectivement) de préférence à la proximité d'une plaque de Peyer. La solution antigénique contient du bleu de trypan 0,1% pour permettre la visualisation de l'injection dans la lumière intestinale. Le bout de l'intestin est replacé dans la cavité et quelques gouttes d'antibiotique (Derapen C: Ayerst Laboratories, Qué., Canada) y sont déposées. L'étape suivante, la suture de l'incision, varie selon l'espèce animale. Pour la souris, le plan musculaire et le plan cutané sont suturés simultanément tandis que pour le lapin, chacun des deux plans est suturé individuellement. Toutes les sutures sont faites utilisant du fil résorbable "Catgut Ethicon" (CDMV, St Hyacynthe, Qué., Canada) à l'exception des points du plan cutané du lapin. Dans ce cas, un fil non-fondant est employé (Supramid White: CDMV) puis est enlevé deux semaines après l'intervention.

Les souris, étant très sensibles à la température, sont gardées durant et

après la chirurgie sous une lampe chauffante et sont surveillées jusqu'au retour de leurs réflexes. Pendant les jours qui suivent, la plaie est quotidiennement désinfectée avec l'iodovet.

5.1.3.2 Indirecte par des capsules entériques

Les capsules entériques ont été élaborées pour mimer l'immunisation intraluminale, étant donné qu'il est impossible de faire des immunisations IL chez l'humain. Les lapins sont tranquilisés par une injection intramusculaire de kétamine (0,9 mg/kg) et d'acépromazine (0,09 mg/kg) sans qu'ils perdent le réflexe de déglutition. Un cylindre en plastique, ayant un diamètre de 1 cm, est inséré dans la cavité orale. Celui-ci garde la bouche de l'animal ouverte et nous permet de voir le fond de la gorge. La capsule est poussée au fond de la gorge et un peu d'eau est fournie. L'animal alors déglutit et avale la capsule. Ce type d'immunisation n'a pu être effectué chez la souris étant donné la dimension des capsules entériques: les plus petites sont incompatibles avec la bouche des souris.

5.2 Immunisations parentérales

5.2.1 Immunisation intramusculaire

L'immunisation intramusculaire (IM) est le mode principal de vaccination chez l'humain. Les autres voies utilisées sont: sous-cutanée, intradermique et par scarification. Dans nos expériences, l'IM a été faite directement dans le muscle de la cuisse de l'animal. La dose antigénique d'IMS-VIH est de 45 µg pour la souris et 200 µg pour le lapin.

5.2.2 Immunisation intrapéritonéale

Ce type d'immunisation a été effectué uniquement chez la souris, la dose antigénique d'IMS-VIH étant de 45 µg. Au cours de cette inoculation, l'antigène est directement injecté dans la cavité péritonéale. L'injection se fait au niveau du cadran inférieur de l'abdomen de l'animal. L'aiguille (26G 5/8) est épointée pour éviter une perforation potentielle des intestins.

5.2.3 Immunisation intradermique

L'intervention intradermique, qui a été effectuée uniquement chez le lapin, consiste à inoculer l'antigène dans la peau de l'animal. La région d'immunisation choisie est le dos du lapin au niveau des épaules. Sur une surface rasée d'environ 5 cm x 8 cm, les injections de 100 µL sont effectuées à dix endroits différents; la dose antigénique totale d'IMS-VIH administrée étant de 300 µg.

6. PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

6.1 Chez la souris

A la fin de chaque protocole d'immunisation, la salive, le sang, les sécrétions intestinales ainsi que les intestins des animaux sont prélevés. Ces échantillons, sont manipulés et gardés en tout temps sur la glace pour éviter toute activité protéolytique.

6.1.1 Salive

On injecte à l'animal une solution d'urécholine (Merck Frosst,

Kirkland, Qué. Canada) par voie sous-cutanée, au niveau de la nuque (200 µg/kg de poids corporel). Deux minutes plus tard, le débit de salive est considérablement accru. Celle-ci est alors récoltée à l'aide d'une pipette mécanique (Eppendorf: Brinkmann Instruments, N.Y., E.U.) et déposée dans un vial qui contient 50 µL d'une solution de lavage, la composition de laquelle est décrite à l'annexe IV. Les échantillons de salive sont centrifugés, pour éliminer les bactéries, et gardés à 0°C jusqu'au moment d'être analysés.

6.1.2 Sérum

La souris est placée dans une chambre d'anesthésie qui consiste en un pot fermé au fond duquel il y a de la ouate imbibée de 1 à 2 mL d'halothane B.P. (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ont. Canada), un anesthésique gazeux. L'animal est laissé dans cette chambre remplie de vapeurs, 30 secondes environ, le temps qu'il soit profondément endormi. Une saignée finale est alors effectuée par ponction cardiaque. L'aiguille (23G1) est insérée au plan médian juste au dessous du sternum et est dirigée vers le côté gauche de l'animal tout en la gardant parallèle au sternum. Le sang est placé dans des tubes conçus pour la séparation du sérum (Microtainers: Becton Dickinson, E.U.). Après avoir laissé coaguler le sang (un minimum d'une heure), les tubes sont centrifugés 10 minutes à 360 x g et 4°C. Pendant la centrifugation, le gel séparateur qui est au fond des tubes migre vers le haut à l'interface du sérum et du caillot de sang. Les sérums ainsi séparés sont récupérés puis conservés à 0°C ou à -70°C, s'ils ne sont pas analysés dans la même journée.

6.1.3 Sécrétions intestinales

Suite à la saignée finale, la souris est placée sur un plateau à dissection, et l'abdomen est désinfecté avec de l'éthanol 70% . Une incision du plan cutané permet de dégager la peau de l'abdomen. Le péritoine est alors coupé exposant ainsi les intestins. Ceux-ci sont prélevés de la manière suivante: l'intestin grêle, allant de la jonction gastro-duodénale jusqu'à son intersection avec le caecum, et le colon, s'étendant du caecum jusqu'à la partie supérieur du rectum. Le contenu intestinal est récupéré par lavage, en faisant passer à travers la lumière intestinale 5 mL d'une solution de lavage dont la composition est décrite à l'annexe IV. Le mucus est recueilli, séparément, en pinçant les intestins sur toute leur longueur avec des pinces à dissection.

Les sécrétions obtenues par lavage intestinal sont mélangées à l'aide d'un vortex pendant une minute puis centrifugées dix minutes à 570 x g et 4°C. Les surnageants, clarifiés des matières fécales, sont combinés avec leur mucus respectif, mélangés pendant une minute puis centrifugés 20 minutes à 15600 x g et 4°C. Les surnageants de cette centrifugation sont recueillis dans des tubes stériles et conservés sur glace ou congelés à -70°C.

6.1.4 Homogénat intestinal

Après avoir été vidés de leur contenu et du mucus, l'intestin grêle et le colon de chaque souris sont combinés, triturés puis homogénéisés dans la solution de lavage (3,5 mL) à l'aide d'un Potter-Elvehjem. Les homogénats sont alors centrifugés pendant 20 minutes à 15600 x g et 4°C. Les surnageants clarifiés sont conservés à 0°C ou à -70°C.

6.2 Chez le lapin

Ce modèle animal nous a permis d'évaluer des paramètres supplémentaires comme les larmes et les sécrétions vaginales. De plus nous avons pu retirer plus d'information dans les différents protocoles étant donné que l'on a pu faire des prélèvements durant le cours de l'expérience ce qui nous était impossible chez la souris.

6.2.1 Sérum

Les saignées partielles sont effectuées à partir des veines de l'oreille. Le prélèvement a lieu sur le côté dorsal de celle-ci. On désinfecte la région concernée avec de l'éthanol 70% et on enlève les poils par épilation. Pour les saignées finales, les animaux sont anesthésiés avec un cocktail de kétamine (70 mg/kg) et d'acépromazine (0,4 mg/kg) administré par voie IM. Quand l'animal est profondément endormi, une ponction cardiaque est effectuée selon la méthode décrite au paragraphe 6.1.2. Le sang est recueilli dans des tubes conçus pour la séparation du sérum et est laissé durant un minimum d'une heure à la température de la pièce. Le sérum est par la suite séparé du sang par centrifugation pendant dix minutes à 360 x g et 4°C.

6.2.2 Sécrétions intestinales

6.2.2.1 Induction de diarrhée

Dans le but de pouvoir analyser le taux d'anticorps au niveau intestinal, nous avons induit une diarrhée chez le lapin selon une méthode modifiée de Burr *et al.* (1987). Les lapins sont anesthésiés avec un mélange de kétamine (70 mg/kg) et d'acépromazine (0,4 mg/kg) administré par voie IM.

Un tube esophagien (3 mm de diamètre et 29 cm de longueur: CDMV, Qué., Canada) est ensuite placé dans l'esophage et l'animal est gavé avec une solution saline isotonique qui contient du polyéthylène glycol (PEG) (annexe IV). Un volume de 15 mL de cette solution est administrée quatre fois à 15 minutes d'intervalle. Trente minutes après le dernier gavage on administre par voie IP la pilocarpine, un parasymphaticomimétique, à raison de 4 mg/kg de poids corporel. Ce traitement induit, en environ cinq minutes, une abondante salivation, une sécrétion lacrimale et une défécation. Ces sécrétions sont recueillies et gardées sur glace. Les sécrétions intestinales qui sont produites durant la première demi-heure sont de consistance ferme. Dans la demi-heure qui suit, il y a production d'une diarrhée. Ces deux types de sécrétions sont recueillies séparément mais sont traitées de la même façon par la suite.

6.2.2.2 Traitement des sécrétions intestinales

Les sécrétions intestinales sont homogénéisées et diluées 1 : 4 dans un tampon phosphate qui contient du Tween à 0,1% (polyoxyethylene-20-sorbitan monolaurate: Fisher Scientific, NJ, E.U.). Les échantillons sont incubés à 56°C pendant 15 minutes pour inhiber toute activité protéolytique et aussi pour contrer la propriété qu'a le PEG de précipiter les immunoglobulines. Les matières fécales solides sont éliminées par une centrifugation de 10 minutes à 570 x g et 4°C. Le surnageant est par la suite clarifié par une centrifugation de 20 minutes à 15600 x g et 4°C. On ajoute ensuite un inhibiteur de protéase (soybean trypsin inhibitor: Gibco Laboratories, N.Y., E.U.) à une concentration finale de 0,1 mg/mL. Les échantillons sont conservés à 0°C ou à -70°C s'ils ne sont pas analysés dans la même journée.

6.2.3 Salive

La sécrétion de la salive commence cinq minutes après l'injection de pilocarpine et continue pendant environ une heure. Etant donné que le débit et le volume de salive produit sont élevés, il est plus pratique de récolter celle-ci dans un tube en polypropylène (de 50 mL) qui est placé sous la bouche de l'animal au lieu d'utiliser une pipette mécanique. La salive qui est produite est très visqueuse, elle est donc diluée dans un rapport volumétrique 1 : 4 avec du PBS/tween 0,1% puis centrifugée pendant 20 minutes à 15600 x g et 4°C. On ajoute au surnageant l'inhibiteur de protéase, décrit plus haut, à une concentration finale de 0,1 mg/mL. Les échantillons sont conservés à 0°C ou -70°C.

6.2.4 Larmes

La pilocarpine stimule les glandes lacrimales chez la majorité des lapins. Les larmes sont recueillies et conservées telles quelles à 0°C ou -70°C en attendant d'être analysées.

6.2.5 Urine

Le prélèvement de l'urine s'effectue sous anesthésie générale. Pour ce faire, le lapin est placé sur le dos et une pression est faite sur la vessie. Celle-ci est vidée complètement pour éviter que l'animal urine quand à lieu le lavage vaginal. L'urine qui est récoltée est diluée 1 : 4 dans du PBS/tween 0,1% puis est centrifugée durant 20 minutes à 15600 x g et 4°C. On ajoute l'inhibiteur de protéase au surnageant clarifié, à une concentration finale de 0,1 mg/mL, et on le conserve à 0°C ou -70°C.

6.2.6 Sécrétions vaginales

Les sécrétions vaginales sont obtenues par lavage du vagin qui a lieu suite au prélèvement de l'urine. L'instrument de lavage est une seringue de 3 mL au bout de laquelle on a placé une aiguille à bout rond. Lors du lavage, les parois du vagin de l'animal sont légèrement étirées et un volume de 1 mL de PBS/tween 0,1% y est doucement injecté. Cette solution est reprise dans la seringue puis réinjectée dans le vagin. Ce procédé est répété cinq fois. Au volume final on ajoute l'inhibiteur de protéase et les échantillons sont conservés comme les autres sécrétions.

6.2.7 Mucus du colon et du grêle, appendice

A la fin de certains protocoles, les animaux sont sacrifiés puis les intestins ainsi que l'appendice sont prélevés. Après avoir vidé le colon et l'intestin grêle de leur contenu, leur surface est grattée avec un bistouri pour recueillir le mucus de la lumière intestinale. Ce dernier est homogénéisé et dilué 1 : 4 dans du PBS/tween 0,1%. Après une centrifugation de 10 minutes à 570 x g et 4°C et une seconde de 20 minutes à 15600 x g et 4°C, on ajoute aux surnageants l'inhibiteur de protéase et les échantillons sont conservés à 0°C ou -70°C. L'appendice est trituré puis homogénéisé dans du PBS/ tween 0,1%. Son traitement est identique à celui du mucus.

7. ANALYSE DES ECHANTILLONS

Le titre d'anticorps spécifiques du VIH-1, dans les échantillons recueillis, ainsi que leur pouvoir neutralisant sont évalués par des techniques

dont le principe repose sur l'interaction spécifique entre antigènes et anticorps.

7.1 Test immunoenzymatique ELISA

Cette technique permet d'identifier le titre des anticorps présents dans les échantillons. Des anti-immunoglobulines (de souris ou de lapin) couplés à une enzyme, la peroxydase, se fixent aux immunoglobulines à doser et sont révélées par l'addition d'un substrat chromogène, l'ortho-phénylènediamine dihydrochlorure (OPD: ICN Biochemicals, Ohio, E.U.) lequel est activé par la portion enzymatique du ligand pour donner un produit coloré.

La réaction s'effectue dans des plateaux à 96 cupules (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp, Roskilde, Danemark). Un volume de 100 μ L du VIH-1 inactivé par la chaleur ou des immunosomes-VIH (50 ng) dilués dans du tampon barbital pH 8,6 est distribué dans chaque cupule et incubé pendant deux heures à 37°C, sous atmosphère humide, puis durant la nuit à 4°C. Les cupules sont par la suite lavées trois fois au PBS-tween 0,02%. Les sites non spécifiques sont saturés par l'addition de 100 μ L de PBS-BSA 3% dans chaque cupule. Après une incubation d'une heure à 37°C les cupules sont vidangées et 100 μ L de différentes dilutions des échantillons à tester sont ajoutés et incubés à 37°C durant deux heures. Les anticorps non attachés sont éliminés par lavage au PBS-tween 0,02% et 100 μ L du conjugué, des anti-immunoglobulines de souris ou de lapin couplées à la peroxydase, préalablement dilué dans du PBS-BSA 3% est ajouté et laissé en contact pendant deux heures à 37°C. Les cupules sont par la suite lavées au PBS-tween 0,02% cinq fois. La réaction est révélée par l'addition du chromogène OPD, à une concentration finale de 0,4 mg/mL, dilué dans du tampon citrate pH 5,0 additionné de H₂O₂ 0,01% (Fisher Scientific, N.J., E.U.) (100 μ L/ cupule). La réaction colorimétrique se développe au cours d'une

incubation de 15 minutes à l'obscurité et à la température de la pièce. Cette dernière est arrêtée par l'addition de 50 µL/puit d'acide sulfurique 4N (Fisher Scientific, N.J., E.U.) et la densité optique de chaque cupule est lue à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplateau Dynatech MR 5000 (Dynatech Laboratories, Virginie, E.U.). Le titre d'anticorps présents dans les échantillons est déterminé à partir de la mesure de la densité optique et il est exprimé comme la plus haute dilution de l'échantillon qui donne une densité optique supérieure à 0,200.

7.2 Test d'immunofluorescence indirecte

L'utilisation d'anticorps conjugués à un fluorochrome est à la base des réactions d'immunofluorescence. Dans la méthode indirecte, les anticorps dans l'échantillon sont mis en présence et se fixent sur un antigène spécifique. Le complexe antigène-anticorps est alors révélé à l'aide d'un autre anticorps conjugué à un fluorochrome et spécifique aux immunoglobulines de l'espèce animale d'où provient l'échantillon. Dans notre cas, les antigènes spécifiques sont des cellules infectées par le VIH exprimant toutes les protéines virales, incluant la glycoprotéine de l'enveloppe (gp160/120).

Des cellules CEM sont infectées avec le VIH-1 (0,1 DICT₅₀/cellule) et incubées durant 4 jours à 37°C sous atmosphère de CO₂. Un volume de 0,5 mL d'une suspension cellulaire infectée (environ 4 x 10⁵ cellules) est prélevé et lavé avec 45 mL de PBS par centrifugation durant cinq minutes à 90 x g et 4°C. Le surnageant est vidangé et les cellules sont remises en suspension dans un volume minimal. Quinze µL de cette suspension cellulaire sont déposés dans chacun des puits des lames à fluorescence (ICN Biochemicals, PA, E.U.). Les

cellules sont séchées sous la hotte biologique durant 30 minutes et fixées à l'acétone froid (-20°C) pendant 30 minutes. Des dilutions des échantillons sont alors déposées dans les puits (20 µL/ puit), laissées en contact pendant 30 minutes à 37°C sous atmosphère de CO₂. Les puits sont lavés, sous agitation, deux fois au PBS et une fois à l'eau distillée-déionisée. Enfin les complexes antigène-anticorps sont révélés par l'addition de 20 µL d'anti-immunoglobulines couplées à l'isothiocyanate de fluoresceine préparée dans l'isothiocyanate de rhodamine (1/200). Après 30 minutes de contact à 37°C sous atmosphère humide, les lames sont lavées au PBS. Le montage des lames et lamelles avec du glycérol dilué à 90% dans du PBS permet l'observation des préparations au microscope à fluorescence (Leitz Laborlux S, Allemagne).

7.3 Evaluation du pouvoir neutralisant des anticorps

7.3.1 Test de neutralisation classique sur cellules CEM

Cette technique consiste à mettre en évidence des anticorps capables de neutraliser l'infectivité d'un virus *in vitro*, qui est évaluée par l'absence d'effet cytopathogène visible et par l'absence de synthèse d'antigènes viraux.

Pour évaluer le pouvoir neutralisant des anticorps, des dilutions par deux des échantillons (125 µL) sont mis en contact avec un volume égal d'une suspension virale (30 à 100 DICT₅₀) à 37°C durant une heure. On ajoute le mélange virus-anticorps (250 µL) à un culot cellulaire qui contient $1,6 \times 10^6$ cellules CEM et le tout est incubé pendant une heure à 37°C sous atmosphère de CO₂ à 5%. Les virus neutralisés non attachés sont enlevés par centrifugation (90 x g, 23°C et 5 minutes). Le culot de cellules, lavé dans 1 mL de milieu, est repris dans 4 mL de milieu et est réparti dans un plateau de 24 puits (à raison de

1 mL par puit, quatre puits étant ensemencés pour chaque dilution de l'échantillon). Les plateaux sont incubés à 37°C sous atmosphère de CO₂ à 5% et l'infectivité productive est vérifiée après 7 jours par l'effet cytopathogène et par immunofluorescence, à l'aide d'un sérum de référence humain reconnu positif pour les antigènes du VIH. Le titre neutralisant est exprimé comme la plus haute dilution de l'échantillon capable de protéger 50% des cellules de l'infection lorsque comparé à une culture témoin infectée.

7.3.2 Test de neutralisation sur cellules HeLa-CD4-LTR-βgal

La lignée cellulaire HeLa-CD4-LTR-βgal a été développée par Kimpton et Emerman en 1992. Dérivées d'un carcinome épithélial cervical humain, les cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur rétroviral exprimant la molécule CD4. Les cellules qui exprimaient fortement le CD4 ont alors été sélectionnées et transfectées avec un plasmide porteur du gène de la β-galactosidase, sous le contrôle des LTR du VIH-1. Ces cellules, transformées, sont une cible pour le VIH et ont été utilisées pour évaluer le pouvoir neutralisant des anticorps spécifiques du VIH.

Dans un premier temps, les cellules HeLa-CD4-LTR-βgal trypsinisées sont ensemencées dans des plateaux de 96 puits à raison de 8000 cellules par puit (200 μL) et incubées durant la nuit à 37°C sous atmosphère de CO₂ à 5%. L'incubation se poursuit durant un minimum de 12 heures, le temps que les cellules régèrent les récepteurs CD4, qui ont été dégradés lors de la trypsinisation. On ajoute au feuillet cellulaire l'inoculum neutralisé soit 25 μL d'anti-sérum et un volume égal de différentes quantités de virus (10² à 10⁵ DITC₅₀) préalablement mis en contact durant une heure à 37°C. Dans chaque

cupule on ajoute du DEAE dextran, à une concentration finale de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pour favoriser l'infection . Après deux heures de contact à 37°C, l'inoculum viral neutralisé est enlevé et on ajoute du milieu de culture DMEM (200 $\mu\text{L}/\text{puit}$) additionné de sérum fœtal bovin (10%) et des antibiotiques G418 (0,1 mg/mL) et hygromycine (0,05 mg/mL). Les plateaux sont alors incubés durant 48 heures à 37°C sous atmosphère de CO_2 à 5%. Au deuxième jour, on enlève le milieu de culture et on fixe les feuillets cellulaires pendant 5 minutes, à la température de la pièce, avec du tampon phosphate additionné de formaldéhyde 1% et glutaraldéhyde 0,2%. Les puits sont alors lavés deux fois au PBS et on ajoute la solution de coloration: PBS, ferrocyanure de potassium (0,2M), ferricyanure de potassium (0,2M), chlorure de magnésium (2,0M) et X-gal (40 mg/mL). L'incubation se poursuit à 37°C durant 50 minutes, après quoi les puits sont lavés et examinés sous le microscope. Suite à l'étape de coloration, les cellules qui ont été infectées par le VIH sont de couleur bleue. Pour une dilution donnée de chaque sérum ou de sécrétions muco-sales, le nombre d'aggrégats cellulaires de couleur bleue observés sous le microscope optique dans les puits est comparé à celui du témoin virus et du témoin cellule.

RESULTATS

1. PRODUCTION , PURIFICATION ET CARACTERISATION DES GLYCOPROTEINES DU VIH-1

Les conditions expérimentales pour obtenir un rendement maximal en gp160/120 ont été préalablement définies dans notre laboratoire. La production à grande échelle des glycoprotéines virales a été effectuée sur cellules CEM, une lignée cellulaire capable de donner une très grande progéniture virale en moins de cinq jours. Initialement, des cinétiques d'infection de ces cellules ont été réalisées pour évaluer l'indice de multiplicité à utiliser lors de l'infection et le temps post-infection où la récolte du surnageant doit être faite. Ces évaluations ont été effectuées selon les critères suivants: 1) les changements morphologiques, ou l'effet cytopathogène, visualisés par microscopie optique, 2) le pourcentage de cellules infectées déterminé par immunofluorescence indirecte et 3) l'évaluation du titre viral et la production des glycoprotéines virales dans le surnageant des cellules infectées.

Les cinétiques d'infection dans des bouteilles de quatre litres utilisant un MOI de 0,002 DICT₅₀ montrent que la production des glycoprotéines est maximale à quatre jours post-infection, quoi qu'elle soit déjà fort élevée trois jours post-infection. Ces conditions expérimentales ont été alors appliquées pour la production massive des glycoprotéines. A partir des surnageants concentrés de cellules infectées, les glycoprotéines ont été purifiées par ultracentrifugation en gradients de densité de saccharose 60 à 8%. Le profil électrophorétique du produit purifié sur gel de polyacrylamide 8% est présenté à la figure 4. On remarque une bande prédominante de masse relative de 160 kDa (la gp160) ainsi que deux bandes d'intensité moyenne de 120 et 68 kDa. L'intensité du signal des différentes bandes, après coloration à l'argent, permet d'évaluer la proportion des différentes

protéines. La gp160 se distingue des autres protéines et représente environ 80% du produit purifié. Le rendement moyen en glycoprotéines d'une bouteille de quatre litres est 200 mg soit 50 mg de protéines par litre de surnageant. Si l'on considère que la gp160 constitue 80% des protéines totales, on peut estimer le rendement en gp160 à 160 mg soit 40 mg par litre de surnageant de cellules infectées, après purification.

2. PREPARATION ET CARACTERISATION DES IMMUNOSOMES VIH

Les immunosomes-VIH sont formés par l'ancrage des glycoprotéines virales purifiées à la surface de vésicules phospholipidiques préformées. Une fois synthétisés, la morphologie, l'antigénicité et la pureté des immunosomes sont caractérisés par microscopie électronique, par ELISA et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, respectivement.

Le profil électrophorétique des immunosomes (figure 4), identique à celui des glycoprotéines purifiées, laisse voir une bande principale de masse relative 160 kDa qui correspond à la gp160. L'antigénicité des immunosomes est évaluée par ELISA utilisant un sérum de référence humain reconnu positif pour les antigènes du VIH ainsi que des sérums d'animaux hyperimmunisés avec le même antigène. Une observation des immunosomes au microscope électronique révèle des particules sphériques ayant un diamètre d'environ 80 nm (figure 5a). A l'instar du VIH (figure 5b), la surface de l'immunosome est recouverte de projections d'environ 8 nm (Thibodeau *et al.*, 1992a); ces dernières représentent les glycoprotéines gp160/120 qui sont ancrées, par leurs portions hydrophobes, dans l'enveloppe phospholipidique du liposome.

3. EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET SYSTEMIQUE ANTI-VIH DANS LE MODELE SOURIS

Vingt protocoles d'immunisation ont été évalués dans ce modèle animal. A la fin de ceux-ci, la salive, les sécrétions intestinales, l'homogénat intestinal et le sérum de chaque souris ont été prélevés et analysés. Nous avons considéré les résultats de l'analyse des échantillons de salive et des homogénats intestinaux comme un reflet de l'état de l'immunité mucoale.

3.1 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à une intervention parentérale

Nous avons initialement analysé les effets d'une seule intervention parentérale. Des groupes de souris ont été immunisés par voie intramusculaire ou intrapéritonéale avec 45 µg de l'immunosome-VIH-1 dans un volume total de 100µL. Quinze jours plus tard, les prélèvements ont été effectués et le taux d'anticorps spécifiques du VIH-1 pour chaque échantillon a été évalué par ELISA. Le tableau I montre une production très modeste de IgG et IgM dans les sérums le titre variant de 1/100 à 1/400 pour les animaux ayant reçu l'IM et de 1/400 à 1/6400 pour ceux qui ont reçu l'IP. Seule une souris du protocole IP possède des IgA sériques. Par ailleurs aucun anticorps n'a été décelé au niveau de la salive et l'homogénat intestinal. Ces résultats indiquent qu'une seule intervention parentérale n'est pas suffisante pour induire des anticorps sériques à un niveau acceptable, ni induire des anticorps au niveau des muqueuses.

3.2 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à des interventions mucosales

3.2.1 Immunisations orales

3.2.1.1 Effet de la durée des immunisations

Dans un premier temps nous avons évalué l'influence de la durée des immunisations orales sur la production d'anticorps au niveau des muqueuses et dans le sérum. Le tableau II présente les résultats d'une suite de protocoles ou des groupes de souris ont reçu trois immunisations orales (25 µg d'IMS-VIH-1 en solution) par semaine pendant une, deux ou trois semaines. Deux jours après la dernière immunisation, les animaux ont été sacrifiés et les titres d'anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive et le sérum ont été déterminés par ELISA. On remarque qu'après une semaine d'immunisation, les immunoglobulines sont absentes dans la salive et le sérum. Déjà, après deux semaines d'immunisation, on peut observer une différence marquée. Trois salives sur six sont positives: le titre d'IgA-S variant de 1/6 à 1/192. A l'exception d'une souris, les titres des IgA sériques sont assez élevés (de 1/20 à 1/160) et les titres en IgG+IgM sont de 1/160 à 1/2560. Le protocole le plus efficace est celui qui a duré trois semaines. Dans ce dernier, toutes les souris ont démontré la présence d'IgA-S dans la salive, les titres variant de 1/48 à 1/192. Parallèlement, les anticorps sériques sont également élevés : les titres atteignant 1/320 en IgA et 1/20480 en IgG+IgM.

Dans l'ensemble, plus la durée des immunisations est longue plus les niveaux des différents isotypes d'immunoglobulines sont élevés. De plus, les immunisations orales stimulent, non seulement l'immunité mucoale mais également l'immunité humorale.

3.2.1.2 Effet de la fréquence des immunisations

Cette série de protocoles a été entreprise pour analyser l'effet de la fréquence des immunisations orales. Dans ce cas, la durée des expériences est demeurée constante (trois semaines) mais le nombre d'immunisations orales (25 µg d'IMS-VIH-1 en solution) que les animaux reçoivent par semaine a varié (soit une, deux ou trois fois). Les résultats présentés dans le tableau III montrent que des titres élevés d'anticorps spécifiques pour le VIH dans le sérum et la salive sont induits par des protocoles dont la fréquence est deux ou trois fois par semaine. En effet, tous les animaux ayant subi ces protocoles possèdent des IgA-S dans la salive, le titre variant de 1/6 à 1/96 pour le protocole "deux fois par semaine" et de 1/48 à 1/192 pour le protocole "trois fois par semaine". Les niveaux des anticorps sériques sont aussi élevés dans les deux cas atteignant 1/20480 en IgG+IgM et 1/320 en IgA. Aucun anticorps n'a été décelé dans la salive et dans le sérum des souris témoins et celles qui ont été immunisées une fois par semaine durant trois semaines.

3.2.2 Immunisation intraluminale

Ce type d'intervention a été utilisé pour mimer les immunisations orales par capsules entériques effectuées chez le lapin, étant donné que les souris sont incapables d'avaler celles-ci. Dans le cadre de ce protocole nous avons voulu apporter l'antigène en solution (45µg d'IMS-VIH-1 dans 100µL) directement à la proximité des plaques de Peyer qui sont le site majeur de l'induction d'une immunité mucoale. Le tableau IV présente les titres d'anticorps dans le sérum et les différents compartiments mucoaux quinze jours après une immunisation intraluminale (IL). Une seule immunisation IL ne stimule que faiblement la réponse immunitaire. En effet, les titres sont faibles, voire inexistant dans la

salive et le sérum. Malgré l'absence d'anticorps salivaires, la présence d'IgA spécifiques du VIH au niveau de l'homogénat intestinal montre que l'intervention IL a stimulé l'immunité mucoale. Lorsqu'une immunisation IM est combinée à l'intervention IL, on observe que tous les animaux développent des IgA-S spécifiques du VIH dans la salive et l'homogénat intestinal, les titres allant de 1/32 à 1/64 et 1/40 à 1/80, respectivement. Dans ces échantillons les niveaux des IgG+IgM sont considérablement élevés atteignant 1/640. Bien que l'on n'observe pas d'IgA dans les sérums, les titres en IgG+IgM sont très élevés; ils varient de 1/6400 à 1/204800. De plus, on constate que toutes les souris possèdent des IgA-S dans la salive alors que la muqueuse orale n'a pas été en contact direct avec l'antigène.

3.3 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à des protocoles à interventions mixtes

Cette série d'expériences était destinée à déterminer si, dans un protocole mucosal-parentéral, il valait mieux commencer par l'une ou l'autre intervention. Le tableau V présente les résultats d'un protocole à interventions mixtes dont les immunisations orales ont précédé ou suivi l'IM. On voit que la réponse immunitaire est plus vigoureuse lorsque l'intervention orale précède l'intervention parentérale. En effet dans ce protocole cinq souris sur six possèdent des IgA-S dans la salive, les titres atteignant 1/120. De même, dans les homogénats intestinaux les niveaux d'immunoglobulines sont fort élevés allant jusqu'à 1/120 pour les IgA-S et 1/1280 pour les IgG+IgM. Parallèlement, les titres d'anticorps dans les sérums sont très importants atteignant 1/200 en IgA et 1/102400 en IgG+IgM. Au contraire, le deuxième groupe de souris, qui a reçu l'IM avant les immunisations orales, a montré une réponse immunitaire moins vigoureuse, les

autres paramètres étant égaux. Le titre d'IgA dans l'homogénat intestinal varie entre 1/40 et 1/80 mais est très faible ou inexistant dans la salive et le sérum. De plus, on observe des titres très modestes en IgG+IgM dans les sérums (1/800 à 1/3200).

Des protocoles semblables ont été entrepris où les immunisations orales ont été prolongées d'une semaine. Les résultats de cette expérience, présentés au tableau VI, corroborent ceux qui viennent d'être décrits à savoir que l'immunité systémique et mucoale sont stimulées plus vigoureusement lorsque les immunisations orales précèdent l'intervention IM. En effet, toutes les souris du protocole Oral-IM possèdent des IgA spécifiques du VIH dans la salive, les titres allant jusqu'à 1/120. Bien que des titres aussi importants soient observés chez deux souris du protocole IM-Oral, ceux-ci sont, en moyenne, inférieurs. Si les niveaux des IgA sont plus faibles dans l'homogénat intestinal (1/20 à 1/40) chez les souris du protocole Oral-IM, comparativement à ceux du protocole inversé, il reste que les titres en IgG+IgM sont considérablement plus élevés dans le protocole Oral-IM, atteignant 1/1280. On remarque également une production d'anticorps sériques plus élevée dans le protocole Oral-IM. A titre de comparaison, dans ce protocole, les titres en IgA varient entre 1/100 et 1/400 et ceux des IgG+IgM atteignent 1/64000, tandis que l'on observe des titres plus modestes dans le protocole inversé soit <1/50 à 1/200 pour les IgA et 1/2000 à 1/16000 pour les IgG+IgM. De plus, les résultats d'immunofluorescence (tableau VI) montrent que les anticorps sériques, dont la synthèse a été stimulée par les protocoles d'immunisation Oral-IM et IM-Oral, reconnaissent spécifiquement le VIH.

4. EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET SYSTEMIQUE ANTI-VIH DANS LE MODELE LAPIN

A partir des résultats obtenus chez la souris, nous avons sélectionné les protocoles d'immunisation destinés à être évalués chez le lapin. Dans ce modèle animal, d'autres voies d'immunisation, qu'il était impossible d'effectuer chez la souris en raison de sa petite taille, ont été explorées. De plus, une plus grande variété d'échantillons a pu être prélevée et analysée, entre autre les larmes, les sécrétions vaginales et l'urine. Les titres d'anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive, les larmes, le mucus intestinal ainsi que les sécrétions vaginales et intestinales ont servi d'indicateurs de l'immunité mucoale.

4.1 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à différents protocoles d'immunisation par voie mucoale ou parentérale seulement

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer et comparer les différentes voies d'immunisation mucoales quant à leur pouvoir de stimuler une réponse immune locale et systémique. Nous nous sommes basés sur les résultats d'immunisations orales chez la souris pour déterminer la durée et la fréquence des immunisations mucoales, qui incluent les voies intravaginale, intraluminale, orale et par capsules entériques. Ainsi, des groupes de lapins ont reçu trois immunisations mucoales par semaine durant trois semaines, exceptés les animaux du protocole IL qui ont reçu une seule immunisation. Quel que soit le protocole d'immunisation mucoale, on remarque que la synthèse d'anticorps au niveau des muqueuses est faible (tableau VII). Notamment, aucun anticorps est détecté dans

les sécrétions mucoales des animaux des protocoles IVa et Oral. Par contre, la présence d'anticorps dans les larmes des lapins des protocoles IL (1/20 en IgG) et Caps (1/20 en IgA et 1/40 en IgG) indique que ces interventions ont stimulé l'immunité mucoale. Les larmes semblent être un bon indice de l'immunité au niveau des muqueuses; malheureusement, dans le cadre de ces protocoles d'immunisations, nous n'avons pas réussi à obtenir des larmes chez tous les lapins. L'immunité mucoale semble avoir été stimulée le mieux suite aux immunisations par capsules entériques étant donné que l'on observe des anticorps spécifiques du VIH, non seulement dans les larmes, mais aussi dans les sécrétions vaginales et intestinales de ces lapins. Par ailleurs, tous les protocoles d'immunisations mucoales ont stimulé la synthèse d'anticorps sériques d'isotype IgG et IgM mais pas de type IgA. Les titres en IgG sont les plus élevés dans le protocole IVa (allant jusqu'à 1/3200), tandis que dans les autres protocoles d'immunisation le titre en IgG est de 1/200. De même, les niveaux des IgM varient entre 1/400 et 1/1600 et sont les plus élevés dans le protocole IVa.

L'effet de la durée des immunisations intravaginales sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1 a été évaluée sur une période de quatre semaines (tableau VIII). La fréquence des immunisations IVa étant constante (3 fois par semaine), les prélèvements des échantillons ont été effectués après deux, trois et quatre semaines d'immunisation. Malgré l'absence ou les faibles titres d'immunoglobulines dans les différents compartiments mucoaux après trois semaines d'interventions, on observe une augmentation modeste des titres sériques en IgG et IgM, atteignant, respectivement, 1/3200 et 1/1600. Une semaine supplémentaire d'immunisation stimule très vigoureusement le système immunitaire. Les IgG sont prédominants au niveau des sécrétions mucoales et le

sérum, atteignant 1/512 dans les larmes, 1/32 dans la salive et les sécrétions vaginales, 1/16 dans les sécrétions intestinales et 1/51200 dans le sérum. Les niveaux des IgA sont également considérablement élevés dans les larmes et le sérum, allant, respectivement, jusqu'à 1/64 et 1/400. Par ailleurs, bien qu'après les quatre semaines d'immunisation IVa les titres des IgM soient faibles dans les différents compartiments mucosaux, au niveau du sérum ils atteignent 1/3200. Tel qu'il avait été observé dans le modèle souris, on remarque, chez le lapin, que lorsqu'on augmente la durée des immunisations mucosales, les immunités mucoale et humorale augmentent en parallèle.

L'effet des immunisations parentérales sur la synthèse d'anticorps sériques et dans les différents compartiments mucosaux est évalué dans la figure 11. Ce lapin a reçu deux IM aux jours 0 et 7, puis au jour 14 les titres et les isotypes des immunoglobulines ont été évalués. Bien que ces interventions parentérales stimulent considérablement la synthèse d'anticorps sériques, les niveaux d'immunoglobulines dans les sécrétions mucosales sont très modestes voire inexistantes. Ces résultats concordent à ceux obtenus chez la souris et montrent l'inefficacité des immunisations parentérales à induire des anticorps au niveau des muqueuses.

4.2 Production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à des combinaisons d'interventions mucosales et parentérales

Quoique parmi les protocoles d'immunisations mucosales évalués chez le lapin, l'intervention intravaginale et les capsules entériques semblent stimuler plus efficacement les réponses immunes (tableau VII), nous avons entrepris de combiner ces types d'immunisation avec une intervention IM dans le but de

stimuler le système immunitaire dans sa totalité et de déterminer si, dans un protocole mucosal-parentéral, il valait mieux commencer par l'un ou par l'autre, tel que observé chez la souris. Le tableau IX présente les résultats d'un protocole d'interventions mixtes dont les immunisations intravaginales ont précédé ou suivi une IM. Ces résultats, qui corroborent ceux obtenus dans le modèle souris, montrent que le système immunitaire est stimulé plus vigoureusement lorsque les interventions intravaginales précèdent l'IM. En effet, suite à ce protocole d'immunisation, les titres d'anticorps sériques spécifiques du VIH-1 atteignent 1/25600 en IgA, 1/51200 en IgM et 1/512000 en IgG. Ceux-ci sont plus faibles chez les animaux qui ont reçu le protocole inversé (IM-IVa) et correspondent à 1/800 en IgA, 1/1600 en IgM et 1/102400 en IgG. Parallèlement, la stimulation de l'immunité mucoale, supérieure dans le protocole IVa-IM à celle du protocole IM-IVa, est démontrée par les titres d'immunoglobulines considérablement élevés dans les sécrétions mucoales (tableau IX). La différence la plus marquée entre ces deux protocoles inversés est surtout au niveau des titres en IgG dans les échantillons de salive, de larmes et des sécrétions intestinales. Dans le protocole IVa-IM, ces titres atteignent 1/256 dans la salive, 1/3200 dans les larmes et 1/1024 dans les sécrétions intestinales. Au contraire, dans le protocole IM-IVa, on observe une réduction des titres d'au moins un facteur dix, où, dans ce cas, les titres en IgG atteignent 1/32, 1/512 et 1/32, respectivement dans la salive, les larmes et les sécrétions intestinales. Nous avons, cependant, été surpris de ne pas détecter des IgA-S dans les sécrétions vaginales, surtout que ces lapins avaient été immunisés par cette voie. La dilution des sécrétions vaginales qui a eu lieu pendant le lavage vaginal et, par la suite, lors de son traitement peut expliquer ces résultats.

Une représentation graphique des titres d'anticorps spécifiques du VIH-1 dans le sérum et les différents compartiments mucosaux suite aux protocoles IVa-IM (figures 6 et 7) et IM-IVa (figure 8) montre clairement que les IgG sont l'isotype prédominant dans les échantillons analysés. Quant aux niveaux des IgA et IgM, ils sont comparables. D'après les figures 6 et 7, on peut constater que c'est dans le mucus intestinal que les niveaux d'immunoglobulines sont les plus élevés suivi, par ordre décroissant, les larmes, la salive, les sécrétions intestinales, l'urine et les sécrétions vaginales. Bien que le mucus intestinal reflète le mieux l'état de l'immunité mucosale, ce prélèvement ne peut être évalué qu'une seule fois, étant donné qu'il implique le sacrifice de l'animal. Par contre, les prélèvements de larmes et de salive ont l'avantage de permettre des échantillonnages répétés au cours d'un protocole d'immunisation donné. Ainsi, les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans les larmes et la salive ont servi d'un bon indicateur de l'état de l'immunité mucosale.

Les deux autres protocoles inversés que nous avons évalués sont Caps-IM et IM-Caps, où les immunisations par capsules entériques ont précédé ou suivi une intervention IM. Les résultats de ces séries d'immunisations sont présentés dans le tableau X et les figures 9 et 10. On remarque que, à l'opposé des résultats préalablement décrits, le protocole où l'intervention parentérale précède les immunisations mucosales semble stimuler plus efficacement la synthèse des anticorps. Les titres des immunoglobulines sériques des animaux du protocole IM-Caps, atteignant 1/1600 en IgA, 1/3200 en IgM et 1/102400 en IgG, sont supérieurs à ceux des lapins du protocole Caps-IM qui vont jusqu'à 1/100 en IgA, 1/1600 en IgM et 1/6400 en IgG. Également, le protocole Caps-IM ne stimule que des titres très modestes en IgG dans la salive ($<1/4$), les larmes (1/80) et les

sécrétions intestinales (1/8) comparativement au protocole inversé où les titres d'IgG dans les mêmes échantillons atteignent 1/128, 1/2560 et 1/128, dans les sécrétions respectives. Par contre, la synthèse des IgA et IgM au niveau des muqueuses semble avoir été stimulée un peu plus efficacement dans le protocole Caps-IM où l'on observe dans les échantillons de salive et de larmes des titres en IgA et IgM supérieurs ou égaux à ceux des mêmes échantillons du protocole IM-Caps. La contradiction apparente entre ces résultats, à savoir que le système immunitaire est stimulé plus vigoureusement lorsque le parentéral (IM) précède le mucosal (Caps) et ceux préalablement présentés, peut venir de ce que nous avons parfois rencontré certaines difficultés pour faire avaler les capsules aux lapins.

La distribution des anticorps dans les différents compartiments muqueux suite aux protocoles Caps-IM (figure 9) et IM-Caps (figure 10) indiquent, comme il a été précédemment remarqué, que dans la plupart des cas, les IgG sont les immunoglobulines prédominantes. Encore une fois, la salive, et surtout les larmes sont un bon indicateur de l'immunité au niveau des muqueuses.

Le tableau XI regroupe les différents protocoles d'immunisation mucoale-parentérale qui ont été effectués chez le lapin. On observe une stimulation très vigoureuse à la fois de l'immunité mucoale et humorale, surtout chez les lapins des protocoles IVa-IM et IL-IM. Au niveau des différentes sécrétions mucoales, les titres en IgA sont les plus élevés dans la salive, atteignant 1/64 pour les protocoles IVa-IM et Caps-IM, et 1/32 pour les protocoles IL-IM et Oral-IM. Malgré l'absence ou les faibles niveaux d'IgA dans les sécrétions vaginales, on observe des titres jusqu'à 1/40 (protocoles IVa-IM et Caps-IM) dans les larmes. En général, les niveaux des IgM dans les différents compartiments mucoaux sont parallèles à ceux des IgA et sont les plus élevés dans les larmes, atteignant 1/160

dans le protocole IVa-IM et Caps-IM et 1/40 dans les protocoles IL-IM et Oral-IM. L'isotype dont le titre est de loin le plus élevé dans tous les prélèvements qui ont été effectués est l'IgG. Au niveau des sécrétions mucosales, les IgG prédominent dans les larmes, allant de 1/20 pour le protocole Oral-IM à 1/3200 pour le protocole IVa-IM. Dans la salive et les sécrétions intestinales, on observe également des niveaux d'IgG élevés surtout pour le protocole IVa-IM. Dans le protocole IVa-IM, les titres des immunoglobulines sériques, qui atteignent 1/512000 en IgG, 1/51200 en IgM et 1/25600 en IgA, reflètent l'efficacité de celui-ci dans la stimulation totale du système immunitaire. Par ordre décroissant d'efficacité suivent les protocoles IL-IM, Oral-IM et Caps-IM.

4.3 Evolution des titres d'anticorps sériques au cours des protocoles d'immunisation

L'analyse de l'évolution des titres des immunoglobulines sériques au cours des protocoles intramusculaire-mucosal-intradermique (figures 12 et 13) montre une augmentation considérable des anticorps deux semaines après l'immunisation IM initiale. Les IgG sont prédominants; leur titre se situant entre 1/6400 (figure 12) et 1/25600 (figure 13). Les niveaux des IgM sont généralement dix fois inférieurs aux titres des IgG, variant entre 1/800 (figure 12) et 1/3200 (figure 13). La synthèse des IgA sériques est également stimulée par l'immunisation IM mais elle est considérablement plus faible que celle des autres isotypes. Après la période des immunisations mucosales (par capsules entériques, figure 12 et intravaginal, figure 13) on observe, dans la plupart des sérums, une augmentation graduelle des anticorps de tous les isotypes dont celle des IgA sériques qui est généralement plus élevée. L'immunisation intradermique qui a été effectuée environ 90 jours après l'IM stimule avec grande efficacité la synthèse des

immunoglobulines de tous les isotypes. Dans les protocoles IM-Caps-ID (figure 12) et IM-IVa-ID (figure 13), peu importe la voie d'immunisation mucoale, les titres des anticorps se situent à 1/1024000 en IgG et 1/51200 en IgA et IgM.

L'évolution des anticorps sériques a aussi été évaluée chez les lapins qui ont subi un protocole mucoal-IM-ID (figures 14, 15, 16, et 17). Suite aux immunisations mucoales, qui ont été échelonnées sur trois semaines (sauf exception l'IL qui a eu lieu une seule fois), on observe des titres très modestes des anticorps de tous les isotypes, atteignant 1/1600 en IgG, 1/800 en IgM et <1/50 en IgA. Il est cependant à remarquer qu'une prolongation d'une semaine des immunisations IVa (tableau VIII et figure 16) se traduit par à une hausse marquée des immunoglobulines allant jusqu'à 1/51200 en IgG, 1/3200 en IgM et 1/400 en IgA. L'immunisation IM qui a suivi les interventions mucoales a stimulé la synthèse des anticorps sériques surtout de type IgG et IgA. Dans les protocoles Oral-IM-ID (figure 14) et Caps-IM-ID (figure 15) les anticorps atteignent des niveaux comparables soit 1/6400, 1/1600 et 1/200, en IgG, IgM et IgA, respectivement. Le protocole IVa-IM-ID a été celui qui de loin a stimulé **le plus** efficacement le système immunitaire, où les titres des immunoglobulines **vont** jusqu'à 1/512000 en IgG et 1/12800 en IgM et IgA (figure 16). Enfin, l'immunisation intradermique, administrée entre 70 et 90 jours après l'immunisation initiale, a stimulé également une très forte production d'anticorps, surtout de type IgG et IgA. Dans les protocoles Oral-IM-ID (figure 14), Caps-IM-ID (figure 15), IVa-IM-ID (figure 16) et IL-IM-ID (figure 17), peu importe la voie d'immunisation mucoale, les titres des immunoglobulines, comme pour les protocoles IM-mucoal-ID (figures 12 et 13), se situent à 1/1024000 en IgG et 1/51200 en IgM et IgA.

5. EVALUATION DU POUVOIR NEUTRALISANT DES ANTICORPS

Après avoir évalué différents protocoles d'immunisation pour leur capacité à induire des anticorps spécifiques du VIH-1 chez les animaux, nous avons analysé le pouvoir neutralisants de ces derniers.

5.1 Test de neutralisation utilisant les cellules CEM

Nous avons d'abord effectué le test de neutralisation classique utilisant les cellules CEM sur des échantillons choisis de sérums, de larmes, d'homogénats intestinaux (tableau XII). Les sérums des lapins des protocoles IVa-IM-ID, IM-Caps-ID, IL-IM-ID ainsi que l'homogénat intestinal du protocole IVa-IM-ID qui ont été évalués correspondaient aux derniers prélèvements effectués dix jours après l'injection ID. Par contre, les larmes des lapins du protocole IM-Caps correspondaient aux prélèvements effectués suite aux immunisations par capsules entériques. Les résultats présentés dans le tableau XII indiquent que les anticorps se sont montrés capables de neutraliser l'infectivité du virus lorsque mis en présence d'environ 100 unités infectieuses du VIH-1. Dans les sérums d'animaux immunisés selon différents protocoles, on remarque que, parallèlement aux titres d'immunoglobulines très élevés évalués par ELISA, les titres neutralisants sont également importants soit 1/320 pour les protocoles IVa-IM-ID et IL-IM-ID et 1/80 pour le protocole IM-Caps-ID. Le sérum du lapin témoin n'a aucun pouvoir neutralisant (<1/20). Les larmes du protocole IM-Caps et l'homogénat intestinal du protocole IVa-IM se sont aussi montrés capables de neutraliser l'infectivité du VIH-1, les titre en neutralisation étant 1/80 et 1/160, respectivement.

5.2 Test de neutralisation utilisant les cellules HeLa-CD4-LTR-βgal

Le test d'infectivité utilisant les cellules HeLa-CD4-LTR-βgal est rapide, quantitatif et permet l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons. Ce test a été adapté dans notre étude pour évaluer le pouvoir neutralisant des anticorps spécifiques du VIH-1. Les cellules HeLa-CD4-LTR-βgal expriment la molécule CD4 à leur surface. De plus, le gène de la β-galactosidase (β-gal) qui est sous le contrôle des LTR du VIH-1 est intégré dans leur génome. Lorsque ces cellules sont infectées par le VIH, la protéine virale Tat qui est produite stimule en *trans* les LTR, qui entraîne la production de la β-galactosidase. La présence de cette protéine est révélée par la coloration des feuilletts cellulaires, où il y a apparition d'aggrégats de cellules bleues. Idéalement, l'échantillon, témoin virus, doit donner entre 50 et 100 aggrégats de cellules infectées par cupule. Nous avons titré, sur cette lignée cellulaire, le VIH de façon à déterminer la dose infectieuse optimale à utiliser. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau XIII. D'après ces résultats, il faut utiliser entre $1,0 \times 10^5$ à $2,0 \times 10^5$ DICT₅₀ pour se situer dans les conditions optimales, c'est à dire où l'on observe, en moyenne, 49 et 107 aggrégats cellulaires infectés, respectivement. Il est à noter que les quantités de virus infectieux utilisées dans ce test sont nettement supérieures aux quantités généralement utilisées pour le test de neutralisation classique, utilisant les CEM. Le tableau XIV représente l'évaluation de l'activité neutralisante des anticorps du sérum du protocole IVa-IM-ID (regroupant les sérums des lapins 9686-8, 9687-9 et 9648-10) en cellules HeLa-CD4-LTR-βgal, dont le titre en neutralisation sur CEM est 1/320. On ne remarque pas une différence significative dans la moyenne du nombre d'aggrégats cellulaires infectés entre le sérum témoin et celui du protocole IVa-IM-ID. Ceci montre que le sérum IVa-IM-ID n'est pas capable de neutraliser l'infectivité d'une charge virale de VIH aussi élevée que 10^5 particules infectieuses.

Ainsi, le test de neutralisation sur cellules HeLa-CD4-LTR- β gal ne semble pas adéquat pour évaluer le titre neutralisant des anticorps puisqu'il requiert, en moyenne, 1000 fois plus d'unités infectieuses que la méthode classique sur CEM. Bien que plus rapide, ce test étant moins sensible et moins spécifique que le test sur cellules CEM, nous avons du l'abandonné.

6.0 RESUME DES RESULTATS

En résumé, utilisant l'IMS-VIH-1 à titre de vaccin, plusieurs protocoles d'immunisations mucosales et parentérales ont été évalués dans leur pouvoir de stimuler la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1. Un protocole à une seule intervention parentérale, qu'elle soit par voie IM ou IP, induit une production d'anticorps sériques à titres très modestes et ne stimule pas l'immunité mucoale. Les protocoles à interventions mucosales (oral, IVa, IL et Caps) seulement se sont montrés capables de stimuler à la fois une réponse humorale et mucoale. Cette stimulation est dépendante de la durée et la fréquence des immunisations; notamment, chez la souris, les immunisations orales dont la fréquence est de trois fois par semaine et la durée de trois semaines, stimulent très vigoureusement la synthèse d'anticorps sériques et une réponse en IgA-S au niveau des muqueuses. Chez le lapin, parmi les différentes interventions mucosales évaluées, l'IVa et Caps stimulent le mieux la réponse immune. Lorsque les interventions mucosales et parentérales sont combinées, le système immunitaire est stimulé dans sa totalité. A l'exception du protocole IM-Caps, les protocoles où les immunisations mucosales précèdent l'intervention IM semblent être plus efficaces. Enfin, l'analyse de l'évolution des titres des immunoglobulines sériques, au cours des différents

protocoles, montre que peu importe la voie d'immunisation mucoale ou l'ordre dans lequel les interventions mucoales et IM sont administrées, l'immunisation intradermique stimule très vigoureusement le système immunitaire, les titres atteignant 1/1024000 en IgG et 1/51200 en IgM et IgA.

DISCUSSION

1. EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET HUMORALE ANTI-VIH SUITE A UNE INTERVENTION PARENTERALE

Dans la recherche d'un vaccin contre le VIH, plusieurs approches vaccinales expérimentales à interventions parentérales ont montré des résultats forts intéressants. Des immunisations intramusculaires de macaques avec du SIV atténué (Daniel *et al.*, 1992), ou du SIV inactivé (Carlson *et al.*, 1990; Cranage *et al.*, 1992a, 1992b; Desrosiers *et al.*, 1989; Murphey-Corb *et al.*, 1989; Putkonen *et al.*, 1992; Stott *et al.*, 1991b) ont protégé les animaux contre une épreuve virale avec du virus homologue et hétérologue (Cranage *et al.*, 1992a, 1992b; Murphey-Corb *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1992a; Putkonen *et al.*, 1992). Des résultats de protection, suite à des immunisations parentérales avec des préparations vaccinales ont également été rapportés dans le modèle chimpanzé/VIH (Fultz *et al.*, 1992; Girard *et al.*, 1991, 1992) et le modèle chat/FIV (Yamamoto *et al.*, 1991, 1993). Les éléments en communs dans toutes ces études ont été que l'antigène était des particules virales (atténuées ou inactivées), les immunisations avaient été administrées par voie IM et que l'épreuve virale avait été effectuée par voie parentérale. A la lumière de ces résultats, on ne peut nier l'importance des immunisations parentérales dans la stimulation de l'immunité systémique surtout pour les maladies dont le développement d'une virémie est une condition essentielle pour la dissémination virale dans les tissus systémiques susceptibles. Cependant, il faut reconnaître que le VIH est principalement transmis par contacts sexuels. Ainsi, lors d'une infection par le VIH, bien que la présence d'une immunité systémique soit importante, la présence d'une immunité locale semble être essentielle. En effet, les travaux de Marthas et Miller (1992) montrent que des macaques vaccinés par voie parentérale étaient protégés contre une épreuve intraveineuse, mais pas contre une épreuve

intravaginale. L'importance de l'immunité mucoale a été également rapportée par McDermott *et al.* (1990). Leur étude montre que le transfert intraveineux d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus herpes simplex de type 2 (HSV-2) protège les souris contre l'infection systémique mais pas contre une épreuve intravaginale. Par ailleurs, des immunisations intranasales de souris avec des protéoliposomes du virus de Sendai protègent tous les animaux d'une épreuve intranasale, tandis que seulement trois souris sur sept, immunisées par voie IM, sont protégées. Ces expériences soulignent que les interventions parentérales seules sont insuffisantes pour induire une protection contre les infections acquises par les muqueuses.

Dans le cadre de ce projet, nous avons évalué, entre autre, le pouvoir d'une intervention parentérale à stimuler l'immunité mucoale et humorale. On remarque qu'une seule immunisation parentérale, qu'elle soit par voie IM ou IP, stimule, chez la souris, une production d'anticorps sériques à des titres très modestes et ne stimule pas l'immunité locale (tableau I). Des résultats comparables ont été observés chez le lapin. Même après deux immunisations IM, malgré que les titres d'anticorps sériques soient élevés, les niveaux des immunoglobulines dans les différents compartiments mucoaux sont très faibles (figure 11). L'IgG est l'isotype principalement détecté, les titres se limitant à 1/64 dans la salive, 1/32 dans les sécrétions intestinales et 1/8 dans les sécrétions vaginales.

Les résultats obtenus chez la souris et le lapin concordent avec ceux des travaux rapportés dans la littérature et indiquent que les interventions parentérales seules sont inefficaces pour induire des anticorps à des niveaux acceptables dans les muqueuses. De plus, ces résultats mettent en évidence la compartimentation

de l'immunité mucoale et systémique et indiquent qu'elles sont gérées par des mécanismes distincts.

2. EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET HUMORALE ANTI-VIH SUITE A DES INTERVENTIONS MUCOSALES

La barrière immunitaire au niveau des muqueuses joue un rôle de défense primordial contre les agents pathogènes rencontrés en ces lieux (Mazanec *et al.*, 1987; Michetti *et al.*, 1992; Renegar et Small, 1991a, 1991b; Steffen et Ebersole, 1992; Weltzin *et al.*, 1989; Winner *et al.*, 1991). L'importance éminente de cette barrière doit être particulièrement soulignée dans le cas du VIH, un virus principalement transmis par les contacts sexuels. Etant donné que l'immunité mucoale n'est pas généralement induite par des protocoles d'immunisation conventionnels, nous avons analysé les différents modes d'induction d'une immunité spécifique au niveau des muqueuses.

Les stratégies d'immunisation que nous avons évaluées ont été la voie orale, par la sensibilisation des muqueuses buccales, la voie intravaginale et la voie intraluminale directe, par laparotomie, ou indirecte, par capsules entériques. Ces interventions étaient destinées à sensibiliser le site de contact initial du VIH que sont, principalement, les muqueuses génitales ou à sensibiliser les sites majeurs d'induction d'une immunité mucoale que sont les plaques de Peyer au niveau de l'intestin. La capacité de ces interventions de stimuler la synthèse d'anticorps dans les sites effecteurs lointains a aussi été évaluée, étant donné que l'immunité mucoale est liée par le cycle migratoire de cellules immunocompétentes.

Chez la souris, en plus de la voie d'immunisation, nous avons évalué l'effet de la fréquence et de la durée des interventions mucosales. Les résultats des séries d'immunisations orales (tableau II et III) suggèrent qu'il existe une relation directement proportionnelle entre la durée, d'une part, et la fréquence des immunisations orales, et la production d'anticorps sériques et salivaires d'autre part. En effet, lorsque la fréquence et la durée des immunisations augmentent, la production d'anticorps spécifiques du VIH augmentent en parallèle. Ce phénomène peut être expliqué par l'augmentation du peuplement en lymphocytes des muqueuses (les sites effecteurs) induit par l'augmentation de la stimulation des sites inductifs, en l'occurrence la muqueuse buccale et possiblement la muqueuse intestinale (si l'IMS-VIH réussit à se rendre à ce niveau lorsqu'il est administré en solution). De plus, la prolongation de la durée des immunisations orales permet aux cellules sensibilisées par l'antigène de compléter leur cycle migratoire. Dans la majorité des études rapportées par Mestecky et McGhee (1987), avec d'autres types d'antigènes, les immunisations mucosales stimulent la synthèse d'anticorps au niveau des muqueuses mais pas dans le sérum. Dans notre cas, les immunisations orales (l'IMS-VIH-1 en solution) chez la souris stimulent vigoureusement, non seulement l'immunité mucale mais aussi l'immunité humorale. Notamment, les titres sériques en IgG+IgM atteignent 1/20480 chez les souris qui ont reçu trois immunisations orales par semaine durant trois semaines. Ces résultats montrent qu'il existe une relation entre le MALT et l'immunité systémique. Ainsi la compartimentation apparente entre l'immunité mucale et systémique pourrait ne pas être aussi rigoureuse que l'on croit.

Contrairement aux résultats obtenus chez la souris, les immunisations mucosales seules avec l'antigène en solution (trois fois par semaine durant trois

semaines) chez le lapin, ne stimulent pas ou très faiblement la synthèse d'immunoglobulines au niveau des muqueuses (tableau VII). Cette faible stimulation peut être expliquée par la faible dose antigénique utilisée lors des immunisations qui serait insuffisante pour sensibiliser les muqueuses. La dégradation de l'antigène ainsi que l'inefficacité de celui-ci à se rendre aux sites inductifs pourraient être d'autres raisons qui puissent expliquer la faible réponse immunitaire mucosale. Par ailleurs, ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les prélèvements ont été effectués à un temps précoce. En effet, les prélèvements des échantillons, suites aux immunisations mucosales, ont été effectués deux jours après la dernière intervention (à l'exception du protocole IL où les prélèvements ont été effectués après deux semaines) il se peut que ceux-ci aient été effectués avant que le cycle migratoire des lymphocytes soit achevé. Cette hypothèse pourrait expliquer le fait qu'une prolongation d'une semaine des immunisations intravaginales a donné des titres considérablement élevés dans les différents compartiments mucosaux (tableau VIII). Une cinétique de production d'immunoglobulines sériques et dans les sécrétions mucosales devrait être effectuée pour être en mesure d'établir le temps post-immunisation où les titres des anticorps sont à un niveau maximal.

La présence d'anticorps dans les échantillons de larme des lapins des protocoles IL et Caps (tableau VII) sans que ces muqueuses aient été en contact direct avec l'antigène met en évidence le cycle migratoire des lymphocytes depuis les sites inductifs qui sont, dans ce cas, les PP jusqu'aux sites effecteurs. Sur le plan immunologique, suite à l'immunisation intraluminaire directe (IL) ou indirecte (Caps), les IMS-VIH, libérés dans la lumière intestinale, sont captés par les cellules M. Celles-ci, qui sont nombreuses au niveau de l'épithélium qui recouvre le dome

des PP, livrent l'antigène sans le dégrader au tissu lymphoïde sous-jacent, où a lieu l'induction de la réponse immune. Une fois sensibilisées, les cellules B et T quittent ce site inductif par les vaisseaux lymphatiques afférents et gagnent les ganglions lymphatiques dans lesquels a lieu la maturation cellulaire. Par la suite ces cellules gagnent la circulation systémique et vont coloniser les sites effecteurs. A ces lieux, l'expansion clonale des lymphocytes B conduit à la production et la sécrétion d'immunoglobulines.

Parmi la grande variété d'échantillons qui ont pu être prélevés et analysés, les larmes ont servi comme le meilleur indicateur de l'immunité mucoale. Une raison qui peut expliquer cette observation est que ces sécrétions ont été les seules dont l'évaluation n'a pas nécessité une dilution. A cet égard, les échantillons de salive ont été dilués avant d'être analysés. La salivation, stimulée par l'injection d'un parasymphaticomimétique, fait appel au liquide extracellulaire. Ce phénomène dilue les anticorps qui peuvent être présents dans la salive. De plus, étant donné que la salive est très visqueuse, elle ne peut être analysée sans être diluée. Ce deuxième facteur de dilution réduit le titre des anticorps. Par ailleurs, les sécrétions intestinales chez le lapin sont le résultat d'un gavage d'une solution de PEG suivi d'une injection IP de pilocarpine. Cette procédure conduit à l'évacuation partielle des matières fécales présentes dans le gros intestin, où on ne détecte pas généralement des titres d'anticorps élevés. Etant donné que la sécrétion d'immunoglobulines dans la lumière intestinale a lieu, en grande partie, au niveau de l'épithélium intestinal de l'intestin grêle, les titres des anticorps évalués dans les sécrétions intestinales recueillies ne représentent pas nécessairement l'immunité mucoale au niveau de la lumière intestinale. Enfin, au niveau des sécrétions vaginales nous avons été surpris d'obtenir des faibles titres

d'anticorps spécifiques du VIH-1, particulièrement chez les lapins qui avaient été immunisés par cette voie (tableaux IX). La dilution des sécrétions vaginales qui a eu lieu pendant le lavage vaginal et, par la suite, lors de son traitement, peut expliquer ces résultats.

3. EVALUATION DE L'IMMUNITE MUCOSALE ET HUMORALE ANTI-VIH SUITE A DES PROTOCOLES A INTERVENTIONS MIXTES

Les protocoles d'immunisation mucosal-parentéral et parentéral-mucosal ont été destinés à stimuler le système immunitaire dans sa totalité et à déterminer s'il valait mieux commencer par l'une ou l'autre des interventions. En effet, les résultats obtenus chez la souris (tableaux V et VI) et le lapin (tableaux IX et X) montrent que ces combinaisons d'interventions stimulent très vigoureusement la synthèse d'anticorps tant dans le sérum qu'au niveau des muqueuses. Cependant, on remarque que l'ordre dans lequel les immunisations mucosales et parentérales sont administrées dans un protocole donné a une importance quant au degré de stimulation du système immunitaire. Chez la souris, on observe que, lorsque les immunisations orales précèdent l'IM (Oral-IM), les titres d'anticorps spécifiques du VIH dans la salive, l'homogénat intestinal et le sérum sont nettement supérieurs à ceux des protocoles inversés (IM-Oral, tableaux V et VI). De même, chez le lapin, lorsque l'on compare les protocoles IVa-IM et IM-IVa, les titres d'anticorps spécifiques du VIH dans le sérum et les différents compartiments mucosaux sont plus élevés quand les immunisations IVa précèdent l'intervention IM (tableau IX). Ces observations, qui indiquent que le système immunitaire semble être mieux stimulé lorsque les immunisations mucosales précèdent l'intervention parentérale, sont contrées par les résultats des immunisations Caps-IM et IM-Caps chez le lapin

(tableau X). Dans cette série d'immunisations, le protocole où l'intervention IM précède les immunisations mucosales (IM-Caps) semble stimuler plus fortement le système immunitaire. Ceci est démontré par les titres d'immunoglobulines très élevés dans la salive, les larmes, les sécrétions intestinales et le sérum des lapins ayant subi le protocole IM-Caps. La plus faible réponse immunitaire des lapins du protocole Caps-IM peut être expliquée par les difficultés que nous avons initialement rencontrées lors de l'administration des capsules entériques, étant donné que l'on ne pouvait pas s'assurer que les lapins ne croquaient pas les capsules avant de les avaler. Nous avons anticipé d'obtenir une meilleure stimulation de l'immunité mucosale et humorale avec le protocole Caps-IM, étant donné que la présentation de l'antigène se faisait au niveau des PP. Compte tenu des difficultés que nous avons rencontrées lors de l'administration des capsules, ce protocole sera réévalué.

Bien que l'on observe une différence quant au degré de stimulation du système immunitaire, en fonction de l'ordre dans lequel les immunisations mucosales et parentérales ont été administrées, nos résultats ne nous permettent pas d'établir si cette différence est significative; d'une part à cause du nombre limité d'animaux que nous avons utilisé et d'autre part parce que les prélèvements dans les protocoles IM-mucosal ont été effectués deux jours après la dernière immunisation comparés aux protocoles mucosal-IM où les prélèvements ont eu lieu dix jours après l'IM. Ce délai de deux jours pourrait être insuffisant pour le développement de la réponse immune (particulièrement de type mucosal) ce qui expliquerait la disparité qui existe entre les protocoles inversés. Pour valider ces résultats, il faudrait faire une cinétique de production d'anticorps (sériques et au niveau des muqueuses) suite à un protocole d'immunisations mucosales. Ces

résultats nous indiqueront à quel moment après la dernière intervention mucosale on obtient une production maximale d'anticorps et ainsi dicteront quand effectuer les prélèvements. Ceci nous permettra, également, de confirmer que le système immunitaire est sensibilisé plus efficacement lorsque les immunisations mucosales précèdent l'intervention IM.

Lorsque les différents protocoles d'immunisation mucosal-IM sont comparés (tableau XI) quant à leur efficacité de stimuler le système immunitaire, le protocole qui surpasse tous les autres est: IVa-IM. Les titres des anticorps surtout de type IgG, dans les sécrétions mucosales des lapins qui ont subi ce protocole se montrent considérables, atteignant 1/256 dans la salive, 1/3200 dans les larmes, 1/1024 dans les sécrétions intestinales et 1/16 dans les sécrétions vaginales. Au niveau du sérum, on obtient également des titres forts intéressants, allant jusqu'à 1/25600 en IgA, 1/51200 en IgM et 1/521000 en IgG. Il est à remarquer que les titres des anticorps sériques des lapins du protocole IVa-IM sont plus élevés comparativement au lapin qui a reçu trois immunisations IM (figure 11). Ces résultats soulignent l'importance des immunisations mucosales dans leur pouvoir de sensibiliser le système immunitaire, non seulement au niveau des muqueuses, mais aussi au niveau systémique.

Ce qui distingue les différents protocoles d'immunisation mucosal-parentéral, dont les titres des anticorps sont présentés au tableau XI, est la voie d'immunisation mucosale. Etant donné que tous les autres paramètres (tels que l'intervention IM ainsi que le temps auquel ont été effectués les prélèvements) ont été gardés constants, les différences que l'on observe au niveau des titres des anticorps dans le sérum et les différents compartiments mucosaux sont la conséquence des immunisations mucosales. Ces résultats soulignent l'importance

des interventions mucosales dans leur efficacité de stimuler le système immunitaire. En ordre décroissant d'efficacité ces protocoles peuvent être classés comme suit: IVa-IM, IL-IM, Oral-IM et Caps-IM.

Peu d'études décrivent les caractéristiques morphologiques qui pourraient expliquer l'immunité mucosale au niveau du tractus génital féminin. Des cellules T, des lymphocytes B, des macrophages et des cellules de Langerhans ont été identifiées dans le vagin de souris (Parr *et al.*,1991), de macaques (Miller *et al.*, 1992a) et de femmes (Edwards et Morris, 1985; Kutteh *et al.*, 1988; Morris *et al.*,1983). En ces lieux, la voie inductible de l'immunité mucosale pourrait être effectuée par les cellules de Langerhans. Ces cellules présentatrices d'antigènes, nombreuses dans les muqueuses vaginales et endocervicales, pourraient échantillonner les antigènes au niveau des muqueuses génitales, migrer aux ganglions lymphatiques génitaux, présenter l'antigène aux lymphocytes et initier une réponse immune. Ceci couplé à une immunisation parentérale produit des titres d'anticorps très élevés dans le sérum et les compartiments mucosaux.

La haute performance du protocole IL-IM, malgré qu'une seule intervention mucosale ait été effectuée, montre le potentiel et l'importance de stimuler le système immunitaire en sensibilisant les plaques de Peyer. Puisque l'IL a été utilisée comme modèle des immunisations orales par capsules entériques, les résultats du protocole IL-IM devraient, en théorie, être comparables à ceux du protocole Caps-IM. Les difficultés rencontrées lors de l'administration des capsules entériques prises en considération, le protocole Caps-IM doit être réévalué.

Lorsque l'on compare les protocoles d'immunisation, dont la première intervention a été de type parentérale (IM), on remarque qu'à l'exception des niveaux des IgA salivaires qui sont plus élevés dans le protocole IM-IVa (1/64, tableau IX) comparé à un titre de 1/4 pour les animaux du protocole IM-Caps (tableau X), la synthèse d'immunoglobulines spécifiques du VIH-1, surtout d'isotype IgG, au niveau des muqueuses est plus fortement stimulée par le protocole IM-Caps. En effet, les titres en IgG atteignent 1/2500 dans les larmes et 1/128 dans la salive et les sécrétions intestinales des lapins du protocole IM-Caps, mais vont jusqu'à 1/64 dans la salive et 1/40 dans les larmes des lapins du protocole IM-IVa. Bien que les titres des anticorps des différents isotypes au niveau du sérum soient équivalents pour les protocoles IM-Caps et IM-IVa, la meilleure stimulation de l'immunité mucoale suite au protocole IM-Caps pourrait être expliquée par le fait que lors des immunisations par capsules entériques, le site inductif principal de l'immunité mucoale a été sensibilisé.

Suite à tous les protocoles à interventions mixtes, la présence de titres d'anticorps considérablement élevés, particulièrement au niveau des larmes, sans que les muqueuses aient été en contact direct avec l'antigène, met en évidence le fait que le système immunitaire mucoal est lié par la migration des cellules immunocompétentes depuis les sites inductifs jusqu'aux sites effecteurs. Cependant, étant donné que les titres des immunoglobulines surtout de type IgG sont très élevés dans les sécrétions mucoales et corrént avec les haut niveaux d'IgG dans le sérum de ces mêmes animaux (tableau IX à XI et figures 6 à 10) il se peut que leur présence soit aussi le résultat de la transudation passive depuis le sérum. Nos résultats ne nous permettent pas d'identifier lequel de ces deux mécanismes prévaut.

L'analyse de l'évolution des titres des immunoglobulines sériques au cours des différents protocoles d'immunisation, nous a permis d'évaluer l'effet de chaque type d'intervention sur la synthèse des anticorps sériques. Chez le lapin, les immunisations mucosales seules, échelonnées sur une période de trois semaines, ne stimulent que faiblement la synthèse d'anticorps sériques (tableau VII). La prolongation d'une semaine des immunisations intravaginales (tableau VIII et figure 16) se traduit par une hausse marquée des anticorps sériques, les titres atteignant 1/51200 en IgG, 1/3200 en IgM et 1/400 en IgA. Cette forte stimulation de la synthèse d'anticorps sériques suite à des immunisations mucosales uniquement, qui est aussi observée dans le modèle souris (tableau II et III), souligne le rôle primordial du système immunitaire associé aux muqueuses, non seulement dans les réponses immunes locales mais aussi au niveau systémique. Cette capacité que semble avoir le MALT à sensibiliser l'immunité systémique pourrait expliquer l'observation, à savoir que la synthèse d'anticorps sériques est plus vigoureusement stimulée lorsque, dans un protocole donné à interventions mixtes, les immunisations mucosales précèdent l'IM. L'avantage de combiner à un régime d'immunisation parentérale des interventions mucosales serait double: ceci induirait une immunité au niveau des muqueuses et augmenterait l'immunité systémique. Par ailleurs, dans les différents protocoles qui ont été étudiés on remarque que l'injection intradermique augmente considérablement les titres des anticorps sériques de tous les isotypes. Au niveau cellulaire ceci peut être expliqué par le fait que la peau possède un grand nombre de cellules dendritiques et des cellules de Langerhans. Celles-ci sont des cellules présentatrices d'antigène qui initient des réponses immunitaires. L'intervention intradermique sensibilise les organes lymphoïdes annexés à la peau (SALT) qui est une composante du système

immunitaire mucosal. Ce type d'intervention devrait être sérieusement considérée dans l'établissement de protocoles d'immunisations contre le VIH.

4. EVALUATION DU POUVOIR NEUTRALISANT DES ANTICORPS

La production d'immunoglobulines capables de neutraliser l'infectivité d'un agent pathogène représente une arme importante de défense de l'organisme. A cet effet, dans le cadre de nos expériences, nous avons analysé le pouvoir neutralisant des anticorps dont la synthèse a été vigoureusement stimulée suite à des immunisations mucosales et parentérales.

Selon le test de neutralisation classique sur cellules CEM (tableau XII), les anticorps, dans les échantillons de sérum, de larmes et d'homogénat intestinal, se sont montrés capables de neutraliser l'infectivité du VIH-1 lorsque mis en présence d'environ 100 unités infectieuses de virus. Notamment, les titres neutralisants au niveau du sérum des lapins des protocoles IVa-IM-ID et IL-IM-ID atteignent 1/320. Des anticorps neutralisants sont également détectés au niveau des larmes (1/80) et dans l'homogénat intestinal (1/160) des lapins des protocoles IM-Caps et IVa-IM-ID, respectivement.

Le test de neutralisation utilisant les cellules HeLa-CD4-LTR- β gal s'est avéré moins sensible que le test de neutralisation classique. Il faut utiliser entre $1,0 \times 10^5$ à $2,0 \times 10^5$ DICT₅₀ pour être dans les conditions optimales du test, c'est à dire où l'on observe, en moyenne, 49 et 107 agrégats de cellules infectées (tableau XIII). Le sérum du protocole IVa-IM-ID, dont le titre neutralisant sur CEM est 1/320, n'est pas capable de neutraliser l'infectivité d'une charge virale aussi élevée que 10^5

particules infectieuses (tableau XIV). Ainsi, bien que le test de neutralisation utilisant les cellules HeLa-CD4-LTR- β gal soit rapide, quantitatif et permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons à la fois, il ne semble pas adéquat pour évaluer le titre neutralisant des anticorps puisqu'il requiert, en moyenne 1000 fois plus de virus infectieux que la méthode classique sur CEM.

CONCLUSION

Etant donné que le VIH est principalement transmis par les contacts sexuels et vue la pertinence de l'immunité mucoale dans les maladies transmises par cette voie, nous avons évalué dans le cadre de ce projet différents paramètres quant à leur capacité de stimuler à la fois une immunité mucoale et humorale contre le VIH *in vivo*, utilisant à titre de vaccin expérimental l'immunosome -VIH. Chez la souris et le lapin, les immunisations parentérales, par voie intramusculaire ou intrapéritonéale, bien qu'elles stimulent la synthèse d'anticorps sériques, sont inefficaces pour induire des anticorps au niveau des muqueuses. Par contre, les protocoles à interventions mucoales seulement (oral, intravaginal, intraluminal et par capsules entériques) se sont montrés capables de stimuler à la fois l'immunité mucoale et systémique. Cette stimulation semble être dépendante de la fréquence et la durée des immunisations. En effet chez la souris, sur une période de trois semaines, le protocole le plus efficace est celui dont les immunisations ont été effectuées trois fois par semaine. De même chez le lapin, les immunisations intravaginales administrées trois fois par semaine stimulent une plus forte réponse immune lorsqu'elles sont échelonnées sur une période de quatre semaines comparativement à une, deux ou trois semaines. Parmi les différentes voies mucoales d'immunisation qui ont été évaluées, les immunisations intravaginales stimulent le plus efficacement le système immunitaire suivi par ordre décroissant des interventions par capsules entériques, intraluminal et orale; les deux dernières étant équivalentes. Suite aux immunisations mucoales, les titres des anticorps spécifiques du VIH, surtout au niveau du sérum, montrent que les relations qui existent entre les divers systèmes lymphoïdes associés aux muqueuses et l'immunité systémique sont plus étroites qu'on le croyait.

Lorsque les immunisations mucoales sont combinées à une intervention parentérale (IM) le système immunitaire est très fortement stimulé. En général, les protocoles dont les interventions mucoales précèdent l'IM semblent être plus efficaces à cet effet. Par ordre décroissant d'efficacité les protocoles mucoale-IM sont classés comme suit: IVa-IM, IL-IM, Oral-IM et Caps-IM. Le protocole IVa-IM est particulièrement intéressant étant donné que nous avons voulu sensibiliser les muqueuses génitales qui sont le site de contact principal du VIH.

Par ailleurs, l'efficacité du protocole IL-IM, malgré qu'une seule intervention mucoale ait été effectuée, montre l'importance et le potentiel de stimuler le système immunitaire en sensibilisant les plaques de Peyer. L'immunisation intraluminale par laparotomie a été évaluée comme modèle des immunisations par capsules entériques. Ces deux interventions étaient destinées à sensibiliser les sites majeurs d'induction d'une immunité mucoale que sont les PP. Compte tenu de l'efficacité du protocole IL-IM, l'administration des capsules entériques devrait être considérée comme voie d'immunisation. L'avantage qu'ont les capsules entériques est que l'antigène est protégé du milieu acide de l'estomac et des enzymes protéolytiques, mais est libéré au niveau de l'intestin grêle dans lequel sont localisées les nombreuses PP. Cet avantage, couplé aux avantages pratiques et économiques associés à la distribution et l'administration de médicaments par cette voie, font des capsules entériques un mode d'immunisation oral fort intéressant.

L'augmentation considérable des titres des anticorps sériques de tous les isotypes suite à une immunisation intradermique montre la nécessité de sérieusement considérer ce type d'intervention dans l'établissement de protocoles d'immunisation contre le VIH. Sur le plan immunologique il faut souligner que

l'ID sensibilise le SALT (les organes lymphoïdes annexés à la peau) qui est une composante du système immunitaire mucosal (MALT).

La présence d'anticorps spécifiques du VIH dans les larmes et la salive, dans les protocoles où les muqueuses que baignent ces sécrétions n'avaient pas été en contact direct avec l'antigène met en évidence le cycle migratoire des précurseurs de lymphocytes B depuis les sites inductibles aux sites effecteurs éloignés. Bien entendu, la transudation passive des anticorps depuis le sérum aux diverses sécrétions mucosales ne peut être exclue, cependant, nos résultats ne nous permettent pas de déterminer lequel des deux mécanismes prévaut en ce qui concerne les IgG.

Le test de neutralisation classique sur cellules CEM nous a permis de mettre en évidence la présence d'anticorps neutralisants dans les échantillons de protocoles choisis. Un test parallèle sur cellules HeLa-CD4-LTR- β gal, que nous avons adapté à partir d'un test d'infectivité, s'est avéré peu sensible et inefficace puisqu'il nécessitait, en moyenne, 1000 fois plus de particules infectieuses que le test de neutralisation classique.

Ce projet nous a permis de définir les protocoles à entreprendre chez le macaque, que nous utilisons comme modèle animal pour évaluer le pouvoir protecteur de l'immunosome à titre de vaccin contre le SIV.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr. Lise Thibodeau pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir confié ce projet de recherche très intéressant. Ses conseils judicieux, son encouragement, sa patience et sa disponibilité ont été précieux tout le long de ce projet. Son appui et son enthousiasme dans la réalisation de ce projet ont fait que le temps a passé très vite.

Mes remerciements s'adressent à Céline Tremblay et Lise Constantineau, les techniciennes de laboratoire, ainsi qu'à Claude Lavallée. Je suis particulièrement redevable à Céline pour son travail méticuleux, sa bonne volonté et le temps et effort qu'elle a consacrés dans ce projet de recherche.

Je remercie le Dr. J.P. Descoteaux pour avoir apporté son expertise dans les interventions *in vivo*, effectuées chez le lapin et la souris, et Jim Gourdon pour ses conseils et les chirurgies qu'il a effectuées. L'aide technique de Michel Boivin, Odette Sansfaçon et l'équipe de l'animalerie a été également grandement appréciée.

Je suis reconnaissante à tout le personnel de l'Institut, particulièrement au centre de recherche en virologie pour avoir accepté ma candidature au programme de maîtrise.

Je veux remercier Jean Pellerin et Monique Leduc du service de l'informatique et le personnel de la bibliothèque pour leur aide et conseils. Mes remerciements vont également à André Levac, de l'audio-visuel, et Ginette Larose, des arts graphiques, pour leur travail impeccable et leur service "express". De

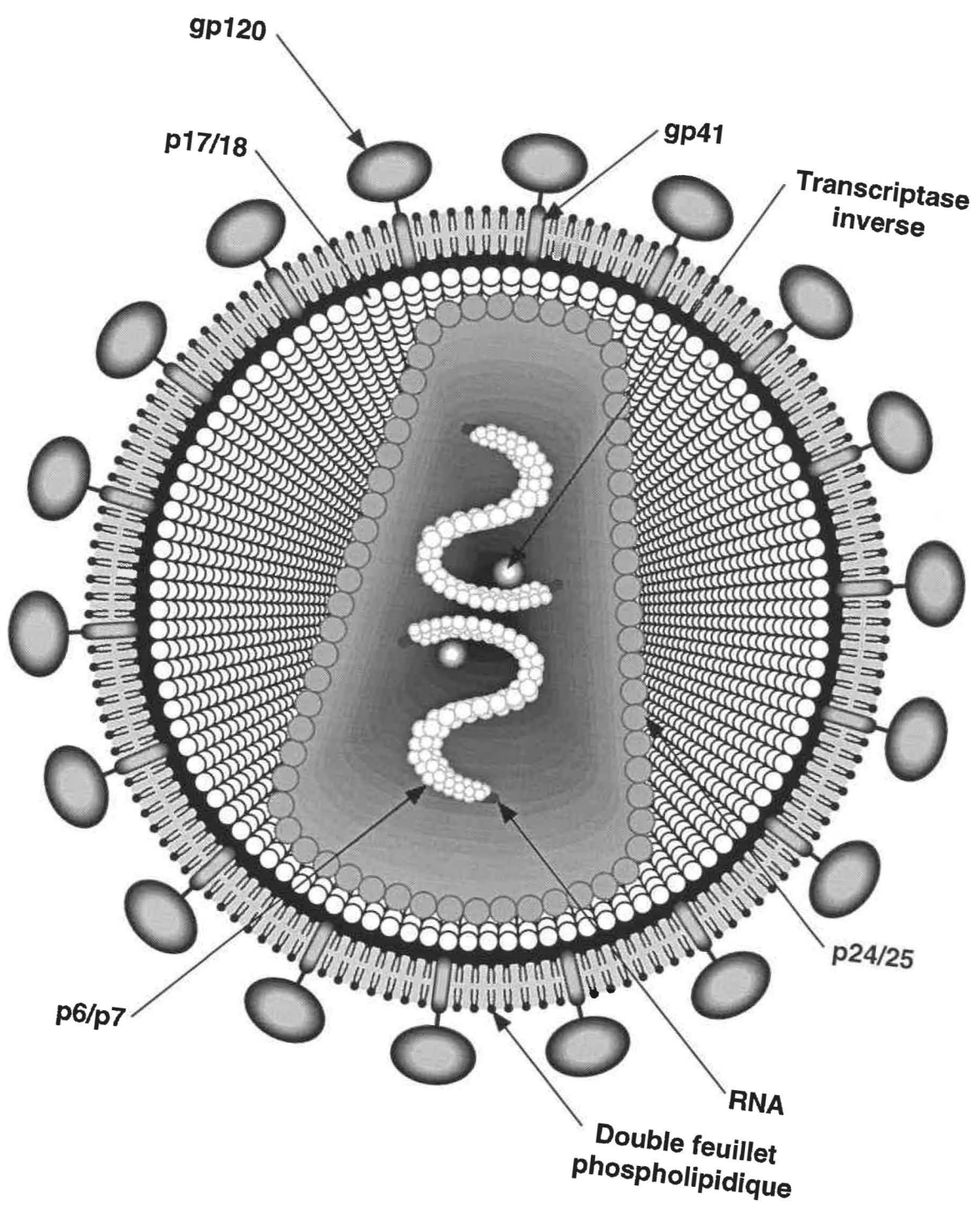
même, un gros merci à Marie Potiers pour avoir dactylographié la revue bibliographique et la bibliographie de ce document.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à mes parents et mon petit frère pour leur amour, leurs encouragements, leur patience et les innombrables sacrifices qu'ils ont faits pour me permettre de poursuivre mes études. A mes grands-parents, merci pour leur conseils et les délicieuses tasses de café qu'ils m'ont préparées pendant mes soirées d'études et d'écriture.

FIGURES

Figure 1: Représentation schématique du VIH

Une représentation schématique d'une coupe transversale du VIH laisse voir le génome viral, constitué de 2 RNA monocaténaire, intimement lié aux polypeptides p6/p7 et à une enzyme, la transcriptase inverse. La protéine structurale p24/25 forme la capsid, une structure qui protège l'information génétique du viron. La matrice que forme la p17/18 tapisse la surface sous-jacente de l'enveloppe virale. Cette dernière porte des spicules glycoprotéiques qui sont constituées de gp120 liées aux gp41 qui sont ancrées dans l'enveloppe virale par leurs portions hydrophobes.



gp120

p17/18

gp41

Transcriptase
inverse

p24/25

p6/p7

RNA
Double feuillet
phospholipidique

Figure 2: Organisation génomique du VIH-1

L'organisation du DNA proviral montre trois gènes structuraux essentiels, qui sont, à partir de l'extrémité 5' *gag*, *pol* et *env*. Ces gènes définissent la morphologie des virions matures et sont communs à tous les rétrovirus. En outre, les gènes *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* sont associés à une fonction de régulation ou un rôle dans l'infectivité. Les extrémités génomiques sont bordées par des séquences répétitives (LTR) porteuses d'éléments qui répondent aux produits des gènes *tat* et *rev*.

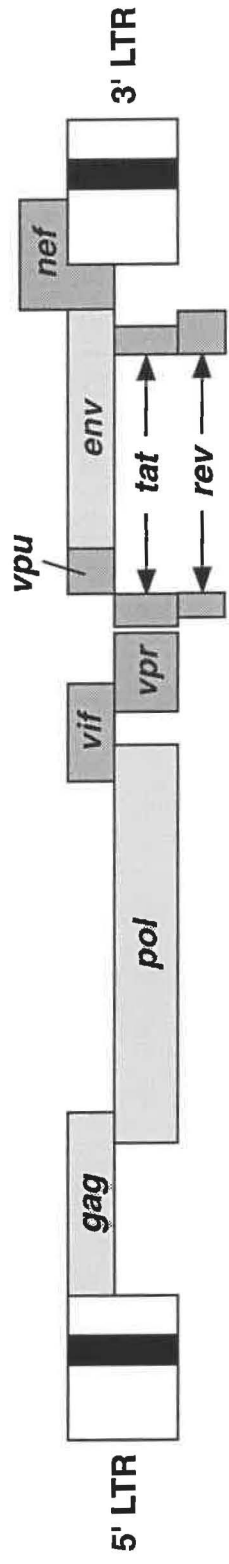


Figure 3: Le système immunitaire mucosal

Une représentation schématique du système immunitaire mucosal montre deux sites principaux: les sites inductifs et les sites effecteurs. Les sites inductifs situés dans les divers tissus lymphoïdes associés aux muqueuses sont des sources de précurseurs cellulaires capables de subir une stimulation directe par l'antigène. Une fois sensibilisés par l'antigène les lymphocytes T et B quittent les sites inductifs par les vaisseaux lymphatiques afférents et gagnent les ganglions lymphatiques mésentériques, où a lieu la maturation des cellules. Celles-ci gagnent, par la suite, la circulation systémique et vont coloniser les sites effecteurs. Sous l'influence antigénique, il y a expansion clonale des cellules; pour les lymphocytes B ceci se traduit par la production et sécrétion d'immunoglobulines. Ainsi, le système mucosal commun est lié par le cycle de migration des lymphocytes B et T qui est indispensable au peuplement des sites effecteurs en cellules lymphoïdes matures.

Adapté de Miller *et al.*, 1992b

Le système immunitaire mucosal

Sites inductifs

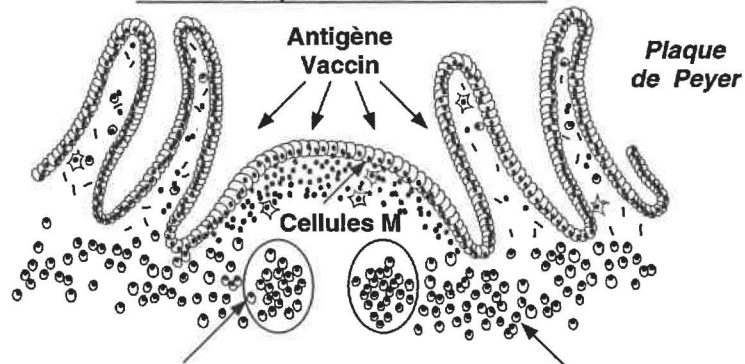
BALT
GALT
SALT
Lymphocytes B CD5⁺ (péritonéaux)

Sites effecteurs

Lamina propria
Tractus gastro-intestinal
Voies respiratoires
Tractus urogénital

Glandes
Mammaires
Salivaires
Lacrymales
Sudorifiques (?)

Caractéristiques des sites inductifs



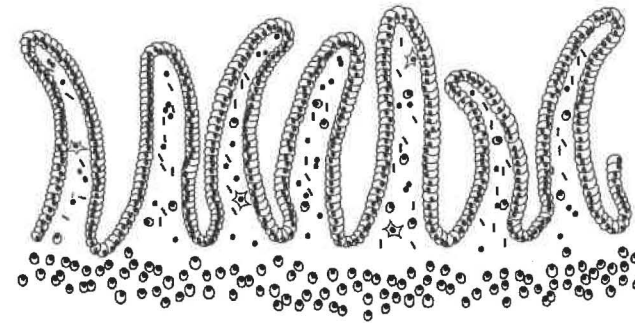
Zone de lymphocytes B (40-45%)

Lymphocytes B sIgA⁺ 5-8%
Lymphoblastes 40%
Resting 60%

Zone de lymphocytes T (35-40%)

Lymphocytes T CD4⁺ 50-60%
Lymphocytes T CD8⁺ 25-30%
Lymphocytes T CD4-CD8⁻ 5%

Caractéristiques des sites effecteurs



Lamina propria

Lymphocytes T 40-60%
Lymphocytes B et plasmocytes 20-40%
Macrophages 10%

Lymphocytes intraépithéliaux

Lymphocytes T CD8⁺ >75%
Lymphocytes α/β TCR⁺ 45%
Lymphocytes γ/δ TCR⁺ 55%

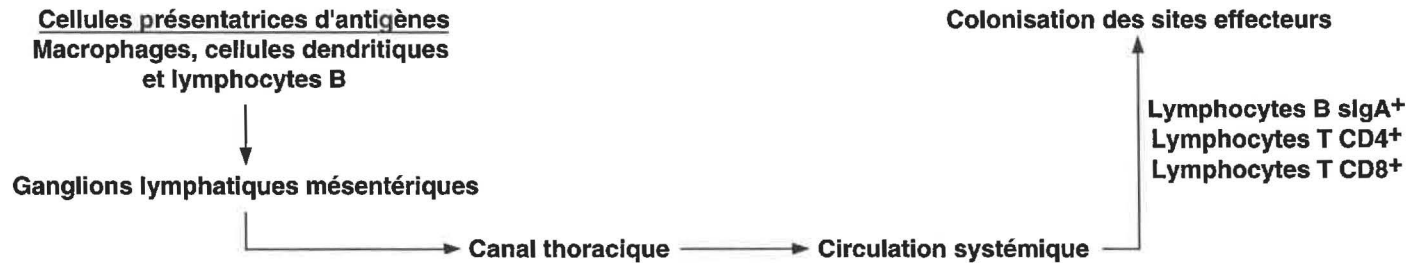


Figure 4: Profil électrophorétique des glycoprotéines virales purifiées et des immunosomes VIH

A partir de surnageants concentrés de cellules CEM infectées au VIH, les glycoprotéines ont été purifiées par ultracentrifugation en gradients de saccharose 60 à 8%. Celles-ci ont alors été ancrées à la surface de vésicules phospholipidiques préformées (liposomes) pour former des immunosomes VIH (IMS-VIH).

Les glycoprotéines purifiées sont représentées dans les puits 2 et 3 et les IMS-VIH dans les puits 4 et 5. La concentration protéique, déterminée par la méthode de Bio-Rad est de 1,7 mg/mL pour les glycoprotéines et 0,7 mg/mL pour les IMS-VIH. Les puits 2, 3, 4 et 5 contiennent, respectivement 25, 20, 50 et 25 μ L de l'échantillon. Le puit 1 correspond aux marqueurs de référence dont les masses moléculaires relatives sont les suivantes: myosine 200 000, β -galactosidase 116 000, phosphorylase b 97 000, albumine sérique bovine 68 000 et ovalbumine 43 000.

L'électrophorèse a été effectuée sur un gel de polyacrylamide 8% en milieu dénaturant (SDS) et réducteur. Le gel a été par la suite coloré au nitrate d'argent.

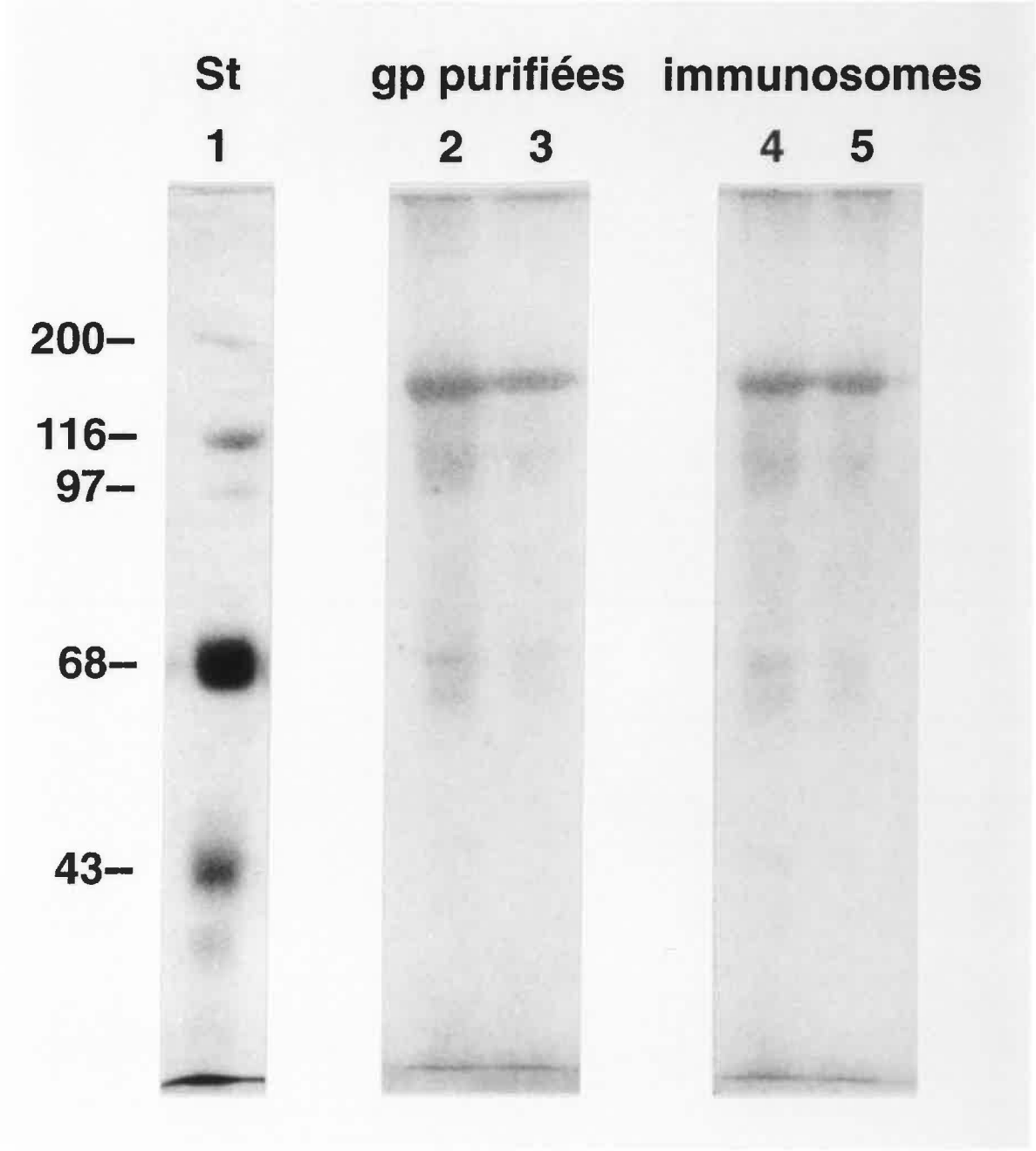
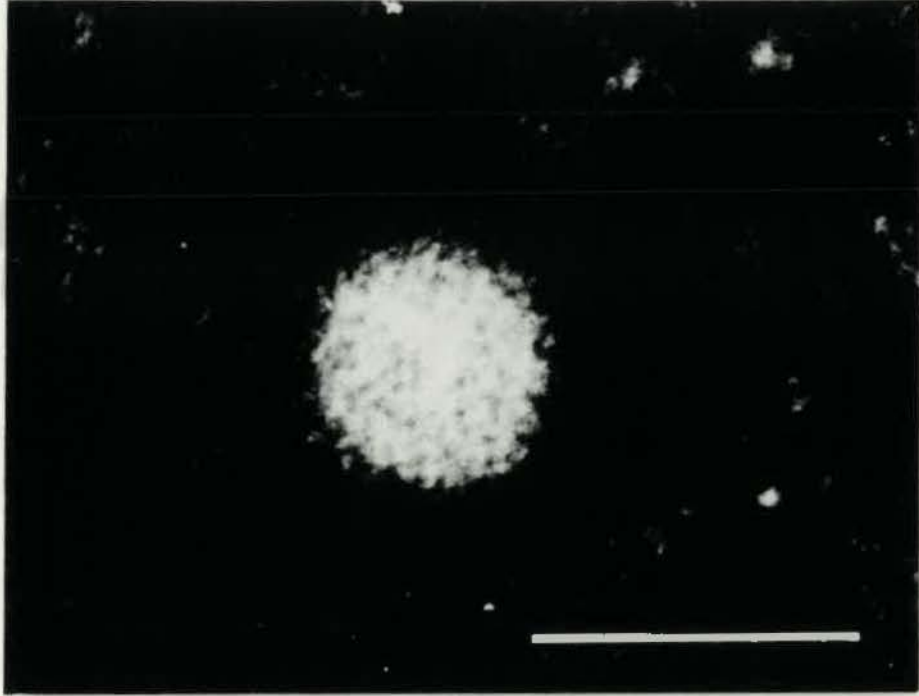


Figure 5: Morphologie de l'immunosome VIH-1 et du VIH-1

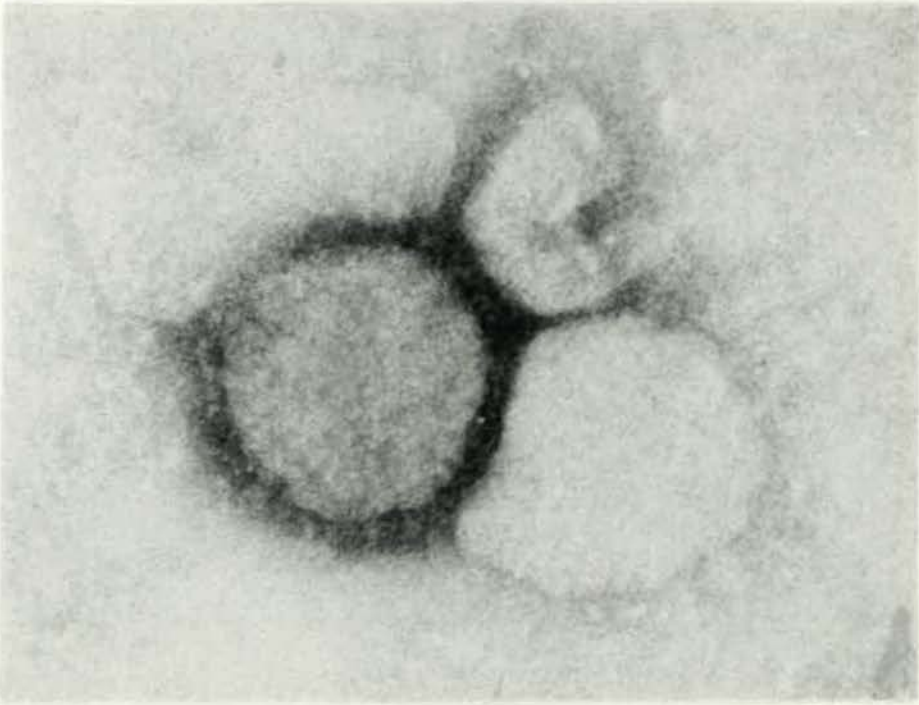
Microphotographie de l'immunosome VIH-1 (a) et du VIH-1, une particule virale intacte (b). Les échantillons ont été colorés négativement avec 3% d'acide phosphotungstique, pH 6,3 et examinés au microscope électronique "Philips 300".

Noter qu'à l'instar du VIH, la surface de l'immunosome VIH est recouverte de projections d'environ 8 nm qui représentent les glycoprotéines gp 160 ancrées par leurs portions hydrophobes dans l'enveloppe phospholipidique du liposome.

A



B



Figures 6 et 7: Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IVa-IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Des lapins femelles "White New Zealand" (9686-8 et 9687-9) ont été immunisés selon un protocole d'interventions IVa-IM avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 100 µg pour l'IVa et de 200 µg pour l'IM. Les lapins ont reçu des immunisations intravaginales trois fois par semaines durant trois semaines (jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20 et 22) suivie par une injection IM au jour 25. Les prélèvements de salive, larmes, urine, sécrétions vaginales, sécrétions intestinales, mucus intestinal et sérum ont été effectués au jour 35 et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA.

IM: intramusculaire IVa: intravaginal

Figure 6 Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IVa-IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

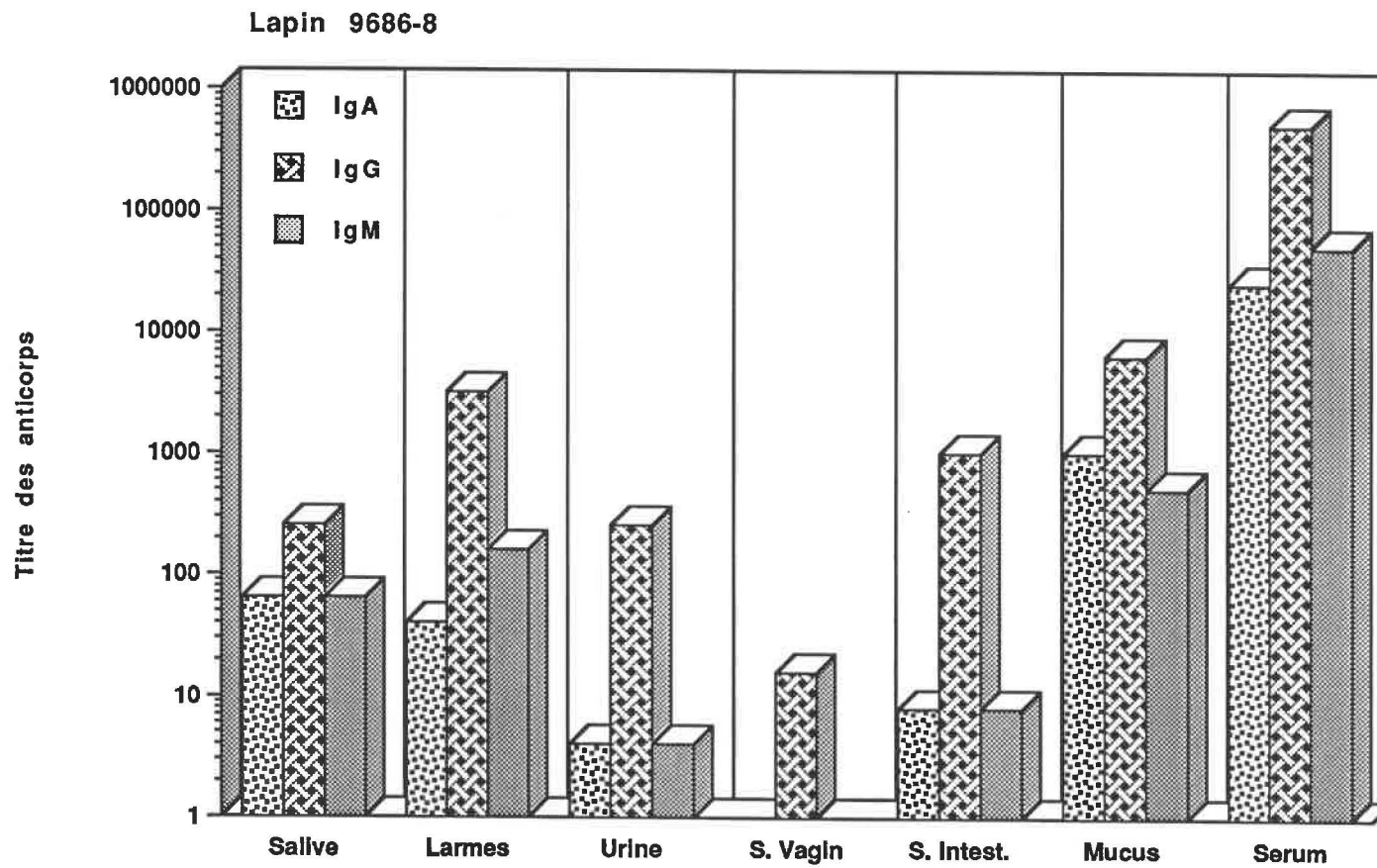


Figure 7 Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IVa-IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

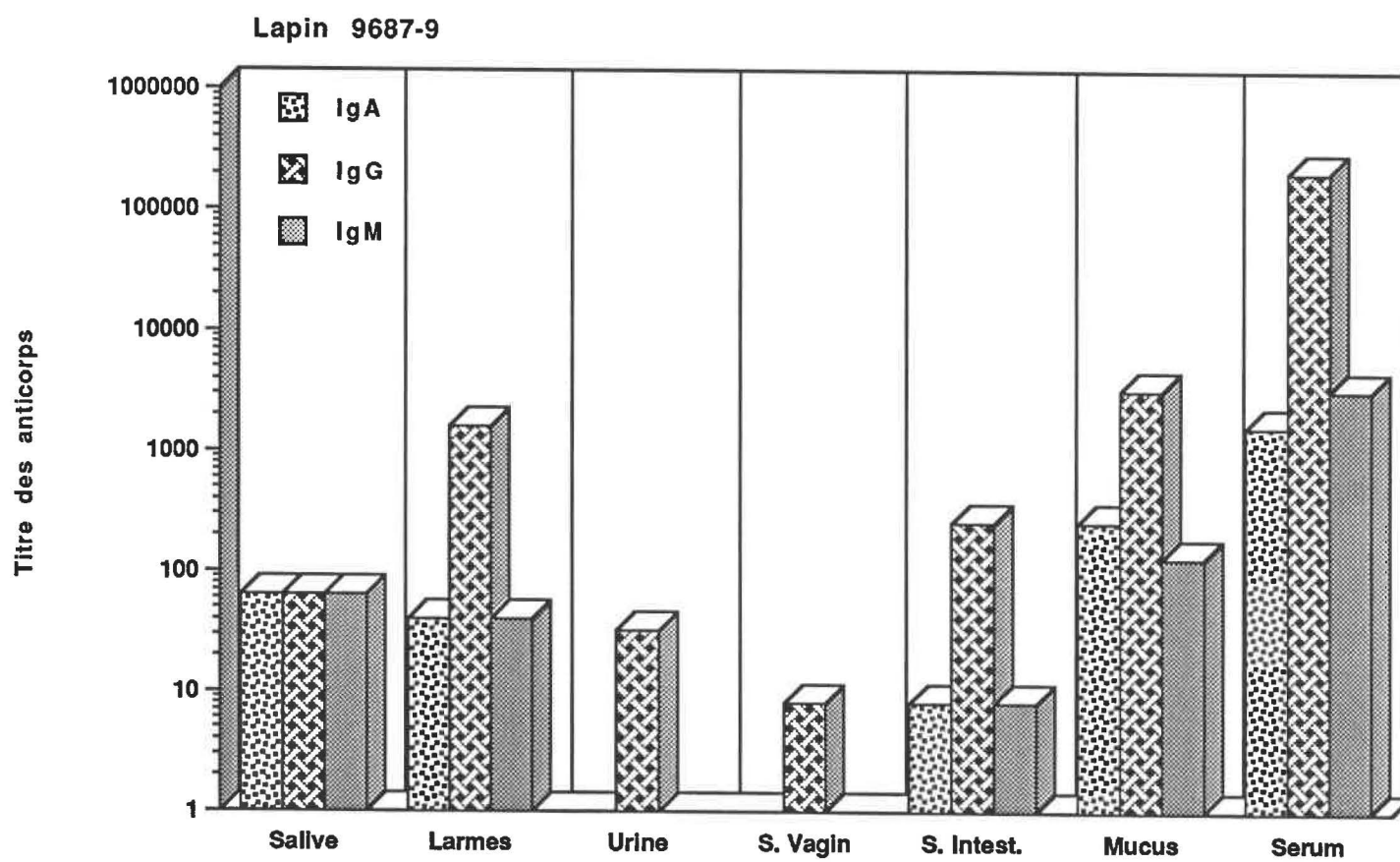


Figure 8: Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IM-IVa avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un groupe de lapins femelles "White New Zealand" (9690-11 et 9691-12) a été immunisé selon un protocole d'interventions IM-IVa avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 200 µg pour l'IM et de 100 µg pour l'IVa. Les lapins ont reçu une injection IM au jour 0 suivie par des immunisations IVa durant trois semaines, aux jours 15, 17, 20, 22, 24, 27, 31, 34 et 36. Les prélèvements de salive, larmes, sécrétions intestinales et sérum ont été effectués deux jours après la dernière intervention IVa et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA.

IM: intramusculaire IVa: intravaginal

Figure 8

**Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA
selon un protocole d'immunisation IM-IVa
avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin**

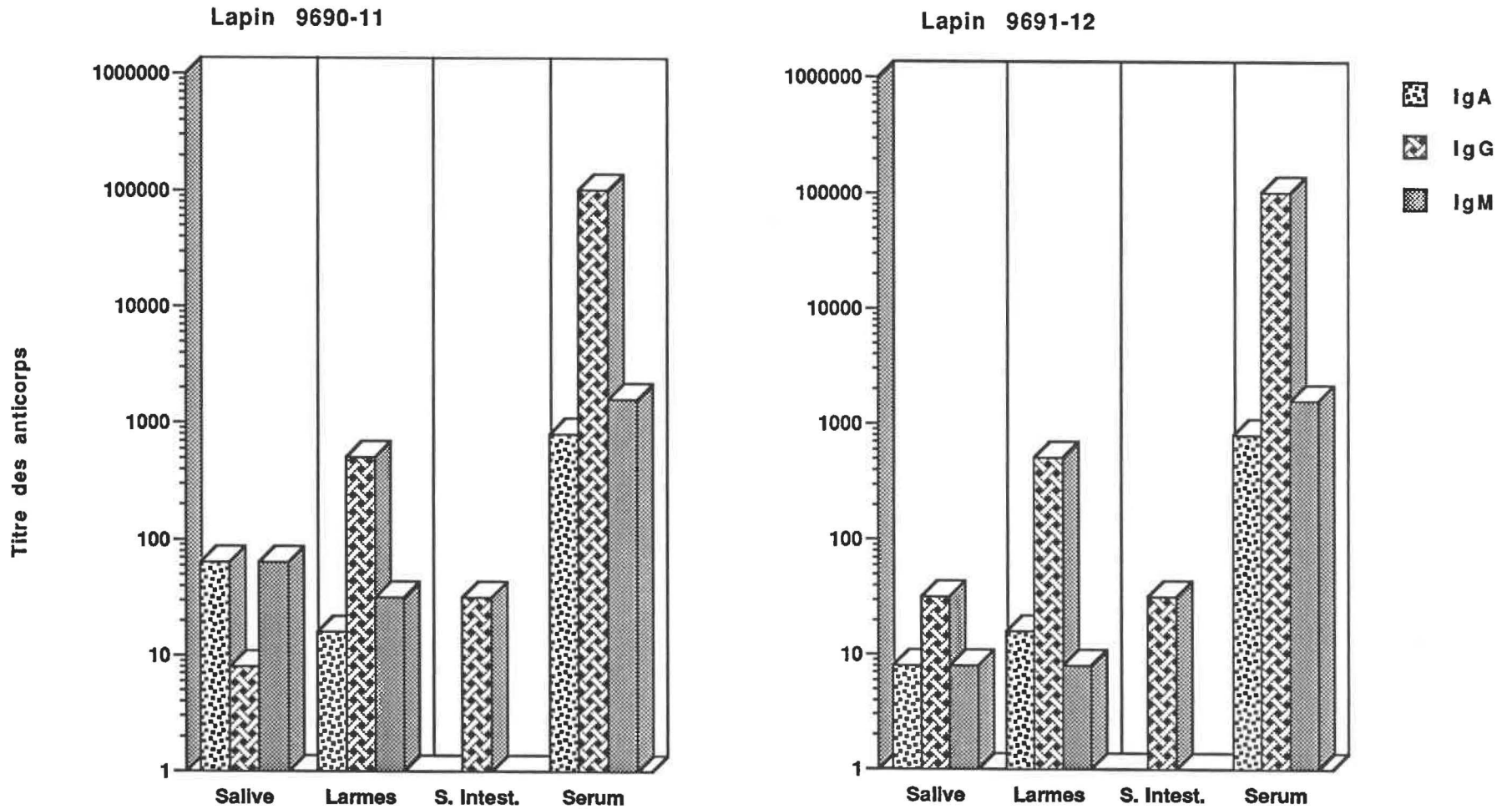


Figure 9: Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation Caps-IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un groupe de lapins femelles "White New Zealand" (9729-2 et 9730-3) a été immunisé selon le protocole d'intervention Oral-IM avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 100 et 200 µg, respectivement pour l'oral et l'IM. Les lapins ont été immunisés par voie orale durant trois semaines (jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20 et 22) suivie par une injection IM au jour 25. Les prélèvements des échantillons ont été effectués au jour 35 et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive, larmes, sécrétions intestinales et sérum ont été déterminés par ELISA.

Caps: capsules entériques IM: intramusculaire

Figure 9

Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation Caps-IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

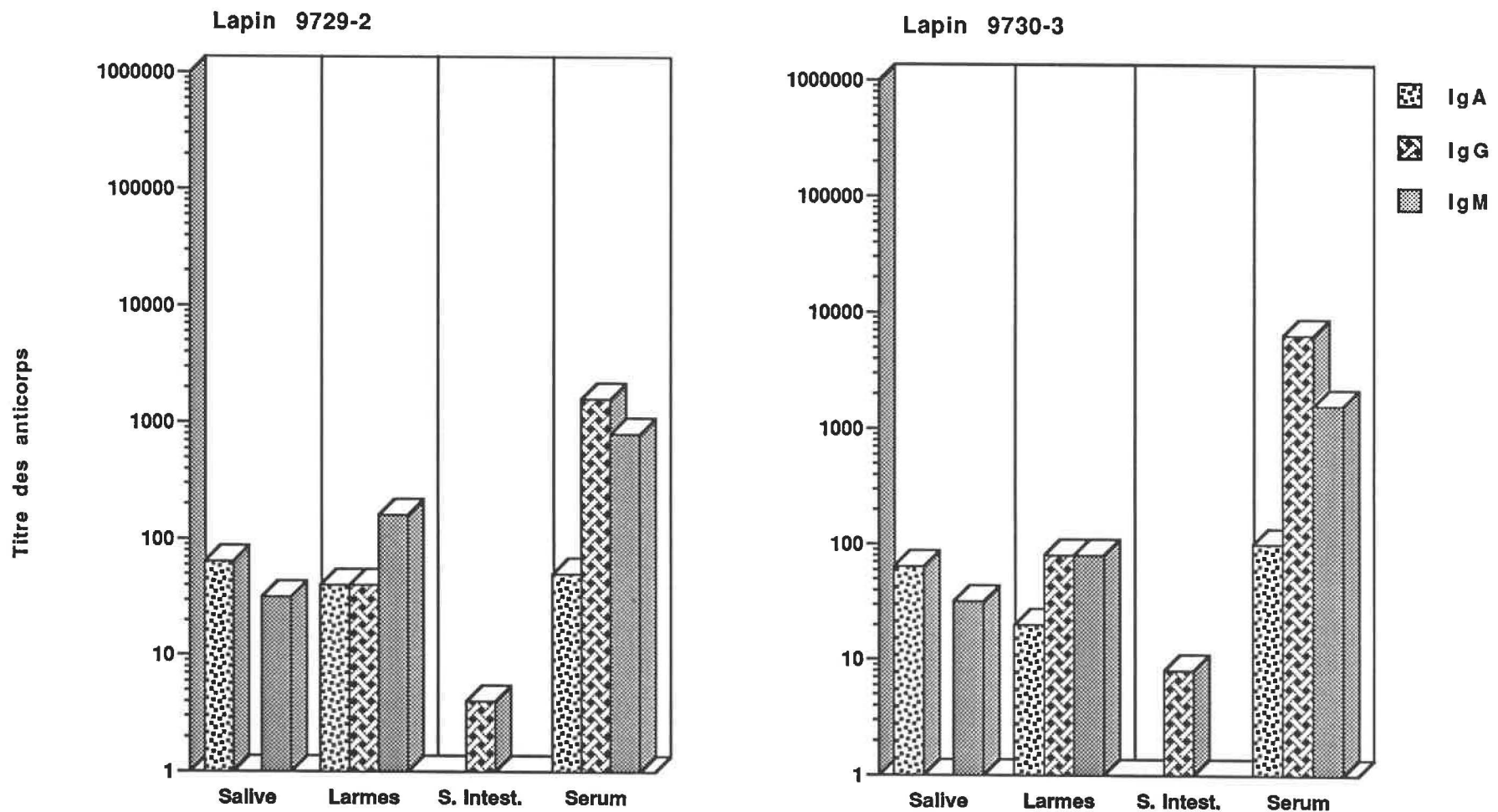


Figure 10: Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IM-Caps avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un groupe de lapins femelles "White New Zealand" (9688-6 et 9694-7) a été immunisé selon le protocole d'intervention IM-Caps avec l'IMS-VIH, la dose antigénique étant de 100 µg pour les capsules entériques et de 200 µg pour l'IM. Les lapins ont reçu une injection IM au jour 0 suivie par des capsules entériques durant trois semaines (jours 15, 17, 20, 22, 24, 27, 31, 34 et 36). Le prélèvement des échantillons a eu lieu deux jours après la dernière intervention Caps. Les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive, les sécrétions intestinales et le sérum ont été déterminés par ELISA.

Caps: capsules entériques

IM: intramusculaire

Figure 10

**Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA
selon un protocole d'immunisation IM-Caps
avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin**

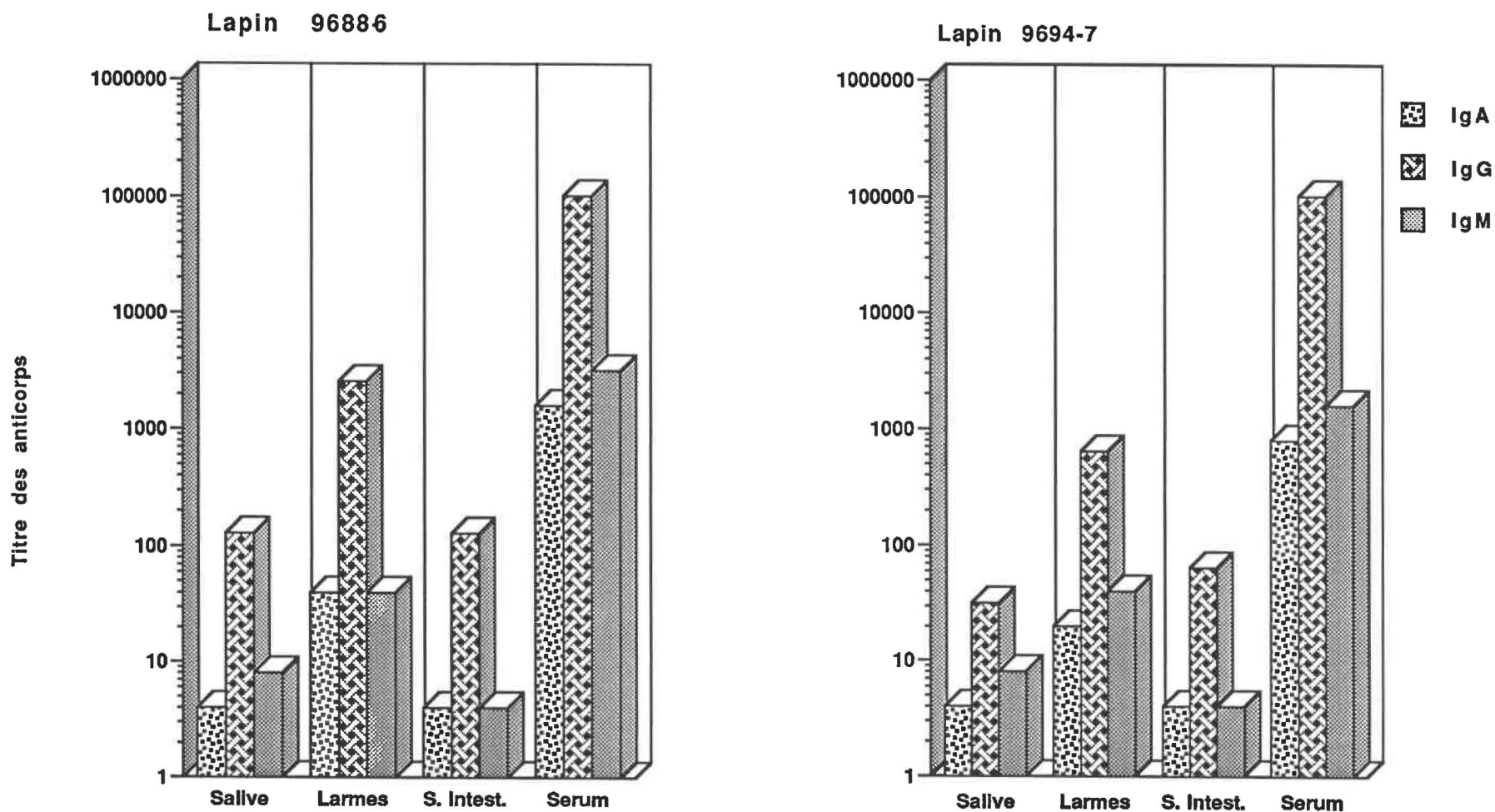


Figure 11: Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un lapin femelle "White New Zealand" (9692-15) a été immunisé deux fois par voie IM avec l'IMS-VIH-1 (200 µg) aux jours 0 et 7. Le prélèvement des échantillons a eu lieu au jour 17 et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive, le sérum et les sécrétions vaginales et intestinales ont été déterminés par ELISA.

IM: intramusculaire

Figure 11 Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole d'immunisation IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

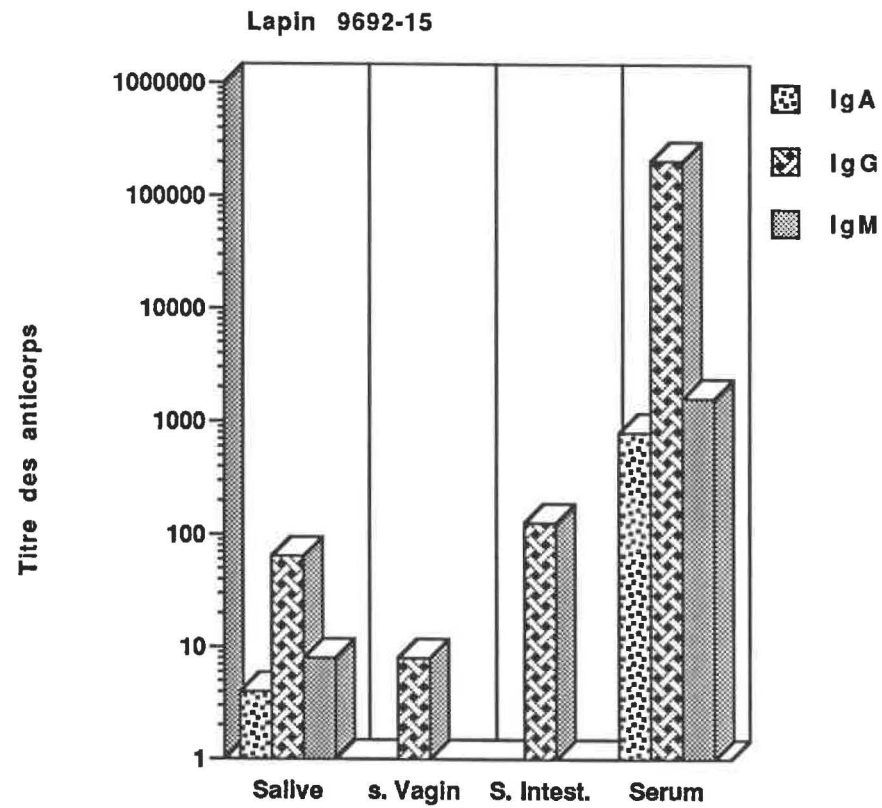


Figure 12: Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IM-Caps-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un groupe de lapins femelles "White New Zealand" (9688-6 et 9694-7) a été immunisé selon le protocole IM-Caps-ID avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 100, 200 et 300 µg, respectivement pour les capsules entériques, l'IM et l>ID. Les lapins ont reçu une injection par la voie IM au jour 0 suivie d'immunisations orales avec des capsules entériques, aux jours 15, 17, 20, 22, 24, 27, 31, 34 et 36 et une immunisation ID au jour 86. Un échantillon de sérum a été prélevé aux jours 0, 13, 31, 41 et 99 et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA.

Caps: capsules entériques ID: intradermique IM: intramusculaire

Figure 12

Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IM-Caps-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

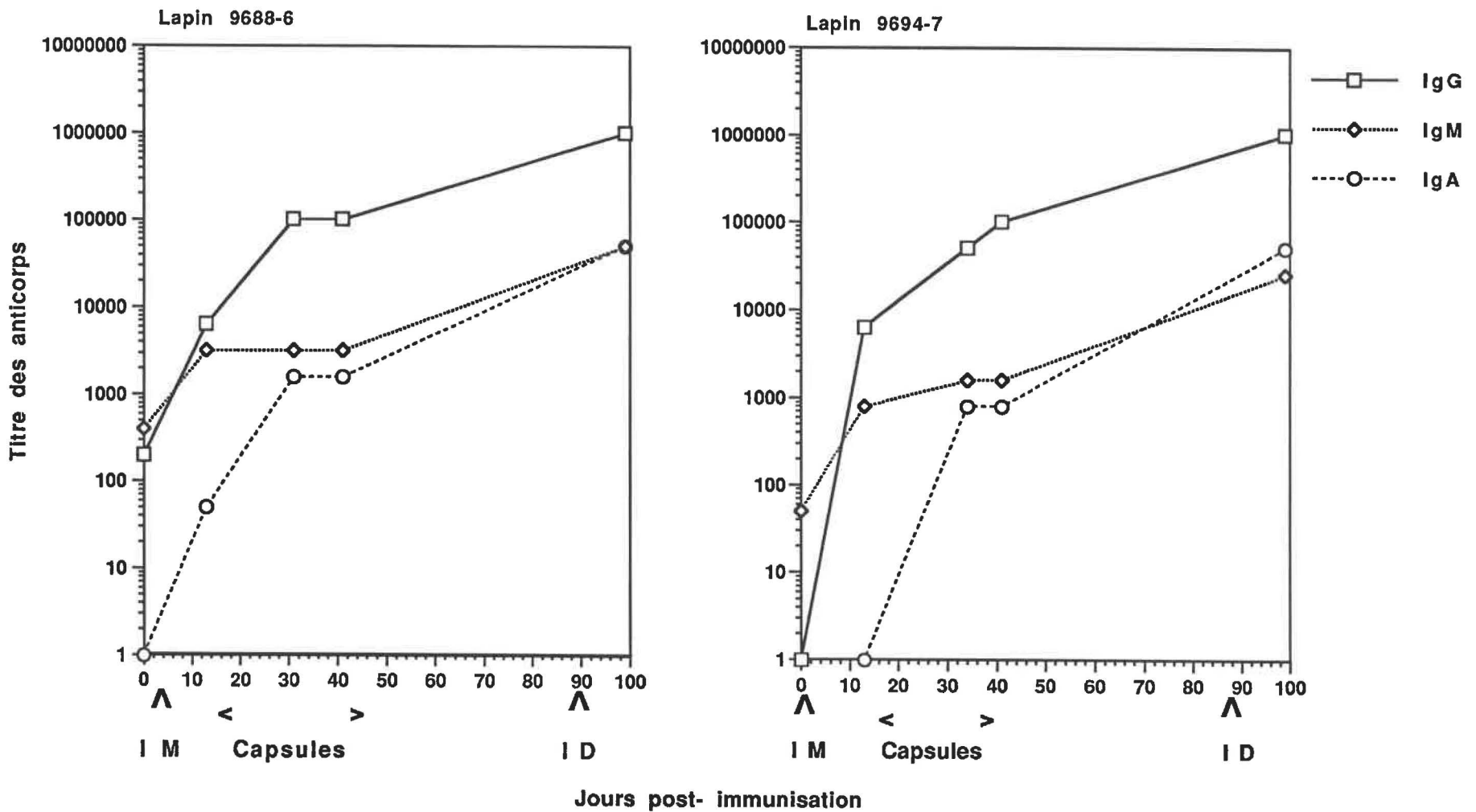


Figure 13: Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IM-IVa-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un groupe de lapins femelles "White New Zealand" (9690-11 et 9691-12) a été immunisé selon le protocole IM-IVa-ID avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 100, 200 et 300 µg, respectivement pour l'IVa, l'IM et l>ID. Les lapins ont reçu une injection par la voie IM au jour 0 suivie par des immunisations IVa, aux jours 15, 17, 20, 22, 24, 27, 31, 34 et 36 et une injection ID au jour 86. Un échantillon de sérum a été prélevé aux jours 0, 13, 30, 38 et 99 et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA.

ID: intradermique IM: intramusculaire IVa: intravaginal

Figure 13

Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IM-IVa-ID avec l'IMS-VIH chez le lapin

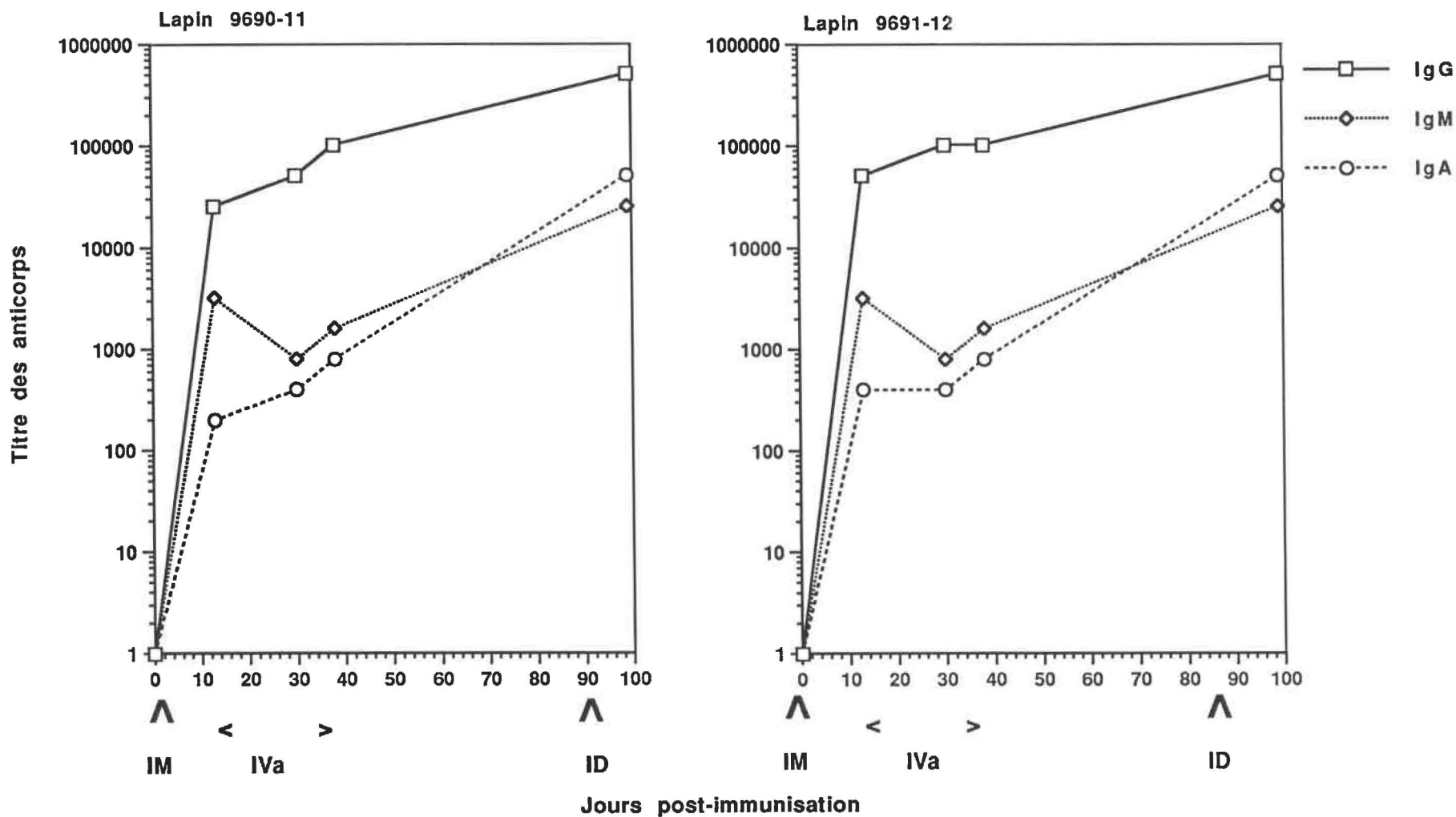


Figure 14: Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation Oral-IM-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un lapin femelle "White New Zealand" (9646-5) a été immunisé selon un protocole Oral-IM-ID avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 100, 200 et 300 µg, respectivement pour l'IVa, l'IM et l>ID. Le lapin a reçu trois immunisations orales par semaine durant trois semaines (jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20 et 22) suivie par une injection IM au jour 27 et une immunisation ID au jour 71. Un échantillon de sérum a été prélevé aux jours 0, 14, 36 et 84 et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA.

ID: intradermique IM: intramusculaire

Figure 14

Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation Oral-IM-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

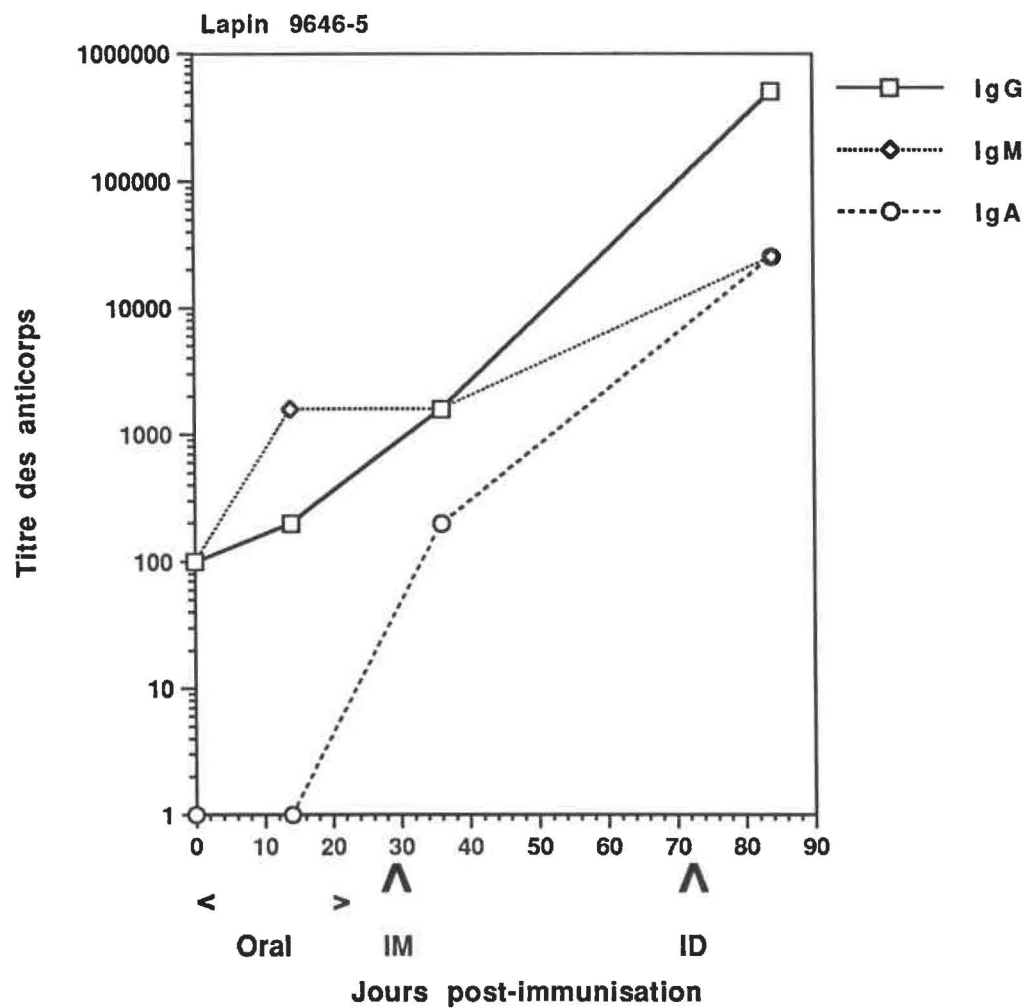


Figure 15: Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation Caps-IM-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un lapin femelle "White New Zealand" (9730-3) a été immunisé selon un protocole Caps-IM-ID avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 100, 200 et 300 µg, respectivement pour les capsules entériques, l'IM et l>ID. Le lapin a reçu par voie orale des capsules entériques durant trois semaines, aux jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20 et 22 suivie par une injection IM au jour 25 et une immunisation ID au jour 69. Un échantillon de sérum a été prélevé aux jours 0, 21, 35 et 82 et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA.

Caps: capsules entériques ID: intradermique IM: intramusculaire

Figure 15

Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation Caps-IM-ID avec l'IMS-VIH chez le lapin

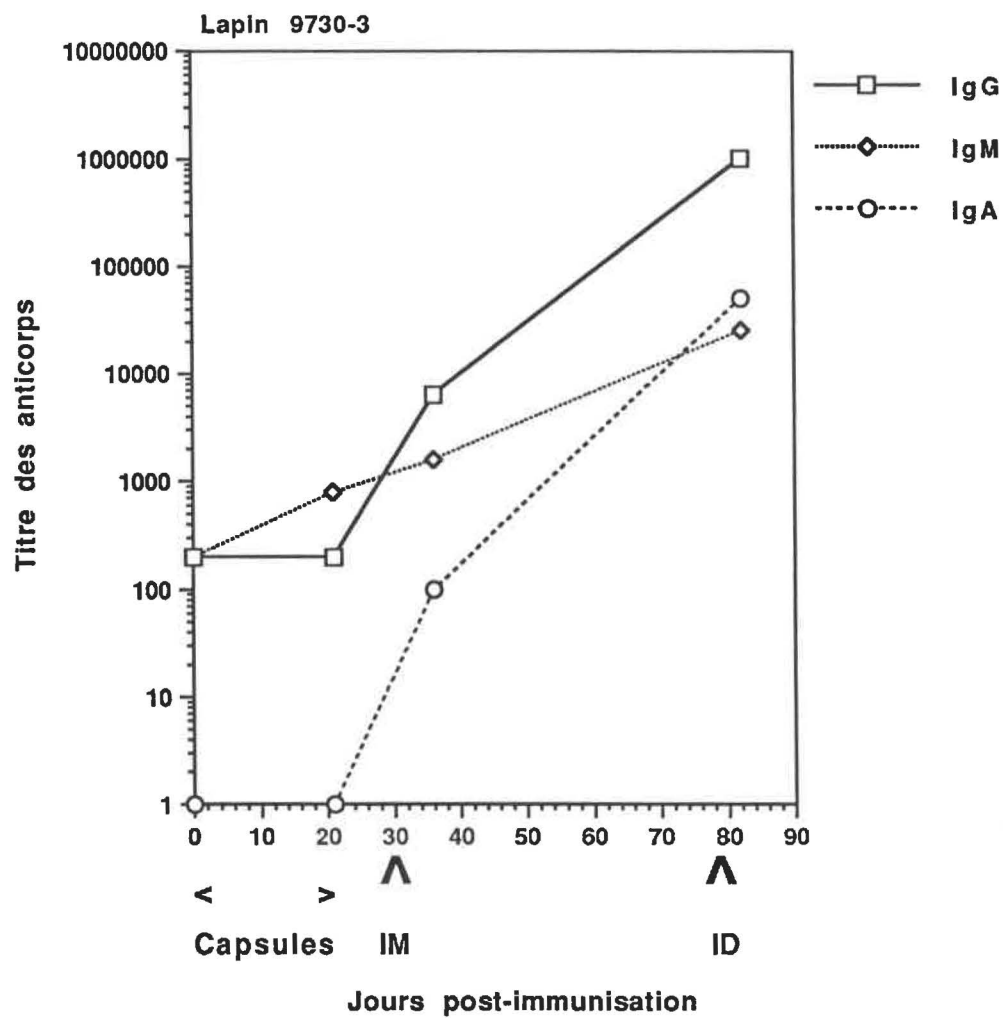


Figure 16: Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IVa-IM-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un groupe de lapins femelles "White New Zealand" (9686-8 et 9687-9) a été immunisé selon un protocole IVa-IM-ID avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 100, 200 et 300 µg, respectivement pour l'IVa, l'IM et l>ID. Les lapins ont été immunisés par voie intravaginale aux jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20, 22, 24, 29, 31 et 34 suivie par une injection IM au jour 41 et une immunisation ID au jour 88. Un échantillon de sérum a été prélevé aux jours 0, 27, 36, 50 et 99 et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA.

ID: intradermique IM: intramusculaire IVa: intravaginal

Figure 16

Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IVa-IM-ID avec l'IMS-VIH chez le lapin

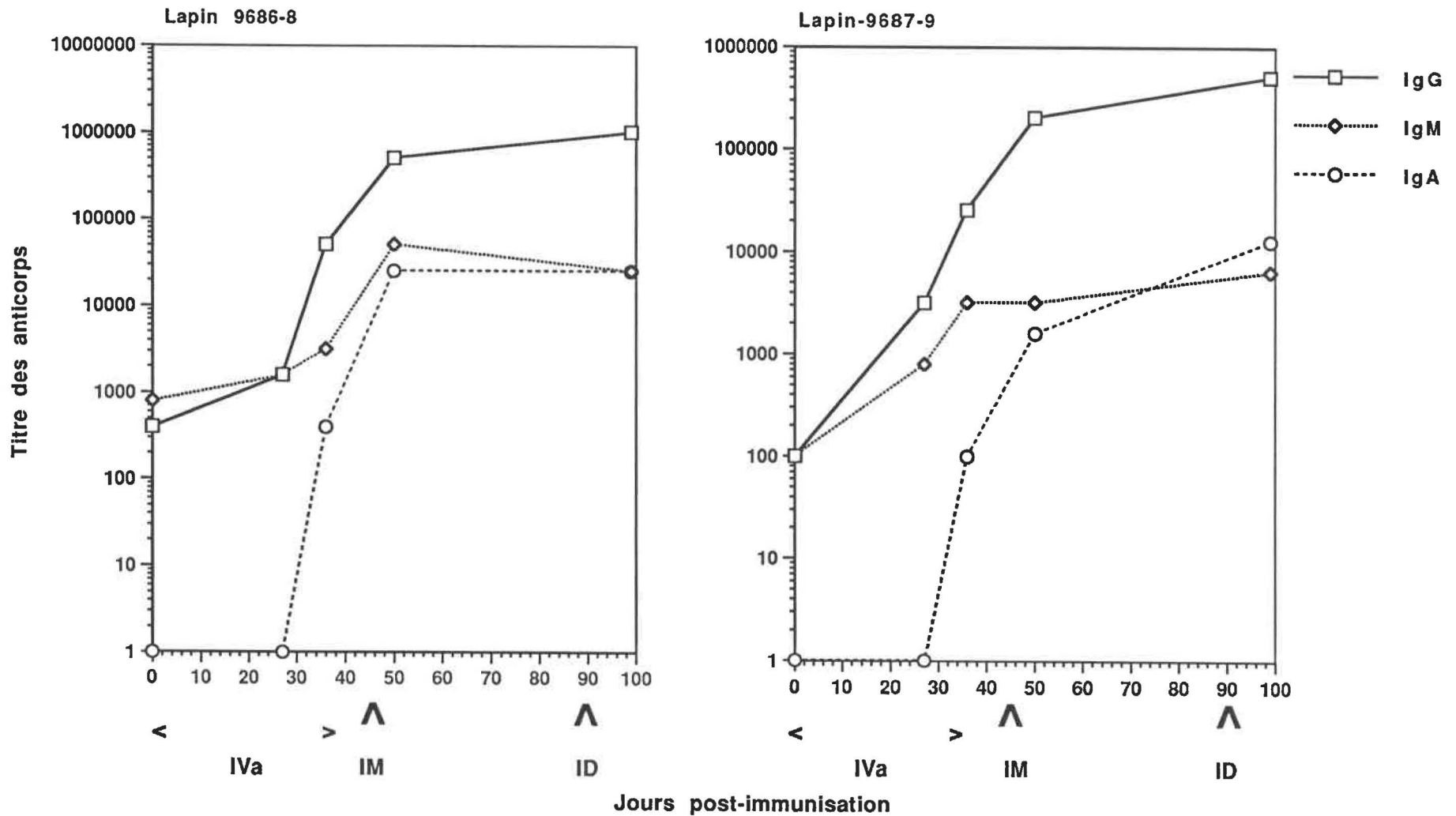


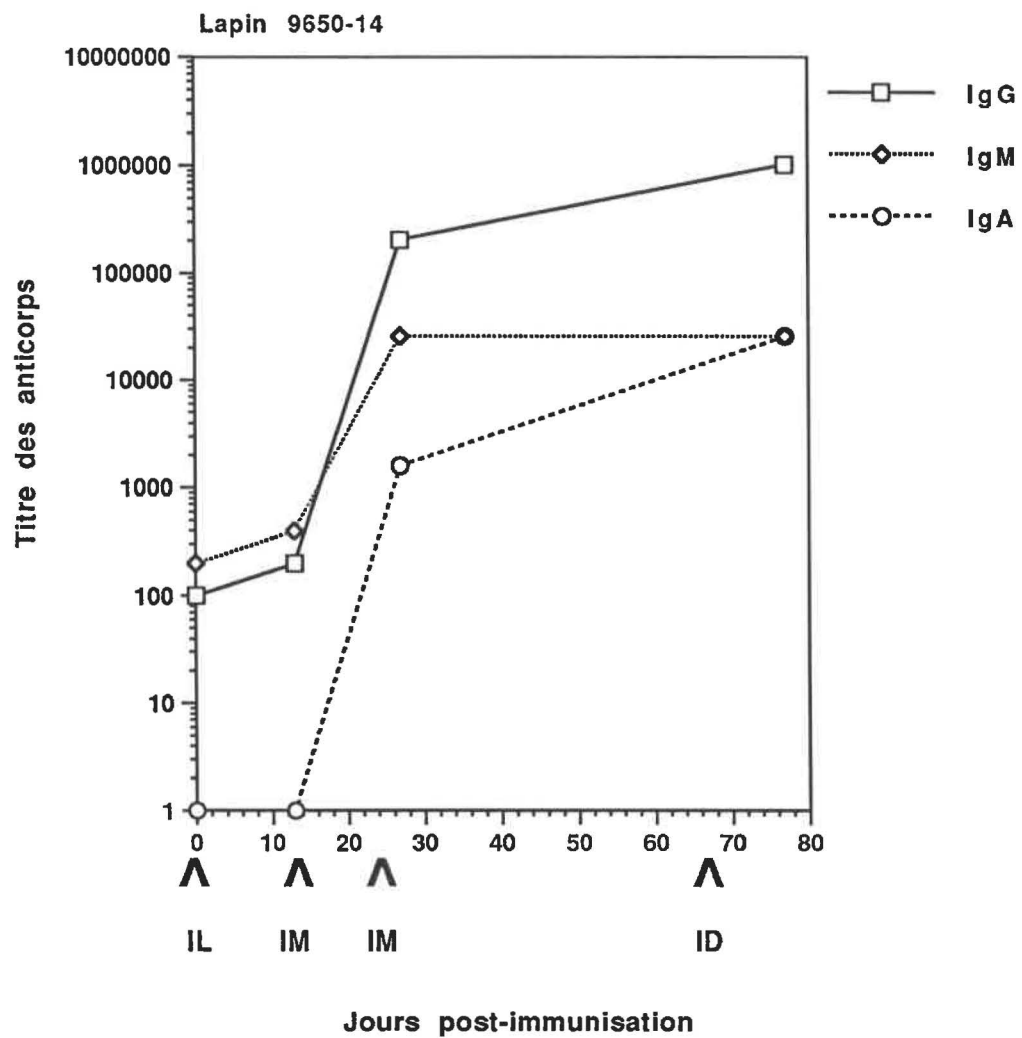
Figure 17: Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IL-IM-ID avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Un lapin femelle "White New Zealand" (9650-14) a été immunisé selon un protocole IL-IM-ID avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 50, 200 et 300 µg, respectivement, pour l'IL, l'IM et l>ID. L'immunisation IL a été effectuée au jour 0 suivie par deux interventions IM aux jours 14 et 21 et une injection ID au jour 64. Un échantillon de sérum a été prélevé aux jours 0, 13, 27 et 77 et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA.

ID: intradermique IL: intraluminal IM: intramusculaire

Figure 17

Evolution des titres et isotypes des anticorps sériques spécifiques du VIH-1 au cours d'un protocole d'immunisation IL-IM-ID avec l'IMS-VIH chez le lapin



TABLEAUX

Tableau I: Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole à une intervention parentérale par voie IM ou IP avec l'IMS-VIH-1 chez la souris

Des groupes de souris Balb/c femelles ont été immunisés par voie intramusculaire ou intrapéritonéale avec 45 µg d'IMS-VIH-1 dans un volume total de 100 µL. Un volume égal de PBS stérile a été administré par la même voie aux souris témoins négatifs. Les prélèvements de salive, de sérum et d'homogénat intestinal ont été effectués 15 jours plus tard et le titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été évalués par ELISA. Le titre représente la plus grande dilution qui donne une densité optique à 490 nm supérieure ou égale à 0,200.

Tableau I

Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole à une intervention parentérale par voie IM ou IP avec l'immunosome VIH-1 chez la souris

Titre des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA					
Souris	Salive	Homogénat intestinal		Sérum	
	IgA	IgA	IgG+IgM	IgA	IgG+IgM
<i>Immunisation intramusculaire (IM)</i>					
1	<6	<10	<10	<50	400
2	<6	<10	<10	<50	200
3	<6	<10	<10	<50	400
4	<6	<10	<10	<50	100
5	<6	<10	<10	<50	400
6	<6	<10	<10	<50	200
<i>Immunisation intrapéritonéale (IP)</i>					
7	<6	<10	<10	<50	800
8	<6	<10	<10	<50	400
9	<6	<10	<10	100	6 400
<i>témoins négatifs</i>					
10	<6	<10	<10	<10	<10
11	<6	<10	<10	<10	<10
12	<6	<10	<10	<10	<10
13	<6	<10	<10	<10	<10

Tableau II: Effet de la *durée* des immunisations orales avec l'IMS-VIH-1 sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1 chez la souris

Des groupes de souris Balb/c ont été immunisés par voie orale avec 25 µg d'IMS-VIH-1 dans un volume total de 100 µL. Un volume égal de PBS stérile a été administré par la même voie aux souris témoins négatifs. Les immunisations ont eu lieu trois fois par semaine durant une (souris 1 à 6), deux (souris 7 à 12) ou trois (souris 13 à 18) semaines. Deux jours après la dernière intervention, les prélèvements ont été effectués et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive et le sérum ont été évalués par ELISA.

Tableau II

**Effet de la *durée* des immunisations orales avec l'IMS-VIH-1
sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1
chez la souris**

Titre des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA			
Souris	Salive IgA	Sérum IgA	Sérum IgG+IgM
<i>Trois fois par semaine pendant <u>une</u> semaine</i>			
1	<6	<10	10
2	<6	<10	<10
3	<6	<10	<10
4	<6	<10	10
5	<6	<10	10
6	<6	<10	<10
<i>Trois fois par semaine pendant <u>deux</u> semaines</i>			
7	192	160	2 560
8	30	80	2 560
9	<6	80	1 280
10	<6	40	640
11	6	20	160
12	<6	<10	40
<i>Trois fois par semaine pendant <u>trois</u> semaines</i>			
13	>192	20	20 480
14	>192	160	10 240
15	>192	40	10 240
16	192	320	2 560
17	96	80	10 240
18	48	160	5 120
<i>témoins négatifs</i>			
19	<6	<10	<10
20	<6	<10	<10
21	<6	<10	<10
22	<6	<10	<10

Tableau III: Effet de la fréquence des immunisations orales avec l'IMS-VIH-1 sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1 chez la souris

Des groupes de souris Balb/c femelles ont été immunisés par voie orale avec 25 µg d'IMS-VIH-1 dans un volume total de 100 µL. Un volume égal de PBS a été administré par la même voie aux souris témoins négatifs. La durée de l'expérience a été constante (3 semaines) mais la fréquence des immunisations orales a varié soit une fois (souris 1 à 6), deux fois (souris 7 à 12) ou trois fois (souris 13 à 18) par semaine. Deux jours après la dernière intervention, les prélèvements ont été effectués et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive et le sérum ont été évalués par ELISA.

Tableau III

Effet de la *fréquence* des immunisations orales avec l'IMS-VIH-1
sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1
chez la souris

Titre des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA			
Souris	Salive IgA	IgA	Sérum IgG+IgM
<i>Une fois par semaine pendant trois semaines</i>			
1	<6	<10	<10
2	<6	<10	<10
3	<6	<10	<10
4	<6	<10	<10
5	<6	<10	<10
6	<6	<10	<10
<i>Deux fois par semaine pendant trois semaines</i>			
7	96	160	10 240
8	96	160	2 560
9	48	40	10 240
10	24	20	20 480
11	6	80	10 240
12	6	40	10 240
<i>Trois fois par semaine pendant trois semaines</i>			
13	>192	20	20 480
14	>192	160	10 240
15	>192	40	10 240
16	192	320	2 560
17	96	80	10 240
18	48	160	5 120
<i>Témoins négatifs</i>			
19	<6	<10	<10
20	<6	<10	<10
21	<6	<10	<10
22	<6	<10	<10

Tableau IV: Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole à une seule immunisation IL et à une combinaison d'interventions IL-IM avec l'IMS-VIH-1 chez la souris

Des groupes de souris Balb/c femelles ont reçu 30 µg d'IMS-VIH-1 par voie IL (souris 1 à 3) ou une intervention IL suivie d'une immunisation IM (45 µg d'IMS-VIH-1) deux semaines plus tard (souris 4 à 9). Des immunisations IL et IM avec du PBS stérile ont été effectuées aux souris témoins négatifs. Deux semaines après la dernière intervention les prélèvements ont été effectués et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive, l'homogénat intestinal et le sérum ont été déterminés par ELISA.

IL: intraluminal IM: intramusculaire

Tableau IV

Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon un protocole à une seule immunisation IL et à une combinaison d'interventions IL-IM avec l'IMS-VIH-1 chez la souris

Titre des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA					
Souris	Salive	Homogénat intestinal		Sérum	
	IgA	IgA	IgG+IgM	IgA	IgG+IgM
<i>Intraluminal seulement (IL)</i>					
1	<6	20	10	<50	<50
2	<6	20	<10	<50	100
3	<6	20	<10	<50	200
<i>Intraluminal-intramusculaire (IL-IM)</i>					
4	64	40	640	<50	204 800
5	64	80	640	<50	102 400
6	64	40	160	<50	102 400
7	64	40	160	<50	25 600
8	32	80	160	<50	51 200
9	32	80	80	<50	6 400
<i>témoins négatifs</i>					
10	<6	<10	<10	<10	<10
11	<6	<10	<10	<10	<10
12	<6	<10	<10	<10	<10
13	<6	<10	<10	<10	<10

Tableau V: Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 selon deux protocoles d'immunisation inversés par voies orale* et IM avec l'IMS-VIH-1 chez la souris

Des groupes de souris Balb/c femelles ont été immunisés selon des protocoles à interventions mixtes avec l'IMS-VIH-1 (ou du PBS pour les témoins négatifs), la dose antigénique étant de 25 µg pour les immunisations orales et de 45 µg pour l'IM. Le premier groupe de souris (1 à 6) a reçu trois immunisations orales par semaine durant 2 semaines (jours 0, 2, 4, 7, 9 et 11) puis une injection IM au jour 28. Une semaine plus tard, les prélèvements ont été effectués et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive, l'homogénat intestinal et le sérum ont été déterminés par ELISA. Le deuxième groupe de souris (7 à 12) a reçu le protocole inversé, soit une injection IM au jour 0 suivie par des immunisations orales 3 fois par semaine durant 2 semaines (jours 7, 9, 11, 14, 16 et 18). Les prélèvements, dans ce cas, ont eu lieu 2 jours après la dernière immunisation orale.

IM: intramusculaire

* Les immunisations orales ont eu lieu trois fois par semaine pendant deux semaines.

Tableau V

**Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 selon deux protocoles
d'immunisation inversés par voies orale et IM avec l'IMS-VIH-1 chez la souris**

Titre des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA						
Souris	Immunisation	Salive	Homogenat intestinal		Serum	
		IgA	IgA	IgG+IgM	IgA	IgG+IgM
1	Oral*-IM	120	160	1 280	50	102 400
2	"	12	160	320	50	102 400
3	"	120	80	320	200	51 200
4	"	48	80	160	<50	51 200
5	"	48	80	80	100	25 600
6	"	<6	80	10	<50	1 600
7	IM-Oral*	<6	80	40	<20	3 200
8	"	<6	40	10	<20	3 200
9	"	<6	80	10	<20	1 600
10	"	6	80	<10	<20	800
11	"	<6	80	<10	<20	800
12	"	<6	40	10	<20	800
13	PBS	<6	<10	<10	<20	100
14	"	<6	<10	<10	<20	100
15	"	<6	<10	<10	<20	100
16	"	<6	<10	<10	<20	100

* Les immunisations orales ont eu lieu trois fois par semaine pendant deux semaines.

Tableau VI: Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 selon deux protocoles d'immunisation inversés par voies orale* et IM avec l'IMS-VIH-1 chez la souris

Des groupes de souris Balb/c femelles ont été immunisés selon des protocoles à interventions mixtes avec l'IMS-VIH-1 (ou du PBS pour les souris témoins négatifs), la dose antigénique étant de 25 µg pour les immunisations orales et de 45 µg pour l'IM. Le premier groupe de souris (1 à 6) a reçu 3 immunisations orales par semaine durant 3 semaines (jours 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 et 18) suivie par une injection IM au jour 25. Une semaine plus tard, les prélèvements ont été effectués et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans la salive, l'homogénat intestinal et le sérum ont été évalués par ELISA. De plus, les anticorps sériques qui reconnaissent le VIH ont été révélés par immunofluorescence. Le deuxième groupe de souris (7 à 12) a reçu le protocole inversé, soit une injection IM au jour 0 suivie par des immunisations orales 3 fois par semaine durant trois semaines (jours 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23 et 25). Les prélèvements, dans ce cas, ont eu lieu 2 jours après la dernière immunisation orale.

IM: intramusculaire

* Les immunisations orales ont eu lieu trois fois par semaine pendant trois semaines.

Tableau VI

**Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 selon deux protocoles
d'immunisation inversés par voies orale et IM avec l'IMS-VIH-1 chez la souris**

Souris	Immunisation	Titre des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA				immunofluorescence	
		Salive IgA	Homogénat intestinal IgA	Homogénat intestinal IgG+IgM	Sérum IgA	Sérum IgG+IgM	Sérum
1	Oral*-IM	120	40	1 280	400	64 000	+
2	"	120	20	640	200	32 000	+
3	"	60	40	640	100	16 000	+
4	"	60	20	640	100	16 000	+
5	"	48	40	320	200	16 000	+
6	"	120	40	320	100	16 000	+
7	IM-Oral*	120	80	320	200	16 000	+
8	"	120	80	320	<50	8 000	+
9	"	12	80	160	50	8 000	+
10	"	24	80	160	100	8 000	+
11	"	24	20	40	<50	4 000	+
12	"	<6	20	20	<50	2 000	+
13	PBS	<6	<10	<10	<20	100	--
14	"	<6	<10	<10	<20	100	--
15	"	<6	<10	<10	<20	100	--
16	"	<6	<10	<10	<20	100	--

* Les immunisations orales ont eu lieu trois fois par semaine pendant trois semaines.

Tableau VII: Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 selon différentes voies mucoales d'immunisation avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Des groupes de lapins "White New Zealand" ont été immunisés par différentes voies mucoales avec l'IMS-VIH-1 (ou du PBS pour les lapins témoins négatifs), la dose antigénique étant de 100 µg pour les interventions IVa, Caps et Oral, et de 50 µg pour l'IL. Les lapins des protocoles *intravaginal* (9686-8 et 9687-9), *capsules entériques* (9729-2 et 9730-3) et *oral* (9684-4) ont été immunisés 3 fois par semaine durant 3 semaines (jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20 et 22). Deux jours après la dernière intervention les prélèvements de salive, larmes, sécrétions vaginales, sécrétions intestinales et sérum ont été effectués et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA. Les lapins du protocole *intraluminal* (9649-13 et 9650-14) ont reçu une seule IL au jour 0 et les prélèvements ont été effectués deux semaines plus tard.

Caps: capsules entériques IL: intraluminal IM: intramusculaire
 IVa: intravaginal ND: non déterminé

Tableau VII

**Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 selon différentes voies mucoales
d'immunisation avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin**

Titres des anticorps spécifiques du VIH par ELISA															
Lapin	Salive			Larmes			S. Vaginales			S. Intestinales			Sérum		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
<i><u>Intravaginal (IVa)</u></i>															
9686-8	16	<4	16	ND	ND	ND	<4	<4	<4	<2	2	<2	<50	1 600	1 600
9687-9	<4	8	8	ND	ND	ND	<4	<4	<4	<2	4	<2	<50	3 200	800
<i><u>Intraluminal (IL)</u></i>															
9649-13	8	<4	8	<20	<20	20	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<50	200	400
9650-14	16	<4	<4	ND	ND	ND	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<50	200	400
<i><u>Capsules entériques (Caps)</u></i>															
9730-3	4	<4	4	20	40	<20	8	<4	8	<4	16	<4	<50	200	800
9729-2	4	<4	4	ND	ND	ND	8	<4	8	<4	4	<4	ND	ND	ND
<i><u>Oral</u></i>															
9684-4	8	<4	<4	ND	ND	ND	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<50	200	400
<i><u>Témoin négatif</u></i>															
9696-0	16	<4	16	<10	<10	<10	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<50	100	100

Tableau VIII: Effet de la durée des immunisations intravaginales avec l'IMS-VIH-1 sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1 chez le lapin

Des groupes de lapins femelles "White New Zealand" ont été immunisés par voie intravaginale avec 100 µg d'IMS-VIH-1 sous forme de suppositoire. Les immunisations ont eu lieu 3 fois par semaine et les prélèvements ont été effectués après 2, 3 et 4 semaines d'interventions. Le titre des anticorps spécifiques du VIH-1 dans les échantillons de salive, larmes, sécrétions vaginales, sécrétions intestinales et sérum ont été déterminés par ELISA.

ND: non déterminé

Tableau VIII

**Effet de la durée des immunisations intravaginales avec l'IMS-VIH-1
sur la synthèse d'anticorps spécifiques du VIH-1 chez le lapin**

Titres des anticorps spécifiques du VIH par ELISA																
Lapin	Salive			Larmes			S. Vaginales			S. Intestinales			Sérum			
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	
<i><u>Après deux semaines</u></i>																
9648-10	8	<4	<4	ND	ND	ND	<4	<4	<4	<4	4	<4	<50	100	100	
<i><u>Après trois semaines</u></i>																
9686-8	16	<4	16	ND	ND	ND	<4	<4	<4	<2	2	<2	<50	1 600	1 600	
9687-9	<4	8	8	ND	ND	ND	<4	<4	<4	<2	4	<2	<50	3 200	800	
<i><u>Après quatre semaines</u></i>																
9686-8	8	32	16	64	512	<20	<4	<4	<4	<2	8	<2	400	51 200	3 200	
9687-9	8	8	32	64	ND	ND	<4	32	4	<2	16	<2	100	25 600	3 200	
<i><u>Témoin négatif</u></i>																
9696-0	16	<4	16	<10	<10	<10	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<50	100	100	

Tableau IX: Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon deux protocoles d'immunisation inversés par voies IVa et IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Des groupes de lapins "White New Zealand" ont été immunisés selon des protocoles à interventions mixtes (IVa et IM) avec l'IMS-VIH-1 (ou du PBS pour les lapins témoins négatifs). La dose antigénique pour les interventions IVa et IM a été, respectivement, 100 µg et 200 µg. Le premier groupe de lapins (9686-8, 9687-9 et 9648-10) a été immunisé par voie IVa 3 fois par semaines durant trois semaines (jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20 et 22) suivie par une injection IM au jour 25. Les prélèvements ont été effectués dix jours plus tard et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA. Le deuxième groupe de lapins (9690-11 et 9691-12) a reçu le protocole inversé, soit une injection IM au jour 0 suivie par des immunisations IVa aux jours 15, 17, 20, 22, 24, 27, 31, 34 et 36. Dans ce cas, les prélèvements ont été effectués deux jours après la dernière intervention.

IM: intramusculaire IVa: intravaginal

Tableau IX

**Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH -1 par ELISA selon deux protocoles
d'immunisation inversés par voies IVa et IM avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin**

Titres des anticorps spécifiques du VIH par ELISA																
Lapin	Salive			Larmes			S. Vaginales			S. Intestinales			Sérum			
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	
<i><u>Intravaginal-intramusculaire (IVa-IM)</u></i>																
9686-8	64	256	64	40	3 200	160	<4	16	<4	8	1 024	8	25 600	512 000	51 200	
9687-9	64	64	64	40	1 600	40	<4	8	<4	8	256	8	1 600	204 800	3 200	
9648-10	4	128	32	20	2 560	40	<4	<4	<4	<4	256	<4	1 600	409 600	12 800	
<i><u>Intramusculaire-intravaginal (IM-IVa)</u></i>																
9690-11	64	8	64	16	512	32	<4	4	<4	<4	32	<4	800	102 400	1 600	
9691-12	8	32	8	16	512	8	<4	32	<4	<4	32	<4	800	102 400	1 600	
<i><u>Témoin négatif</u></i>																
9696-0	16	<4	16	<10	<10	<10	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<50	100	100	

Tableau X: Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon deux protocoles d'immunisation inversés par voies IM et orale par capsules entériques avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Des groupes de lapins "White New Zealand" ont été immunisés selon des protocoles à interventions mixtes (Caps et IM) avec l'IMS-VIH-1 (ou du PBS pour les lapins témoins négatifs). La dose antigénique pour les interventions Caps et IM a été, respectivement, 100 µg et 200 µg. Le premier groupe de lapins (9729-2 et 9730-3) a reçu 3 capsules entériques par semaine durant 3 semaines (jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20 et 22), suivie par une injection IM au jour 25. Les prélèvements de salive, larmes, sécrétions vaginales, sécrétions intestinales et sérum ont été effectués dix jours après la dernière intervention. Le deuxième groupe de lapins (9688-6 et 9694-7) a reçu le protocole inversé, soit une injection IM au jour 0 suivie par des immunisations par capsules entériques, aux jours 15, 17, 20, 22, 24, 27, 31, 34 et 36. Dans ce cas, les prélèvements ont été effectués deux jours après la dernière intervention et les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 dans chaque échantillon ont été déterminés par ELISA.

Caps: capsules entériques IM: intramusculaire

Tableau X

Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon deux protocoles d'immunisation inversés par voies IM et orale par capsules entériques avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Titres des anticorps spécifiques du VIH par ELISA																
Lapin	Salive			Larmes			S. Vaginales			S. Intestinales			Sérum			
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	
<i>Capsules entériques-intramusculaire (Caps-IM)</i>																
9730-3	64	<4	32	20	80	80	<4	<4	<4	<4	8	<4	100	6 400	1 600	
9729-2	64	<4	32	40	40	160	<4	<4	<4	<4	4	<4	50	1 600	800	
<i>Intramusculaire-capsules entériques (IM-Caps)</i>																
9688-6	4	128	8	40	2 560	40	<4	<4	<4	4	128	4	1 600	102 400	3 200	
9694-7	4	32	8	20	640	40	<4	<4	<4	4	64	4	800	102 400	1 600	
<i>Témoin négatif</i>																
9696-0	16	<4	16	<10	<10	<10	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<50	100	100	

Tableau XI: Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon différents protocoles d'immunisation par voie mucoale-parentérale avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin

Des groupes de lapins femelles "White New Zealand" ont été immunisés selon différents protocoles à interventions mucoale-parentérale avec l'IMS-VIH-1, la dose antigénique étant de 50 µg pour l'IL, 100 µg pour l'IVa, oral et Caps, et 200 µg pour l'IM. Les immunisations mucoales des protocoles IVa-IM, Oral-IM et Caps-IM ont été effectuées 3 fois par semaine durant 3 semaines (jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20 et 22). Ces immunisations ont été suivies par une injection IM au jour 25. Le prélèvement des échantillons a été effectué dix jours après la dernière intervention et le titre des anticorps spécifiques du VIH-1 a été évalué par ELISA. Les lapins du protocole IL-IM ont reçu une seule immunisation IL, par laparotomie, au jour 0, suivie par une injection IM au jour 14. Le prélèvement des échantillons a été effectué dix jours plus tard.

Caps: capsules entériques IL: intraluminal IM: intramusculaire
IVa: intravaginal ND: non déterminé

Tableau XI

**Titres et isotypes des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA selon différents protocoles
d'immunisation par voie mucosale-parentérale
avec l'IMS-VIH-1 chez le lapin**

Titres des anticorps spécifiques du VIH par ELISA															
Lapin	Salive			Larmes			S. Vaginales			S. Intestinales			Sérum		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
<i><u>Intravaginal-intramusculaire (IVa-IM)</u></i>															
9686-8	64	256	64	40	3 200	160	<4	16	<4	8	1 024	8	25 600	512 000	51 200
9687-9	64	64	64	40	1 600	40	<4	8	<4	8	256	8	1 600	204 800	3 200
9648-10	4	128	32	20	2 560	40	<4	<4	<4	<4	256	<4	1 600	409 600	12 800
<i><u>Intraluminal-intramusculaire (IL-IM)</u></i>															
9650-14	32	64	32	20	2 560	40	<4	<4	<4	<4	32	<4	1 600	204 800	25 600
9649-13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<4	64	<4	800	102 400	6 400
<i><u>Oral-intramusculaire</u></i>															
9684-4	32	4	32	ND	ND	ND	<4	<4	<4	<4	4	<4	800	12 800	12 800
9646-5	4	<4	4	<20	20	<20	<4	<4	<4	<4	4	<4	200	1 600	1 600
<i><u>Capsules entériques-intramusculaire (Caps-IM)</u></i>															
9730-3	64	<4	32	20	80	80	<4	<4	<4	<4	8	<4	100	6 400	1 600
9729-2	64	<4	32	40	40	160	<4	<4	<4	<4	4	<4	50	1 600	800

Tableau XII: Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA et évaluation de leur activité neutralisante sur cellules CEM

Des groupes de lapins "White New Zealand" ont été immunisés selon des protocoles à interventions Mucosale (IVa, Caps ou IL)-Intramusculaire -intradermique avec l'IMS-VIH-1. La dose antigénique a été de 50 µg pour l'IL, 100 µg pour l'IVa et Caps, 200 µg pour l'IM et 300 µg pour l>ID. Les immunisations mucosales des protocoles IVa-IM-ID et Caps-IM-ID ont eu lieu 3 fois par semaine durant 3 semaines (jours 0, 2, 7, 9, 13, 15, 17, 20 et 22). Celles-ci ont été suivies par une injection IM au jour 25 et une immunisation ID au jour 90. Pour le protocole IM-Caps-ID, l'injection IM, au jour 0, a précédé les immunisations par capsules entériques effectuées aux jours 15, 17, 20, 22, 24, 31, 34 et 36 et une injection ID au jour 90. Quant au protocole IL-IM-ID, les lapins ont reçu une seule IL au jour 0 suivie par une IM et une ID, aux jours 14 et 70, respectivement. Les prélèvements des échantillons ont été effectués 10 jours après l>ID, à l'exception de l'échantillon de larme qui a été prélevé suite aux immunisations par capsules entériques et à l'homogénat intestinal (IVa-IM) qui a été prélevé dix jours après l'injection IM. Les titres des anticorps spécifiques du VIH-1 ont été déterminés par ELISA et leur pouvoir neutralisant a été évalué selon le test de neutralisation classique sur cellules CEM.

Caps: capsules entériques ID: intradermique IL: intraluminal
 IM: intramusculaire IVa: intravaginal

Tableau XII

**Titres des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA et évaluation
de leur activité neutralisante sur cellules CEM**

Echantillons de lapins		Titre des anticorps spécifiques du VIH par ELISA			Titre en neutralisation sur CEM
		IgA	IgG	IgM	
<i>Sérum (IVa-IM-ID)</i>	9686-8	25 600	1 024 000	25 600	
"	9687-9	12 800	512 000	6 400	320
"	9648-10	12 800	512 000	12 800	
<i>Sérum (IM-Caps-ID)</i>	9688-6	51 200	1 024 000	51 200	80
"	9694-7	51 200	1 024 000	25 600	
<i>Sérum (IL-IM-ID)</i>	9650-14	25 600	1 024 000	25 600	320
<i>Sérum (témoin)</i>	9696-0	<50	100	100	<20
<i>Larmes (IM-Caps)</i>	9688-6	40	2 560	40	80
"	9694-7	20	640	40	
<i>Homogénat intest.</i>	9686-8	8	1 024	8	160
<i>(IVa-IM)</i>	9687-9	16	1 024	16	

Tableau XIII: Titrage du VIH-1 sur la lignée cellulaire HeLa-CD4-LTR-βgal

Les cellules HeLa-CD4-LTR-βgal ont étéensemencées dans des plateaux de 96 puits à raison de 8000 cellules par puit. Suite à une incubation de 12 heures à 37°C, on a ajouté au feuillet cellulaire différentes quantités de virus (2×10^4 à 2×10^5 DITC₅₀). Après deux heures de contact à 37°C l'inoculum viral a été enlevé et l'on a ajouté du milieu DMEM frais additionné de sérum foetal bovin 10% et d'antibiotiques (G418 et hygromycine). Les plateaux ont été alors incubés pendant 48 heures à 37°C sous atmosphère de 5% de CO₂. Au deuxième jour les feuillets cellulaires ont été fixés puis mis en contact avec une solution de coloration: PBS, ferrocyanure de potassium (0,2 M), ferricyanure de potassium (0,2 M), chlorure de magnesium (2,0 M) et X-gal (40 mg/mL). Cette coloration a révélé la présence d'aggrégats de cellules infectées par le VIH qui montrent une couleur bleue sous le microscope optique.

Tableau XIII**Titration du VIH-1 sur la lignée cellulaire HeLa-CD4-LTR-βgal**

DICT₅₀	2x10⁴	4x10⁴	1x10⁵	2x10⁵
Nombre de particules infectieuses par cupule	500	1000	2500	5000
Nombre d'agrégats de cellules bleues infectées	3	10	48	95
	7	11	49	108
	6	9	50	109
	4	9	48	113
Moyenne d'agrégats de cellules infectées	5	10	49	107

Tableau XIV: Evaluation de l'activité neutralisante des anticorps spécifiques du VIH-1 utilisant la lignée cellulaire HeLa-CD4-LTR- β gal

Les cellules HeLa-CD4-LTR- β gal ont été ensemencées dans des plateaux de 96 puits à raison de 8000 cellules par puit. Suite à une incubation de 12 heures à 37°C, on a ajouté au feuillet cellulaire l'inoculum neutralisé soit 25 μ L d'antisérum (des dilutions par 2) et un volume égal de virus à 1×10^5 DICT₅₀, préalablement mis en contact pendant une heure à 37°C. Le test s'est poursuivi tel que décrit au paragraphe 7.3.2 de la section Matériel et Méthodes.

Les témoins:

Témoin virus: vérifie l'interaction entre les cellules HeLa-CD4-LTR- β gal et le VIH. Il indique le nombre maximal d'aggrégats cellulaires infectés dans un test donné.

Témoin cellules: indique le nombre minimal d'aggrégats cellulaires non-infectés dans un test donné.

Sérum de lapin témoin négatif: vérifie l'interaction entre les cellules HeLa-CD4-LTR- β gal et le sérum de lapin.

ID: intradermique

IM: intramusculaire

IVa: intravaginal

Tableau XIV

**Evaluation de l'activité neutralisante des anticorps spécifiques
du VIH-1 utilisant la lignée cellulaire HeLa-CD4-LTR-βgal**

Dilution des séra	Nombre d'aggrégats cellulaires infectés			moyenne
<i>sérum témoin positif</i>				
1/20	17	18	14	16
1/40	23	26	30	26
1/80	34	31	37	34
1/160	44	29	40	38
1/320	37	41	44	41
1/640	45	40	43	43
<i>sérum témoin négatif</i>				
1/20	18	14	19	17
1/40	28	24	15	22
1/80	33	20	29	27
1/160	38	36	30	35
1/320	36	32	33	34
1/640	54	29	43	42
<i>Témoin virus</i>				
---	34	35	47	39
<i>Témoin cellules</i>				
---	0	1	5	3

BIBLIOGRAPHIE

ADACHI, A., S. KOENIG, H.E. GENDELMAN, D. DAUGHERTY, S. GATTONI-CELLI, A.S. FAUCI and M.A. MARTIN. 1987. Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 61: 209-213.

AHMAD, S., Z. EL-AMAD, L. GIAVEDONI, M. MARTHAS, N.L. HAIGWOOD, J. KILPATRICK, C.J. SCANDELLA, M.B. GARDNER, P.A. LUCIW, and T. YILMA. 1993. Immune response of rhesus macaques to recombinant SIV gp160 does not protect from challenge infection. In: *Vaccine 93, Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS*, H.S. Ginsberg, F. Brown, R.M. Chanock and R.A. Lerner (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., USA, pp. 57-62.

ALDOVINI, A., and R.A. YOUNG. 1991. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature (London)* 351: 479-482.

ALEXANDER, N.J. 1988. Heterosexual transmission of AIDS. *American J. Repr. Immunol.* 16: 163-164.

ALEXANDER, N.J. 1990. Sexual transmission of human immunodeficiency virus: virus entry into the male and female genital tract. *Fertility and sterility* 54: 1-18.

ALISON, M., S. WAIN-HOBSON, L. MONTAGNIER and P. SONIGO. 1986. Genetic variability of the AIDS virus: Nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell* 46: 63-74.

AMERONGEN, H.M., R. WELTZIN, C.M. FARNET, P. MICHETTI, W.A. HASELTINE, and M.R. NEUTRA. 1991. Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *J. Acqu. Imm. Def. Synd.* 4: 760-765.

ANDERSON, D.J. and J. PUDNEY. 1992. Mucosal immune defense against HIV-1 in the male urogenital tract. *Vacc. Res.* 1: 143-150.

ANDRE, C., R. LAMBERT, H. BAZIN and J.F. HEREMANS. 1974. Interference of oral immunization with the intestinal absorption of heterologous albumine. *Eur. J. Immunol.* 4: 701-704.

ARYA, S.K., G. GUO, S.F. JOSEPH and F. WONG-STAAAL. 1985. *Trans-activator* gene of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Science* 229: 69-73.

ASJÖ, B., I. IVHED, M. GIDLUND, S. FUERSTENBERG, E.M. FENYÖ, K. NILSSON, and H.W. WIGZELL. 1987. Susceptibility to infection by the human immunodeficiency virus (HIV) correlates with T4 expression in a parental monocytoid cell line and its subclones. *Virology* 157: 359-365.

BARRE-SINOUSI, F., J.C. CHERMANN, F. REY, M.T. NUGEYRE, S. CHERMANN, J. GRUEST, C. DAUGUET, C. AXLER-BLIN, F. VEZINET-BRUN, C. ROUZIOUX, W. ROSENBAUM and L. MONTAGNIER. 1983. Isolation of a T. lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.

BENKO, D.M., S. SCHWARTZ, G.N. PAVLAKIS, and B.K. FELBER. 1990. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins. *J. Virol.* 64: 2505-2518.

BENVENISTE, R.E., L.O. ARTHUR, C.C. TSAI, R. SOWDER, T.D. COPELAND, L.E. HENDERSON and S. OROSZLAN. 1986. Isolation of a lentivirus from a macaque with lymphoma: comparison with HTLV-III/LAV and other lentiviruses. *J. Virol.* 60: 483-490.

BERMAN, P.W., T.J. GREGOY, L. RIDDLE, G.R. NAKAMURA, M.A. CHAMPE, J.P. PORTER, F.M. WURM, R.D. HERSHBERG, E.K. DOBB, and J.W. EICHBERG. 1990. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature (London)* 345: 622-625.

BESREDKA, A. 1919. De la vaccination contre les états typhoïdes par voie buccale. *Annales de l'Institut Pasteur* 1: 882-903.

BHAT, S., S.L. SPITALNIK, F. GONZALEZ-SCARANO, and D.H. SILBERBERG. 1991. Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7131-7134.

BIENENSTOCK, J., and A.D.B. BEFUS. 1980. Mucosal immunology. *Immunology* 41: 249-270.

BÖHNLEIN, E., J.W. LOWENTHAL, M. SIEKEVITZ, D.W. BALLARD, B.R. FRANZA, and W.C. GREENE. 1988. The same inducible nuclear proteins regulate mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV. *Cell* 53: 827-856.

BOLOGNESI, D.P. 1990. Immunobiology of the human immunodeficiency virus envelope and its relationship to vaccine strategies. *Mol. Biol. Med.* 7: 1-15.

BÖTTIGER, B., A. KARLSSON, P. ANREASSO, A. NAUCIER, C. MENDES COSTA, E. NORRBY, and G. BIBERFELD. 1990. Envelope cross-reactivity between human immunodeficiency virus types 1 and 2 detected by different serological methods: correlation between cross-neutralization and reactivity against the main neutralizing site. *J. Virol.* 64: 3492-3499.

BOURINBAIAR, A.S., and D.M. PHILLIPS. 1991. Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *J. Acq. Imm. Def. Synd.* 4: 56-63.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

BRANDTZAEG, P. 1989. Overview of the mucosal immune system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 146: 13-25.

BRAY, M.A., D. GORDON, and J. MORLEY. 1974. Role of prostaglandins in reactions of cellular immunity. *Br. J. Pharmacol.* 52: 453.

BROLIDEN, P.A., K. LJUNGGREN, J. HINKULA, E. NORRBY, L. AKERBLOM, and B. WAHREN. 1990. A monoclonal antibody to HIV-1 mediating cellular cytotoxicity (ADCC) and neutralisation. *J. Virol.* 64: 936-940.

BURR, D.H., D.T. KERNER, C.S. BLANCO, A.L. BOURGEOIS. 1987. Gastric lavage: a simple method to obtain IgA-rich intestinal secretions from the rabbit. *J. Immunol. Meth.* 99: 277-281.

CALLEBAUT, C., B. KURST, E. JACOTOT, A.G. HOVANESSIAN. 1993. T-cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4⁺ cells. *Science* 262: 2045-2050.

CAO, Y.Z., A.E. FRIEDMAN-KIEN, Y.X. HUANG, X.L. LI, M. MIRABILE, T. MOUDGIL, D. ZUCKER-FRANKLIN and D.D. HO. 1990. T4-independent, productive human immunodeficiency virus type 1 infection of hepatoma cell lines *in vitro*. *J. Virol.* 64: 2553-2559.

CARLSON, J.R., T.P. MCGRAW, E. KEDDIE, M.B. JENNINGS, J.L. YEE, A.J. LANGLOIS, R. DICKOVER, R. DONOVAN, A. ROSENTHAL, P.A. LUCIW, and M.B. GARDNER. 1990. Vaccine protection of rhesus macaques against

Simian immunodeficiency virus infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**: 1239-1246.

CHANG, N.T., P.K. CHANDA, A.D. BARONE, S. MCKINNEY, D.P. RHODES, S.H. TAM, C.W. SHEARMAN, J. HUANG, T.W. CHANG, R.C. GALLO, and F. WONG-STAAAL. 1985. Expression in *Escherichia coli* of open reading frame gene segment of HTLV-III. *Science* **228**: 93-96.

CHANH, T.C., G.R. DREESMAN, and R.C. KENNEDY. 1987. Monoclonal anti-idiotypic antibody mimics the CD4 receptor and binds human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 3891-3895.

CHENG-MAYER, C., D. SETO, M. TATENO and J.A. LEVY. 1988. Biologic features of HIV that correlates with virulence in the host. *Science* **240**: 80-82.

CHENG-MAYER, C., J.T. RUTKA, M.L. ROSENBAUM, T. MCHUGH, D.P. STILES and J.A. LEVY. 1987. The human immunodeficiency virus (HIV) can productively infect cultured human glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 3526-3530.

CHILDERS, N.K., M.G. BRUCE, and J.A. MCGHEE. 1989. Molecular mechanisms of immunoglobulin A defense. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**: 503-536.

CHILDERS, N.K., F.R. DENYS, N.F. MCGEE, and S.M. MICHALEK. 1990. Ultrastructural study of liposome uptake by M cells of rat Peyer's patch: an oral vaccine system for delivery of purified antigen. *Reg. Immunol.* **3**: 8-16.

CLAPMAN, P.R., R.A. WEISS, A.G. DALGLEISH, M. EXLEY, D. WHIBY, and N. HOGG. 1987. Human immunodeficiency virus infection of monocytic and T-lymphocytic cells: receptor modulation and differentiation induced by phorbol ester. *Virology* **158**: 44-51.

CLAVERIE, J.M., P. KOURILSKY, P. LANGLADE-DEMOYEN, P. CHALUFOUR-PROCHNICKA, G. DADAGLIO, F. TEKAIA, F. PLATA, and L. BOUQUELERET. 1988. T-immunogenic peptides are constituted of rare sequence patterns. Use in the identification of T epitopes in the human immunodeficiency virus gag protein. *Eur. J. Immunol.* **18**: 1547-1553.

CLERICI, M., D.R. LUCEY, R.A. ZAJAC, R.N. BOSWELL, H.M. GEBEL, H. TAKAHASHI, J.A. BERZOFSKY, and G.M. SHEARER. 1991. Detection of cytotoxic T lymphocytes specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individuals. *J. Immunol.* **146**: 2214-2219.

COFFIN, J., A. HAASE, J.A. LEVY, L. MONTAGNIER, S. OROSZIAN, N. TEICH, H. TEMIN, K. TOYOSHIMA, H. VARMUS, P. VOGT, and R. WEISS. 1986. What to call the AIDS virus? *Nature (London)* 321: 10.

COUTSINOS, Z. et L. THIBODEAU. 1993. Induction d'une immunité mucoale anti-VIH chez les animaux de laboratoire. Dans: Recueil des Résumés de Communications. *Annales de l'Acfas* 61: 38.

CRAIG, S.W., and J.J. CEBRA. 1971. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.* 134: 188-200.

CRANAGE, M.P., A. BASKERVILLE, L.A.E. ASHWORTH, M. DENNIS, N. COOK, R. COOK, S.A. SHARPE, J. ROSE, P. KITCHIN, and P.J. GREENAWAY. 1992a. Mucosal infection and vaccine studies with macaque SIV. *Vacc. Res.* 1: 311-318.

CRANAGE, M.P., J. STOTT, K. MILLS, T. ASHWORTH, F. TAFFS, G. FARRAR, L. CHAN, M. DENNIS, P. PUTKONEN, G. BIBERFELD, M. MURPHEY-CORB, M. PAGE, A. BASKERVILLE, P. KITCHIN, and P. GREENAWAY. 1992b. Vaccine studies with the ³²H reisolate of SIVmac251: an overview. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1479-1481.

CRANAGE, M.P., A. BASKERVILLE, L.A.E. ASHWORTH, M. DENNIS, N. COOK, S. SHARPE, G. FARRA, J. ROSE, P.A. KITCHIN, and P.J. GREENAWAY. 1992c. Intrarectal challenge of macaques vaccinated with formalin-inactivated simian immunodeficiency virus. *Lancet* 339: 273-274.

CROWL, R., K. GANGULY, M. GORDON, R. CONROY, M. SCHABER, R. KRAMER, G. SHAW, F. WONG-STAAAL, and E.P. REDDY. 1985. HTLV-III *env* gene products synthesized in *E. coli* are recognized by antibodies present in the sera of AIDS patients. *Cell* 41: 979-986.

CULMANN, B., E. GOMARD, M.-P. KIENY, B. GUY, F. DREYFUS, A.-G. SAIMOT, D. SERENI, D. SICARD, and J.-P. LEVY. 1991. Six epitopes reacting with human cytotoxic CD8⁺ T cells in the central region of the HIV-1 *nef* protein. *J. Immunol.* 146: 1560-1565.

CULMANN, B., E. GOMARD, M.-P. KIENY, B. GUY, F. DREYFUS, A.-G. SAIMOT, D. SERENI, and J.-P. LEVY. 1989. An antigenic peptide of the HIV-1 NEF protein recognized by cytotoxic T lymphocytes of seropositive individuals in association with different HLA-B molecules. *Eur. J. Immunol.* 19: 2383-2386.

DADAGLIO G., A. LEROUX, P. LANGLADE-DEMOYEN, E.M. BAHRAOUI, F. TRAINCARD, R. FISHER, and F. PLATA. 1991. Epitope recognition of conserved HIV envelope sequences by human cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 147: 2302-2309.

DALGLEISH, A.G., B.J. THOMSON, T.C. CHANH, M. MALKOVSKY, and R.C. KENNEDY. 1987. Neutralization of HIV isolates by anti-idiotypic antibodies which mimic the T4 (CD4) epitope: a potential AIDS vaccine. *Lancet* 2: 1047-1050.

DALGLEISH, A.G., P.C. BEVERLEY, P.R. CLAPHAM, D.H. CRAWFORD, M.F. GREAVES and R.A. WEISS. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature (London)* 312: 763-767.

DALGLEISH, A.G., T.C. CHANH, R.C. KENNEDY, P. KANDA, R.R. CLAPHAM, and R.A. WEISS. 1988. Neutralization of diverse HIV-1 strains by monoclonal antibodies raised against a gp41 synthetic peptide. *Virology* 165: 209-215.

DANIEL, M.D., F. KIRCHHOFF, S.C. CZAJAK, P.K. SEHGAL, and R.C. DESROSIERS. 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258: 1938-1941.

DANIEL, M.D., N.L. LETVIN, N.W. KING, M. KANNAGI, P.K. SEHGAL, R.D. HUNT, P.J. KANKI, M. ESSEX and R.C. DESROSIERS. 1985. Isolation of a T-Cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* 228: 1201-1204.

DAYTON, A.I., J.G. SODROSKI, C.A. ROSEN, W.C. GOH and W.A. HASELTINE. 1986. The *trans*-activator lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* 44: 941-947.

DESAI, S.M., V.S. KALYANARAMAN, J.M. CASEY, A. SRINIVASAN, P.R. ANDERSON, and S.G. DEVARE. 1986. Molecular cloning and primary nucleotide sequence analysis of a distinct human immunodeficiency virus isolate reveal significant divergence in its genomic sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8380-8384.

DESROSIERS, R.C. 1992. HIV with multiple gene deletions as a live attenuated vaccine for AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 411-421.

DESROSIERS, R.C, M. WYAND, T. KODAMA, D. RINGLER, L. ARTHUR, P. SEHGAL, N. LETVIN, N. KING, and M. DANIEL. 1989. Vaccine protection

against Simian immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6353-6357.

DEWHURST, S., K. SAKAI, J. BRESSER, M. STEVENSON, M.J. EVINGER-HODGES and D.J. VOLSKY. 1987. Persistent productive infection of human glial cells by human immunodeficiency virus (HIV) and by infectious molecular clones of HIV. *J. Virol.* 61: 3774-3782.

DI MARZO, F., F.D. VERONESE, T.D. COPELAND, A.L. DE VICO, R. RAHMAN, S. OROSZLAN, R.C. GALLO and M.G. SARNGADHARAN. 1986. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* 231: 1289-1291.

DOUGHERTY J.P. and H.M. TEMIN. 1988. Determination of the rate of base-pair substitution and insertion mutations in retrovirus replication. *J. Virol.* 62: 2817-2822.

DOUGLAS, G.C., and B.F. KING. 1992. Maternal-fetal transmission of human immunodeficiency virus: a review of possible routes and cellular mechanisms of infection. *Clin. Inf. Dis.* 15: 678-691.

DURDA, P.J., L. BACHELER, P. CLAPHAM, A.M. JENOSKI, B. LEECE, T.J. MATTHEWS, A. McKNIGHT, R. POMERANTZ, M. RAYNER, and K.J. WEINHOLD. 1990. HIV-1 neutralizing monoclonal antibodies induced by a synthetic peptide. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6: 1115-1123.

EARL, P.L., R.W. DOMS, and B. MOSS. 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 648-652.

EDWARDS, J.N.T., and H.B. MORRIS. 1985. Langerhans cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 92: 974-982.

EVANS, D.J., J. McKEATING, J.M. MEREDITH, K.L. BURKE, K. KATRAK, A. JOHN, M. FERGUSON, P.D. MINOR, R.A. WEISS, and J.W. ALMOND. 1989. An engineered poliovirus chimera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature (London)* 339: 385-388.

FAUCI, A.S. 1988. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239: 617-622.

FENYO, E.M., L. MORFELDT-MANSON, F. CHIODI, B. LIND, A. VON GEGERFELT, J. ALBERT, E. OLAUSSON, and B. ASJO. 1988. Distinct

replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J. Virol.* 62: 4414-4419.

FISHER, A.G., B. ENSOLI, D. LOONEY, A. ROSE, R.C. GALLO, M.S. SAAG, G.M. SHAW, B.H. HAHN, and F. WONG-STAAAL. 1988. Biological diverse molecular variants within a single HIV-1 isolate. *Nature (London)* 334: 444-447.

FISHER, A.G., B. ENSOLI, L. IVANOFF, M. CHAMBERLAIN, S. PETTEWAY, L. RATNER, R.C. GALLO and F. WONG-STAAAL. 1987. The *sor* gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission *in vitro*. *Science* 237: 888-893.

FISHER, A.G., L. RATNER, H. MITSUYA, L.M. MARSELLE, M.E. HARPER, S.BRODER, R.C. GALLO, and F. WONG-STAAAL. 1986b. Infections mutants of HTLV-III with changes in the 3' region and markedly reduced cytopathic effects. *Science* 223: 655-659.

FISHER, A.G., M.B. FEINBERG, S.F. JOSEPH, M.E. HARPER, L.M. MARSELLE, G. REYES, M.A. GONDA, A. ALDOVINI, C. DEBOUK, R.C. GALLO, and F. WONG-STAAAL. 1986a. The *trans*-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature (London)* 320: 367-371.

FOLEY, G.E., H. LAZARUS, S. FARBER, B.G. UZMAN, B.A. BOONE, and R.E. McCARTHY. 1965. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 18: 522-529.

FORREST, B.D. 1992. The need for consideration of mucosal immunity in vaccine approaches to AIDS. *Vacc. Res.* 1: 137-142.

FUERST, T.R., V.F. DE LA CRUZ, G.P. BANSAL, and C.K. STOVER. 1992. Development and analysis of recombinant BCG vector systems. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1451-1455.

FULTZ, P.N., H.M. McCLURE, H. DAUGHARTY, A. BRODIE, C.R. McGRATH, B. SWENSON, and D.P. FRANCIS. 1986. Vaginal transmission of human immunodeficiency virus (HIV) to a chimpanzee. *J. Inf. Dis.* 154: 896-900.

FULTZ, P.N., P. NARA, F. BARRE-SINOUSI, A. CHAPUT, M.L. GREENBERG, E. MUCHMORE, M.P. KIENY, and M. GIRARD. 1992. Vaccine protection of chimpanzees against challenge with HIV-1-infected peripheral blood mononuclear cells. *Science* 256: 1687-1690.

FUNG, M.S.C., C.R.Y. SUN, R.S. LIOU, W. GORDON, N.T. CHANG, T.W. CHANG, and N.C. SUN. 1990. Monoclonal anti-idiotypic antibody mimicking

the principal neutralization site in HIV-1 gp120 induces HIV-1 neutralizing antibodies in rabbits. *J. Immunol.* 145: 2199-2206.

GALLO, R.C., S.Z. SALAHUDDIN, M. POPOVIC, G.M. SHEARER, M. KAPLAN, B.F. HAYNES, T.J. PALKER, R. REDFIELD, J. OLESKE, B. SAFAI, G. WHITE, P. FOSTER, and P.D. MARKHAM. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.

GARDNER, M.B. 1991. Mini-review. Simian and feline immunodeficiency viruses: animal lentivirus models for evaluation of AIDS vaccines and antiviral agents. *Antiviral Research* 15: 267-286.

GARDNER, M.B. and P.A. LUCIW. 1989. Animal models of AIDS. *FASEB J.* 3: 2593-2606.

GELDERBLOM, H.R., E.H.S. NAUSMANN, N. OZEL, G. PAULI, and M.A. KOCH. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156: 171-176.

GELDERBLOM, H.R., M. OZEL and G. PAULI. 1989. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch. Virol.* 106: 1-13.

GIAVEDONI, L.D., V. PLANELLES, N.L. HAIGWOOD, S. AHMAD, J.D. KLUGE, M.L. MARTHAS, M.B. GARDNER, P.A. LUCIW, and T.D. YILMA. 1993. Immune response of rhesus macaques to recombinant simian immunodeficiency virus gp 130 does not protect from challenge infection. *J. Virol.* 67: 577-583.

GIRARD, M., J. MAHONEY, L. RIMSKY, F. BARRE-SINOUSSE, E. MUCHMORE, K. WEINHOLD, and P. FULTZ. 1992. HIV-1 genital infection : a chimpanzee model. "Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases". Septième Colloque des Cent Gardes pp. 75-79.

GIRARD, M., L. HIRTH, G. LEBEURIER and J. WITZ. 1989. "Les Rétroïdes". Dans: *Virologie Moléculaire*. Doin Editeurs, Paris: pp. 409-446.

GIRARD, M., M.P. KIENY, A. PINTER, F. BARRE-SINOUSSE, P. NARA, H. KOLBE, K. KUSUMI, A. CHAPUT, T. REINHART, E. MUCHMORE, J. RONCO, M. KACZOREK, E. GUMARD, J.C. GLUCKMAN, and P.N. FULTZ. 1991. Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 542-546.

GOLDING, H., G.M. SHEARER, K. HILLMAN, P. LUCAS, J. MANISCHEWITZ, R.A. ZAJAC, M. CLERICI, R.E. GRESS, R.N. BOSWELL, and B.GOLDING. 1989. Common epitope in human immunodeficiency virus (HIV) 1-gp41 and HLA class II elicits immunosuppressive autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV 1-infected individuals. *J. Clin. Invest.* 83: 1430-1435.

GONDA, M.A., F. WONG-STAAAL, R.C. GALLO, J.E. CLEMENTS, O. NARAYTAN, and R.V. GILDEN. 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227: 173-177.

GONDA, M.A., M.J. BRAUN, J.E. CLEMENTS, J.M. PYPER, F. WONG-STAAAL, R.C. GALLO, and R.V. GILDEN. 1986. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4007-4011.

GONDA, M.A., M.J. BRAUN, S.G. CARTER, T.A. KOST, J.W. Jr. BESS, L.O. ARTHUR, and M.T. VAN DER MAATEN. 1987. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature (London)* 330: 388-391.

GORNY, M.K., V. GIANAKAKOS, S. SHARFE, and S. ZOLLA-PAZNER. 1989. Generation of human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1624-1628.

GORNY, M.K., J.Y. XU, V. GIANAKAKOS, S. KARWOWSKA, C. WILLIAMS, H.W. SHEPPARD, C.V. HANSON, and S. ZOLLA-PAZNER. 1991. Production of site-selected neutralizing human monoclonal antibodies against the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3238-3242.

GOTCH, F.M., D.F. NIXON, N. ALP, A.J. McMICHAEL, and L.K. BORYSIEWICZ. 1990. High frequency of memory and effector gag-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV seropositive individuals. *Int. Immunol.* 2: 707-712.

GOTTLIEB, M.S., R. SCHROFF, H.M. SCHANKER, J.D. WEISMAN, P.T. FAN, R.A. WOLF, and A. SAXON. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305: 1425-1431

GOUDSMIT, J., C.A.B. BOUCHER, R.H. MELOEN, L.G. EPSTEIN, L. SMIT, L. Van der HOEK, and M. BAKKER. 1988. Human antibody response to a strain

specific HIV-1 gp120 epitope associated with cell fusion inhibition. *AIDS* 2: 157-164.

GRAY, F. 1989. Les lésions du système nerveux central au cours du SIDA. *Médecine/Sciences* 5: 145-151.

GREENE, W.C. 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324: 308-317.

GREENE, W.C., E. BÖHNLEIN, and D.W. BALLARD. 1989. HIV-1, HTLV-1 and normal T cell growth: transcriptional strategies and surprises. *Immunol. Today* 10: 272-278.

GRIFFITHS, J.C., E.L. BERRIE, L.N. HOLDSWORTH, J.P. MOORE, S.J. HARRIS, J.M. SENIOR, S.M. KINGSMAN, A.J. KINGSHAN, and S.E. ADAMS. 1991. Induction of high-titer neutralizing antibodies, using hybrid human immunodeficiency virus V3-Ty viruslike particles in a clinically relevant adjuvant. *J. Virol.* 65: 450-456.

GRIMALDI, L.M.E., G.V. MARTINO, D.M. FRANCIOTTA, R. BRUSTIA, A. CASTAGNA, R. PRISTERA, and A. LAZZARIN. 1991. Elevated alpha-tumor necrosis factor levels in spinal fluid from HIV-1-infected patients with central nervous system involvement. *Ann. Neurol.* 29: 21-25.

GRZYCH, J.M., M. CAPRON, P.H. LAMBERT, C. DISSOUS, S. TORRES, and A. CAPRON. 1985. An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature (London)* 316: 74-76.

GUPTA, P., R. BALACHANDRAN, M. HO, A. ENRICO, and C. RINALDO. 1989. Cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of azidothymidine and neutralizing antibody. *J. Virol.* 63: 2361-2365.

HADIDA, F., A. PARROT, M.P. KIENY, B. SADAT-SOWTI, C. MAYNAUD, P. DEBRE, and B. AUTRAN. 1992. Carboxyl-terminal and central regions of human immunodeficiency virus-1 NEF recognised by cytotoxic T lymphocytes from lymphoid organs. *J. Clin. Invest.* 89: 53-60.

HAHN, B.H., G.M. SHAW, S.K. ARYA, M. POPOVIC, R.C. GALLO and F. WONG-STAAAL. 1984. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature (London)* 312: 166-169.

HAHN, B.H., M.A. GONDA, G.M. SHAW, M. POPOVIC, J.A. HOXIE, R.C. GALLO and F. WONG-STAAAL. 1985. Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: Different viruses exhibit

greatest divergence in their envelope genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4813-4817.

HAIGWOOD, N.L., J.R. SHUSTER, G.K. MOORE, H. LEE, P.V. SKILES, K.W. HIGGINS, P.J. BARR, C. GEORGE-NASCIMENTO, and K.S. STEIMER. 1990. Importance of hypervariable regions of HIV-1 gp120 in the generation of virus neutralizing antibodies. AIDS Res. Hum. Retroviruses 6: 855-869.

HAIGWOOD, N.L., P.L. NARA, E. BROOKS, G.A. VAN NEST, G. OTT, K.W. HIGGINS, N. DUNLOP, C.J. SCANDELLA, J.W. EICHBERG, and K.S. STEIMER. 1992. Native but not denatured recombinant human immunodeficiency virus type 1 gp120 generates broad-spectrum neutralizing antibodies in baboons. J. Virol. 66: 172-182.

HAMMOND, S.A., E. OBAH, P. STANHOPE, C.R. MONELL, M. STRAND, F.M. ROBBINS, W.B. BIAS, R.W. KARR, S. KOENIG, and R.F. SILICIANO. 1991. Characterization of a conserved T cell epitope in HIV-1 gp41 recognized by vaccine-induced human cytolytic T cells. J. Immunol. 146: 1470-1477.

HANSEN, J., H. CLAUSEN, C. NIELSEN, L. TEGLBJOERG, L. HANSEN, C. NIELSEN, E. DABELSTEEN, L. MATHIESEN, S. HAKOMORI, and J. NIELSEN. 1990. Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) infection *in vitro* by anticarbohydrate monoclonal antibodies: peripheral glycosylation of HIV envelope glycoprotein gp120 may be a target for virus neutralization. J. Virol. 64: 2833-2840.

HANSEN, J.E.S., C. NIELSEN, M. ARENDRUP, S. OLOFSSON, L. MATHIESEN, J.O. NIELSEN, and H. CLAUSEN. 1991. Broadly neutralizing antibodies targeted to mucin-type carbohydrate epitopes of human immunodeficiency virus. J. Virol. 65: 6461-6467.

HAROUSE, J.M., C. KUNSCH, H.T. HARTLE, H.A. LAUGHLIN, J.A. HOXIE, B. WIGDAHL, and F. GONZALEZ-SCARANO. 1989. CD4-independent infection of human neural cells by human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 63: 2527-2533.

HAROUSE, J.M., S. BHAT, S.L. SPITALNIK, M. LAUGHLIN, K. STEFANO, D.H. SILBERBERG, and F. GONZALEZ-SCARANO. 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. Science 253: 320-323.

HAYNES, B.F. 1993. Scientific and social issues of human immunodeficiency virus vaccine development. Science 260: 1279-1286.

HIRSCH, M.S. and J. CURRAN. 1990. "Human immunodeficiency viruses: Biology and medical aspects". In: Fields, B.N., D.M. Knipe (ed.): *Virology*, 2nd ed. Raven Press, New York: 1545-1570.

HOMSY, J., K. STEIMER, and R. KASLOW. 1987. Toward an AIDS vaccine: challenges and prospects. *Immunol. Today* **8**: 193-196.

HOSMALIN, A., M. CLERICI, R. HOUGHTEN, C.D. PENDLETON, C. FLEXNER, D.R. LUCEY, B. MOSS, R.N. GERMAIN, G.M. SHEARER, J.A. BERZOFKY. 1990. An epitope in human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase recognised by both mouse and human cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2344-2348.

HOYOS, B., D.W. BALLARD, E. BÖHNLEIN, M. SIEKEVITZ, and W.C. GREENE. 1989. Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of the human interleukin-2 gene expression. *Science* **244**: 457-460.

HU, S.L., K. ABRAMS, G.N. BARBER, P. MORAN, J.M. ZARLING, A.J. LANGLOIS, L.R. KULLER, W.R. MORTON, and R.E. BENVENISTE. 1992. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science* **255**: 456-459.

HU, S.-L., P.N. FULTZ, H.M. McCLURE, J.W. EICHBER, E.K. THOMAS, J. ZARLING, M.C. SINGHAL, S.G. KOSOWSKI, R.B. SWENSON, D.C. ANDERSON, and G. TODARO. 1987. Effect of immunization with a vaccinia-HIV *env* recombinant on HIV infection of chimpanzees. *Nature (London)* **328**: 721-723.

JACKSON, S., J. MESTECHY, N.K. CHILDERS, and S.M. MICHALEK. 1990. Liposomes containing anti-idiotypic antibodies: an oral vaccine to induce protective secretory immune responses specific for pathogens of mucosal surfaces. *Infect. Immun.* **58**: 1932-1936.

JAVAHERIAN, K., A.J. LANGLOIS, G.J. LaROSA, A.T. PROFY, D.P. BOLOGNESI, W.C. HERLIHY, S.D. PUTNEY, and T.J. MATTHEWS. 1992. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* **250**: 1590-1593.

JAVAHERIAN, K., A.J. LANGLOIS, S. SCHMIDT, M. KAUFMAN, N. CATES, J.P. LANGIJK, R.H. MELOEN, R.C. DESROSIERS, D.R. BURNS, D.P. BOLOGNESI. 1992. The principal neutralising determinant of simian immunodeficiency virus differs from that of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1418-1422.

JOHNSON, P.R., D.C. MONTEFIORI, S. GOLDSTEIN, T.E. HAMM, Y. ZHOU, S. KITOV, N.L. HAIGWOOD, L. MISHER, W.T. LONDON, J.L. GERIN, A. ALLISON, R.H. PURCELL, R.M. CHANOK, and J.M. HIRSCH. 1992a. Inactivated whole-virus vaccine derived from a proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus induces high levels of neutralizing antibodies and confers protection against heterologous challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2175-2179.

JOHNSON, P.R., S. GOLDSTEIN, T.E. HAMM, S. KOTOV, W.T. LONDON, P.R. GERIN, R.H. PURCELL, R.M. CHANOCK, V.M. HIRSCH, D.C. MONTEFIORI, J. ZHOU, N.L. HAIGWOOD, L. MISHER, and A. ALLISON. 1992b. In: *Vaccines 92: Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS*. F. Brown, R.M. Chanock, H.S. Ginsberg and R.A. Lerner (eds.). Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York, USA: pp. 95-102.

JOHNSON, R.P., A. TROCHA, L. YANG, G.P. MAZZARA, D.L. PANICALI, T.M. BUCHANAN, and B.D. WALKER. 1991. HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes recognize multiple highly conserved epitopes. Fine specificity of the gag-specific response defined by using unstimulated peripheral blood mononuclear cells and cloned effector cells. *J. Immunol.* **147**: 1512-1521.

JOHNSON, R.P., A. TROCHA, T.M. BUCHANAN, and B.D. WALKER. 1992c. Identification of overlapping HLA class 1-restricted cytotoxic T cell epitopes in a conserved region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: definition of minimum epitopes and analysis of the effects of sequence variation. *J. Exp. Med.* **175**: 961-971.

KAETZEL, C.S., J.K. ROBINSON, K.R. CHINTALACHARUVU, J.P. VAERMAN, and M.E. LAMM. 1991. The polymeric immunoglobuline receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8796-8800.

KANG, C.Y., P. NARA, S. CHAMAT, V. CARAI, T. RYSKAMP, N. HAIGWOOD, R. NEWMAN, and H. KÖHLER. 1991. Evidence for non-V3-specific neutralizing antibodies that interfere with gp120/CD4 binding in human immunodeficiency virus 1-infected humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 6171-6175.

KARPATKIN, S., and M. NARDI. 1992. Autoimmune anti-HIV-1 gp120 antibody with antiidiotype-like activity in sera and immune complexes of HIV-1-related immunologic thrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* **89**: 356-364.

KARPATKIN, S., M.A. NARDI, and Y.H. KOURI. 1992. Internal-image anti-idiotypic HIV-1 gp120 antibody in human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-seropositive individuals with thrombocytopenia. *Proc. Natl. Sci. USA* **89**: 1487-1491.

KAST, W.M., L. ROUX, J. CURREN, H.J.J. BLOM, A.C. VOORDOUW, R.H. MELOEN, D. KOLAKOSKY, and C.J.M. MELIEF. 1991. Protection against lethal Sendai virus infection by *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2283-2287.

KATZENSTEIN, D.A., L.K. VUJCIC, A. LATIF, R. BOULOS, N.A. HALSEY, T.C. QUINN, S.C. RASTOGI, and G.V. QUINNAN. 1990. Human immunodeficiency virus neutralizing antibodies in sera from North Americans and Africans. *J. AIDS* **3**: 810-816.

KENEALY, W.R., T.J. MATTHEWS, M.C. GANFIELD, A.J. LANGLOIS, D.M. WASELEFSKY, and S.R. PETTEWAY Jr. 1989. Antibodies from human immunodeficiency virus-infected individuals bind to a short amino acid sequence that elicits neutralizing antibodies in animals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**: 173-182.

KENNEDY, R.C., J.W. EICHBERG, R.E. LANFORD, and G.R. DREESHAM. 1986. Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science* **232**: 220-223.

KENNEDY, R.C., and R. ATTANASIO. 1990. Concepts of idiotypic-based vaccines for hepatitis B virus and human immunodeficiency virus. *Can. J. Microbiol.* **36**: 811-816.

KESTLER, H.W. III, D.J. RINGLER, K. MORI, D.L. PANICALI, P.K. SEHGAL, M.D. DANIEL, and R.C. DESROSIERS. 1991. Importance of the *nef* gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**: 651-662.

KESTLER, H.W. III, Y. LI, Y.M. NAIDU, C.V. BUTLER, M.F. OCHS, G. JAENEL, N.W. KING, M.D. DANIEL and R.C. DESROSIERS. 1988. Comparison of simian immunodeficiency virus isolates. *Nature* **331**: 619-622.

KILIAN, M., J. MESTECHY, and M.W. RUSSELL. 1988. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol. Rev.* **52**: 296-303.

KIMPTON, J. and M. EMERMAN. 1992. Detection of replication competent and pseudotype with a sensitive cell line based on activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.* 66: 2232-2239.

KIYONO, H., J. BIENENSTOCK, J.R. MCGHEE, and P.B. ERNST. 1992. The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg. Immunol.* 4: 54-62.

KLATZMANN, D., F. BARRE-SINOUSI, M.T. NUGEYRE, C. DAUGUET, E. VILMER, C. GRISCELLI, F. BRUN-JEZINET, C. ROUZIOUX, J.C. GLUCKMAN, J.C. CHERMANN, and L. MONTAGNIER. 1984. Selective tropism of lymphadenopathy-associated virus (LAV) for helper T lymphocytes. *Science* 225: 59-63.

KLIMKAIT, T., K. STREBEL, M.D. MARTIN, and J.M. ORENSTEIN. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* 64: 621-629.

KOENIG, S., T.R. FUERST, L.V. WOOD, R.M. WOODS, J.A. SUZICH, G.M. JONES, V.F. DE LA CRUZ, R.T. DAVEY, S. VENKATESAN, B. MOSS, W.E. BIDDISON, and A.S. FAUCI. 1990. Mapping the fine specificity of a cytolytic T cell response to HIV-1 *nef* protein. *J. Immunol.* 145: 127-135.

KOFF, W.C. and D.F. HOTH. 1988. Development and testing of AIDS vaccines. *Science* 241: 426-432.

KOZARSKY, K., M. PENMAN, L. BASIRIPOUR, W. HASELTINE, J. SODORSKI, and M. KRIEGER. 1989. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Acqu. Imm. Def. Syndr.* 2: 163-169.

KRAAIJEVELD, C.A., T.A. OOSTERLAKEN, A. SNIJDERS, B.J. BENAISSTROUW, G.L. EKSTIJN, and H. SNIPPE. 1992. A vaccine against Semliki Forest virus consisting of a monoclonal anti-idiotypic antibody cross-linked to a protein which contains virus specific T-helper cell epitopes. *Antiviral Res.* 19: 275-284.

KURCH, R., D. BINNINGER, J. ENNEN, J. DENNER, S. HARTUNG, and S. NORLEY. 1991. The quest for an AIDS vaccine: the state of the art and current challenges. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7: 425-433.

KURLAND, J.I., H.E. BROXMEYER, L.M. PELUS, R.S. BROCKMAN, and M.A.S. MOORE. 1978. Role for monocyte-macrophage derived colony-stimulating

factor and prostaglandin E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation, *Blood* 52: 388-407.

KUTTEH, W.H., K.D. HATCH, R.E. BLACKWELL, and J. MESTECKY. 1988. Secretory immune system of the female reproductive tract: Immunoglobulin and secretory component containing cells. *Obstet. Gynecol.* 71: 56-60.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.

LAMM, M.E., M.B. MAZANEC, J.G. NEDRUD, and C.S. KAETZEL. 1992. Mechanisms of IgA-mediated mucosal defence. *Vacc. Res.* 1: 169-173.

LANGLOIS, A.J., K.J. WEINHOLD, T.J. MATTHEWS, M.L. GREENBERG, and D.P. BOLOGNESI. 1992. The ability of certain SIV vaccines to provoke reactions against normal cells. *Science* 255: 292-293.

LARDER, B., D. PURIFOY, K. POWELL, and G. DARBY. 1987. AIDS virus reverse transcriptase defined by high level expression in *Escherichia coli*. *Embo J.* 6: 3133-3137.

LASKY, L.A., G. NAKAMURA, D.H. SMITH, C. FENNIE, C. SHIMASAKI, E. PATZER, P. BERMAN, T. GREGORY, and O.J. CAPON. 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 50: 975-985.

LE GRAND, R., B. VASLIN, G. VOGT, P. ROQUES, M. HUMBERT, D. DORMONT and A.M. AUBERTIN. 1992. AIDS vaccine developments. *Nature (London)* 355: 684.

LENARDO, M.J., and D. BALTIMORE. 1989. NF-KB: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 58: 227-229.

LEVY, J.A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* 57: 183-289.

LEVY, J.A., A.D. HOFFMAN, S.M. KRAMER, J.A. LENDIS, J.M. SHIMABUKURO, and L.S. OSHIRO. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840-842.

LEVY, J.A., J. SHIMABUKURO, T. McHUGH, C. CASAVANT, D. STITES, and L. OSHIRO. 1985a. AIDS-associated retrovirus (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. *Virology* 147: 441-448.

LEVY, J.A., L.S. KAMWSKY, W.J.W. MORROW, K. STEIMER, P. LUCIW, D. DINA, J. HOXIE, and L. OSHIRO. 1985b. Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Int. Med.* 103: 694-699.

LIEW, F.Y., S.M. RUSSELL, G. APPLEYARD, C.M. BRAND, and J. BEALE. 1984. Cross-protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA antibody rather than serum antibody or cytotoxic T cell reactivity. *Eur. J. Immunol.* 14: 350-356.

LIGHTFOOTE, M.M., J.E. COLIGAN, T.M. FOLKS, A.S. FAUCI, M.A. MARTIN, and S. VENKATESAN. 1986. Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *J. Virol.* 60: 771-775.

LINSLEY, P.S., J.A., LEDBETTER, E. KINSEY-THOMAS, and S.L. HU. 1988. Effects of anti-gp120 monoclonal antibodies on CD4 receptor binding by the env protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 62: 3695-3702.

LIU, R.S., E.M. ROSEN, M.S. FUNG, W.N. SUN, C. SUN, W. GORDON, N.T. CHANG, and T.N. CHANG. 1989. A chimeric mouse-human antibody that retains specificity for HIV gp120 and mediates the lysis of HIV-infected cells. *J. Immunol.* 143: 3967-3975.

LITTAUA, R.A., M.B. OLDSTONE, A. TAKEDA, C. DEBOUCK, J.T. WONG, C.U. TUAZON, B. MOSS, F. KIEVITS, and F.A. ENNIS. 1991. An HLA-C-restricted CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte clone recognizes a highly conserved epitope on human immunodeficiency virus type 1 gag. *J. Virol.* 65: 4051-4056.

LUCIW, P.A., C. CHENG-MAYER and J.A. LEVY. 1987. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1434-1438.

LYERLY, H.K., D.L. REED, T.J. MATTHEWS, A.J. LANGLOIS, P.A. AHEARNE, S.R. PETTEWAY, and K.J. WEINHOLD. 1987. Anti-gp120 antibodies from HIV seropositive individuals mediate broadly reactive anti-HIV ADCC. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 3: 409-422.

MacDONALD, T.T., and J. SPENCER. 1990. Gut immunology. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 4: 291-313.

MADDON, P.J., A.G. DALGLEISH, J.S. McDOUGAL, P.R. CLAPHAM, R.A. WEISS and R. AXEL. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47: 333-348.

- MARTHAS, M.L., and C.J. MILLER. 1992. Systemic and mucosal immune responses to live-attenuated and whole inactivated SIV vaccines. *Vacc. Res.* 1: 303-310.
- MARTHAS, M.L., B. BANAPOUR, S. SUTJIPTO, M.E. SIEGEL, P.A. MARX, M.B. GARDNER, N.C. PEDERSEN, and P.A. LUCIW. 1989. Rhesus macaques inoculated with molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *J. Med. Primatol.* 18: 311-319.
- MARTINS, L.P., N. CHENCINER, B. ASJO, A. MEYERHANS and S. WAIN-HOBSON. 1991. Independent fluctuation of human immunodeficiency virus type 1 *rev* and *gp41* quasispecies *in vivo*. *J. Virol.* 65: 4502-4507.
- MARX, P.A., R.W. COMPANS, A. GETTIE, J.K. STAAS, R.M. GILLEY, M.J. MULLIGAN, G.V. YAMSHCHIKOV, D. CHEN, and J.H. ELDRIDGE. 1993. Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science* 260: 1323-1327.
- MASUR, H., M.A. MICHELIS, J.B. GREENE, I. ONORATO, R.A. VANDE STOUWE, R.S. HOLZMAN, G. WORMSER, L. BRETTMAN, M. LANGE, H.W. MURRAY, and S. CUNNINGHAM-RUNDLES. 1981. An outbreak of community acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 305: 1431-1438.
- MATHIESEN, T., P.A. BROLIDEN, J. ROSEN, and B. WAHREN. 1989. Mapping of IgG subclass and T-cell epitopes on HIV-proteins by synthetic peptides. *Immunology* 67: 453-459.
- MATSUSHITA, S., M. ROBERT-GUROFF, J. RUSCHE, A. KOITO, T. HATTORI, H. HOSHINO, K. JAVAHERIAN, K. TAKATSUKI, and S. PUTNEY. 1988. Characterization of a human immunodeficiency virus neutralizing monoclonal antibody and mapping of the neutralizing epitope. *J. Virol.* 62: 2107-2114.
- MATTERN, T., W. SCHOLZ, A.C. FELLER, H.D. FLAD, and A.J. ULMER. 1991. Expression of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) on resting and activated human T-lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 33: 737-748.
- MATTHEWS, T.J., and D.P. BOLOGNESI. 1988. AIDS vaccines. *Sci. Am.* 259: 120-127.
- MAZANEC, M.B., C.S. KAETZEL, M.E. LAMM, D. FLETCHER, and J.G. NEDRUD. 1992a. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6901-6905.

- MAZANEC, M.B., J.G. NEDRUD, and M.E. LAMM. 1987. Immunoglobulin A monoclonal antibodies protect against Sendai virus. *J. Virol.* 61: 2624-2626.
- MAZANEC, M.B., J.G. NEDRUD, X. LIANG, and M.E. LAMM. 1989. Transport of serum IgA into murine respiratory secretions and its implications for immunization strategies. *J. Immunol.* 142: 4275-4281.
- MAZANEC, M.B., M.E. LAMM, D. LYN, A. PORTNER, and J.G. NEDRUD. 1992b. Comparison of IgA versus IgG monoclonal antibodies for passive immunization of the murine respiratory tract. *Virus Research* 23: 1-12.
- McDERMOTT, M.R., L.J. BRAIS, and M.J. EVELEGH. 1990. Mucosal and systemic antiviral antibodies in mice inoculated intravaginally with herpes simplex virus type 2. *J. Gen. Virol.* 71: 1497-1504.
- McDOUGAL, J.S., A.C. MAWLE, S. CORT, J. NICHOLSON, A. CROSS, J. SCHEPPLER-CAMPBELL, D. HICKS, and J. SLIGH. 1985. Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV I. Role of T-cell activation and expression of the T4 antigen. *J. Immunol.* 135: 3151-3162.
- McDOUGAL, J.S., M.S. KENNEDY, J.M. SLIGH, S.P. CORT, A. MAWLE, J.K. NICHOLSON. 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4⁺ cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 231: 382-385.
- McGHEE, J.R., and J. MESTECKY. 1990. In defense of mucosal surfaces: Development of novel vaccines for IgA responses protective at the portals of entry of microbial pathogens. *Infectious Disease Clinics of North America* 4: 315-341.
- McKEATING, J.A., P.D. GRIFFITHS, and R.A. WEISS. 1990. HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus-induced Fc receptor. *Nature (London)* 343: 659-661.
- McNAMARA, M.K., R.E. WARD, and H. KOHLER. 1984. Monoclonal idiotope vaccine against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Science* 226: 1325-1326.
- MERRILL, C.R., D. GOLDMAN, S.A. SEDMAN, and M.H. EBERT. 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211: 1437-1438.
- MERVIS, R.J., N. AHMAD, E.P. LILLEHOJ, M.G. RAUM, F.H. SALAZAR, H.W. CHAN, and S. VENKATESAN. 1988. The *gag* gene products of human immunodeficiency type 1: alignment within the *gag* open reading frame,

identification of post-translational modifications, and evidence of alternative gag precursors. *J. Virol.* 62: 3993-4002.

MESTECKY, J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.* 7: 265-276.

MESTECKY, J. and J.H. ELDRIDGE. 1991. Targeting and controlled release for the effective induction of secretory antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 492-495.

MESTECKY, J., and J.R. McGHEE. 1987. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* 40: 153-245.

MESTECKY, J., J.R. McGHEE, R.R. ARNOLD, S.M. MICHALEK, S.J. PRINCE, and J.L. BABB. 1978. Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen. *J. Clin. Invest.* 61: 731-737.

MEYERHANS, A., R. CHEYNIER, J. ALBERT, M. SETH, S. KWOK, J. SNINSKY, L. MORFELDT-MANSON, B. ASJO, and S. WAIN-HOBSON. 1989. Temporal fluctuations in HIV quasispecies *in vivo* are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 58: 901-910.

MICHALEK, S.M., N.K. CHILDERS, J. KATZ, M. DERTZBAUGH, and M.W. RUSSELL. 1992. Use of liposomes for the induction of mucosal immunity. *Vacc. Res.* 1: 241-247.

MICHEL, M.L., M. MANCINI, Y. RIVIERE, D. DORMONT, and P. TIOLLAIS. 1990. T- and B-lymphocyte responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in macaques immunized with hybrid HIV-hepatitis B surface antigen particles. *J. Virol.* 64: 2452-2455.

MICHETTI, P., M.J. MAHAN, J.M. SLAUCH, J.J. MEKALANOS, and M.R. NEUTRA. 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 60: 1786-1792.

MILLER, C.J., J.R. McGHEE, and H.B. GARDNER. 1992b. Biology of disease: mucosal immunity, HIV transmission, and AIDS. *Lab. Invest.* 68: 129-145.

MILLER, C.J., N.J. ALEXANDER, S. SUTJIPTO, A.A. LACKNER, A. GETTIE, A.G. HENDRICKX, L.J. LOWENSTINE, M. JENNINGS, and P.A. MARX. 1989. Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: animal

model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 63: 4277-4284.

MILLER, C. and M.B. GARDNER. 1991. AIDS and mucosal immunity: usefulness of the SIV macaque model of genital mucosal transmission. *J. Acqu. Imm. Def. Syndr.* 4: 1169-1172.

MILLER, C.J., M. McCHESNEY, and P.F. MOORE. 1992a. Langerhans cells, macrophages and lymphocyte subsets in the cervix and vagina of rhesus macaques. *Lab. Invest.* 67: 628-634.

MILLER, C.J., P. VOGEL, N.J. ALEXANDER, S. SUTJIPTO, A.G. HENDRICKX, and P.A. MARX. 1992c. Localization of SIV in the genital tract of chronically infected female rhesus macaques. *Am. J. Pathol.* 141: 655-660.

MONTAGNIER, L., C. DAUGUET, C. AXLER, S. CHAMARET, J. GRUEST, M.T. NUGEYRE, R. REY, F. BARRE-SINOUSI and J.C. CHERMANN. 1984a. A new type of retrovirus isolated from patients presenting with lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndrome: structural and antigenic relatedness with equine infectious anaemia virus. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 135E: 119-134.

MONTAGNIER, L., J. GRUEST, S. CHAMARAT, C. DAUGET, C. AXLER, D. GUETARD, M.T. NYGEYRE, F. BARRE-SINOUSI, J.C. CHERMANN, J.B. BRUNET, D. KLATZMAN, and J.C. GLUCKMAN. 1984b. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. *Science* 225: 63-66.

MORRIS, H.H.B., K.C. GATTER, H. STEIN, and D.Y. MASON. 1983. Langerhans cells in human cervical epithelium: an immunohistologic study. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 90: 400-411.

MOUS, J., P.E. HEIMER and S.F.J. Le GRICE. 1988. Processing protease and reverse transcriptase from human immunodeficiency type I polyprotein in *Escherichia coli* *J. Virol.* 62: 1433-1436.

MURPHEY-CORB, M., R.C. MONTELARO, M.A. MILLER, M. WEST, L.N. MARTIN, B. DAVISON-FAIRBURN, S. OHKAWA, G.B. BASKIN, J.-Y. ZHANG, G.B. MILLER, S.D. PUTNEY, A.C. ALLISON, and D.A. EPPSTEIN. 1991. Efficacy of SIV/delta B670 glycoprotein-enriched and glycoprotein-depleted unit vaccines in protecting against infection and disease in rhesus monkeys. *AIDS* 5: 655-662.

MURPHEY-CORB, M., L. MARTIN, B. DAVISON-FAIRBURN, R.C. MONTELARO, M. MILLER, M. WEST, S. OHKAWA, G.B. BASKIN, J.-Y. ZHANG, S.D. PUTNEY, A.C. ALLISON, and D.A. EPPSTEIN. 1989. A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science* 246: 1293-1297.

MURPHEY-CORB, M., S. OHKAWA, B. DAVISON-FAIRBURN, L.N. MARTIN, G.B. BASKIN, A.J. LANGLOIS, M. McINTEE, O. NARAYAN, and M.B. GARDNER. 1992. Vaccine trials in primates- a formalin-fixed whole SIV vaccine includes protective responses that are cross-protective and durable. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1475-1478.

MYERS, G. and G.N. PAVLAKIS. 1992. Evolutionary potential of complex retroviruses, In J.A. Levy (ed.), *The retroviridae*. Plenum Press, New York, pp. 51-105.

NABEL, G., and D. BALTIMORE. 1987. An inductible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature (London)* 326: 711-713.

NATUK, R.J., M.D. LUBECK, A.R. DAVIS, M. CHENGALVALA, P.K. CHANDA, S. MIZUTANI, J.W. EICHBERG, and P.P. HUNG. 1992. Adenovirus as a vector system for induction of secretory immunity. *Vacc. Res.* 1: 275-280.

NELSON, J.A., C.A. WILEY, C. REYNOLDS-KOHLER, C.E. REESE, W. MARGARETTEN and J.A. LEVY. 1988. Human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet* 1: 259-262.

NICHOLSON, J.K.A., G.D. CROSS, C.S. CALLAWAY, and J.S. McDOUGAL. 1986. In vitro infection of human monocytes with human T-lymphotropic virus type III/ lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV). *J. Immunol.* 137: 323-329.

NICHOLSON, J.K.A., J.J. SPIRA, C.H. ALOISIO, B.M. JONES, M.S. KENNEDY, R.C. HOLMAN, and J.S. McDOUGAL. 1989. Serial determinations of HIV-1 titers in HIV-infected homosexual men: association of rising titers with CD4 T cell depletion and progression to AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5: 205-215.

NIXON, D.F., K. BROLIDEN, G. OGG and P.A. BROLIDEN. 1992. Cellular and humoral antigenic epitopes in HIV and SIV. *Immunology* 76: 515-534.

NIXON, D.F., and A.J. McMICHAEL. 1991. Cytotoxic T cell recognition of HIV proteins and peptides. *AIDS*, 5: 1049-1059.

NIXON, D.F., A.R.M. TOWNSEND, J.G. ELVIN, C.R. RIZZA, J. GALLWAY, and A.J. McMICHAEL. 1988. HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Nature* 336: 484-487.

NOWAK, M.A., R.M. ANDERSON, A.R. McLEAN, T.F.W. WOLFS, J. GOUDSMIT, and R.M. MAY. 1991. Antigenic diversity thresholds and the development of AIDS. *Science* 254: 963-969.

OHNO, T., M. TERADA, Y. YONEDA, K.W. SHEA, R.R. CHAMBERS, D.M. STROKA, M. NAKAMURA, and D.W. KUFEL. 1991. A broadly neutralizing monoclonal antibody that recognizes the V3 region of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10726-10729.

OMS, Organisation Mondiale de la Santé. 1992. Programme mondial de lutte contre le SIDA: rapport d'activité 1991 pp. 1-107.

OZEL, M., G. PAULI, and H.R. GELDERBLUM. 1988. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.* 100: 255-266.

PALMER, E. and C.S. GOLDSMITH. 1988. Ultrastructure of human retroviruses. *J. Elect. Microsc. Tech.* 8: 3-15.

PANICALI, D.L., G. MAZZARA, J.L. SULLIVAN, R. HESSELTON, L. SHEN, N. LETVIN, M. DANIEL, R. DESROSIERS, and E.J. STOTT. 1992. Use of lentivirus-like particles alone and in combination with live vaccinia-virus-based vaccines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1449.

PANTALEO, G., C. GRAZIOSI, and A.S. FAUCI. 1993. The immunogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 328: 327-335.

PAPSIDERO, L.D., M. SHEU and F.W. RUSCETTI. 1989. Human immunodeficiency Virus type-1 neutralizing monoclonal antibodies which react with p17 core protein: characterization and epitope mapping. *J. Virol.* 63: 267-272.

PARR, M.B., L. KEPPEL, and E.L. PARR. 1991. Antigen recognition in the female reproductive tract. II. Endocytosis of horseradish peroxidase by Langerhans cells in murine vaginal epithelium. *Biol. Reprod.* 45: 261-265.

- PARR, M.B., and E.L. PARR. 1991. Langerhans cells and T lymphocyte subsets in the murine vagina and cervix. *Biology of Reproduction* 44: 491-498.
- PEDERSON, N. C, E.W. HO, M.L. BROWN, and J.K. YAMAMOTO. 1987. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 235: 790-793.
- PERRIN, P., P. SUREAU, and L. THIBODEAU. 1985a. Structural and immunogenic characteristics of rabies immunosomes. *Dev. Biol. Stand.* 60: 483-491.
- PERRIN, P., L. THIBODEAU, C. DAUGUET, A. FRITSCH, et P. SUREAU. 1984. Amplification des propriétés immunogènes de la glycopotéine rabique par ancrage sur des liposomes préformés. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 135E: 183-199.
- PERRIN, P., L. THIBODEAU, and P. SUREAU. 1985b. Rabies immunosome (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection studies. *Vaccine* 3: 325-331.
- PETRICCIANI, J.C. 1993. Global immunization against AIDS: economic considerations. *Vaccine* 11: 873-877.
- PHILLIPS, D.M., and A.S. BOURINBAIAR. 1992. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* 186: 261-273.
- PINTER, A., W.J. HONNEN, S.A. TILLEY, C. BONA, H. ZAGHOUBANI, M.K. GORNY, and S. ZOLLA-PAZNER. 1989. Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 63: 2674-2679.
- PLATA, F., G. DADAGLIO, N. CHENCINER, A. HOFFENBACH, S. WAIN-HOBSON, F. MICHEL, and P. LANGLADE-DEMOYEN. 1989. Cytotoxic T lymphocytes in HIV-induced disease: implications for therapy and vaccination. *Immunodef. Rev.* 1: 227-246.
- POMERANTZ, R.J., S.M. DE LA MONTE, C.E. DONEGAN, T.R. ROTA, M.W. VOGT, D.E. CRAVEN, and M.S. HIRSH. 1988. Human immunodeficiency virus (HIV) infection of the uterine cervix. *Ann. Int. Med.* 108: 321-327.
- POPOVIC, M., M.G. SARANGADHARAN, E. READ and R.C. GALLO. 1984. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500.

PUTKONEN, P., R. THURSTENSSON, L. GHAVAMZADEH, J. ALBERT, K. HILD, G. BIBERFELD, and E. NORRBY. 1991. Prevention of HIV-2 and SIVsm infection by passive immunization in cynomolgus monkeys. *Nature (London)* 352: 436-438.

PUTKONEN, P., R. THURSTENSSON, M. CRANAGE, C. NILSSON, L. GHAVAMZADEN, J. ALBERT, P. GREENAWAY, and G. BIBERFELD. 1992. A formalin inactivated whole SIVmac vaccine in Ribi adjuvans protects against homologous and heterologous SIV challenge. *J. Med. Primatol.* 21: 108-112.

RAPPERSBERGER, K., S. GARTNER, P. SCHENK, G. STINGL, V. GROH, E. TSCHACHLER, D.L. MANN, K. WOLFF, K. KONRAD and M. POPOVIC. 1988. Langerhan's cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirology* 29: 185-194.

RATNER, L., R.C. GALLO, F. WONG-STAAAL. 1985b. HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature (London)* 313: 636-637.

RATNER, L., W. HASELTINE, R. PATARCA, K.J. LIVAK, B. STARCICH, S.F. JOSEPH, E.R. DORAN, J.A. RAFALSKI, E.A. WHITEHORN, K. BAUMEISTER, L. IVANOFF, S.R. PETTEWAY JR., M.L. PEARSON, J.A. LAUTENBERGER, T.S. PAPS, J. GHRAYER, N.T. CHANG, R.C. GALLO and F. WONG-STAAAL. 1985a. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature (London)* 313: 277-284.

RENEGAR, K.B. and P.A. SMALL. 1991b. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J. Immunol.* 146: 1972-1978.

RENEGAR, K.B., and P.A. SMALL. 1991a. Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. *J. Virol.* 65: 2146-2148.

ROBERTSON, S.M. and J.J. CEBRA. 1976. A model for immunity. *Ric. Clin. Lab.* 6 (suppl 3): 105.

ROBINSON, W.E., D.C. MONTEFIORI, and W.M. MITCHELL. 1988. Antibody-dependant enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Lancet* 1: 790-794.

ROSEN, C.A., J.G. SODROSKI, and W.A. HASELTINE. 1985. The location of *cis*-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* 41: 813-823.

ROSEN, C.A., J.G. SODROSKI, W.C. GOH, A.I. DAYTON, J. LIPPKE, and W.A. HASELTINE. 1986. Post-transcriptional regulation accounts for the trans-

activation of the human T-lymphotropic virus type III. *Nature (London)* 319: 555-559.

ROSENBERG, Z.F., and A.S. FAUCI. 1989. The immunopathogenesis of HIV infection. *Adv. immunol.* 47: 377-431.

SAAG, M.S., B.H. HAHN, J. GIBBONS, Y. LI, E.S. PARKS, W.P. PARKS and G.M. SHAW. 1988. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 *in vivo*. *Nature (London)* 334: 440-444.

SACKS, D.L., K.M. ESSER, and A. SHER. 1982. Immunization of mice against African trypanosomiasis using anti-idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* 155: 1108-1119.

SALFELD, J., H.G. GOTTLINGER, R.A. SIA, R.E. PARK, J.G. SODROSKI and W.A. HASELTINE. 1990. A tripartite HIV-1 tat-env-rev fusion protein. *EMBO Journal* 9: 965-970.

SARIN, P.S., D.K. SUN, A.H. THORNTON, P.H. NAYLOR, and A.L. GOLDSTEIN. 1986. Neutralization of HTLV-III/LAV replication by antiserum to thymosin alpha 1. *Science* 232: 1135-1137.

SCHLIENGER, K., M. MANCINI, Y. RIVIERE, D. DORMONT, P. TIOLLAIS, and M.L. MICHEL. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 major neutralizing determinant exposed on hepatitis B surface antigen particles is highly immunogenic in primates. *J. Virol.* 66: 2570-2576.

SCHÖN, E., H.V. DEMUTH, E. EICHMANN, H.J. HORST, J.J. KORNER, J. KOPP, T. MATTERN, K. NEUBERT, F. NOLL, AND A.J. ULMER. 1989. Dipeptidyl peptidase IV in human T-lymphocytes. Impaired induction of interleukin 2 and gamma interferon due to specific inhibition of dipeptidyl peptidase IV. *Scand.J. Immunol.* 29: 127-132.

SCHRIER, R.D., J.W. GNANN, JR., A.J. LANGLOIS, K. SHRIVER, J.A. NELSON, and M.B.A. OLDSTONE. 1988. B. and T. lymphocyte responses to an immunodominant epitope of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 62: 2531-2536.

SHAFFERMAN, A., P.B. JAHRLING, R.E. BENVENISTE, M.G. LEWIS, T.J. PHIPPS, F. EDEN-McCUTCHAN, J. SADOFF, G.A. EDDY, and D.S. BURKE. 1991. Protection of macaques with a simian immunodeficiency virus type 1-infected cells by treatment with a Tat antagonist. *J. Virol.* 66: 6802-6805.

SHUI, S.-L., B.M. TRAVIS, V. STALLARD, K. ABRAMS, L. MISHER, P. MORAN, J.M. ZARLING, A.J. LANGLOIS, L. KULLER, W.R. MORTON, and R.E. BENVENISTE. 1992. Immun responses to SIV_{mne} envelope glycoprotein protect macaques from homologous SIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**: 1489-1494.

SKINNER, M.A., R. TING, A.J. LANGLOIS, K.J. WEINHOLD, H.K. LYERLY, K. JAVAHERIAN, T.J. MATTHEWS. 1988. Characteristics of a neutralizing monoclonal antibody to the HIV envelope glycoprotein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **4**: 187-197.

SIEGAL, F.P., C. LOPEZ, G.S. HAMMER, A.E. BROWN, S.J. KORNFELD, J. GOLD, J. HASSETT, S.Z. HIRSCHMAN, C. CUNNINGHAM-RUNDLES, B.R. ADELSBERG, D.M. PARHAM, M. SIEGAL, S. CUNNINGHAM-RUNDLES, and D. ARMSTRONG. 1981. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N. Engl. J. Med.* **305**: 1439-1444.

SILICIANO, R.F., T. LAWTON, C. KNALL, R.W. KARR, P. BERMAN, T. GREGORY, and E.L. REINHERZ. 1988. Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones: effect of HIV sequence variation and a mechanism of CD4⁺ cell depletion. *Cell* **54**: 561-575.

SNIJDER, A., B.J. BENAÏSSA-TROUW, T.A.M. OOSTERLAKEN, W.C. PUIJK, W.P.A. POSTHUMUS, R.H. MELDEN, W.A.M. BOERE, J.D. OOSTING, C.A. KRAAIJEVELD, and H. SNIPPE. 1991. Identification of linear epitopes on Semliki forest virus E2 membrane and their effectiveness as a synthetic peptide vaccine. *J. Gen. Virol.* **72**: 557-565.

SODROSKI, J., W.C. GOH, C. ROSEN, A. DAYTON, E. TERWILLIGER and W. HASELTINE. 1986. A second post-transcriptional *trans*-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature (London)* **321**: 412-417.

SODROSKI, J., R. PATARCA, C. ROSEN, F. WONG-STAAAL and W. HASELTINE. 1985. Location of the *trans*-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* **229**: 74-77.

STANNARD, L.M., F. DE ST. J. VAN DER RIET and J.W. MOODIE. 1987. The morphology of human immunodeficiency virus particles by negative staining electron microscopy. *J. Gen. Virol.* **68**: 919-923.

STEFFEN, M.J. and J.L. EBERSOLE. 1992. Secretory immune responses to *Mycoplasma pulmonis*. *Infect. Immun.* **60**: 337-344.

STEIN, K., and T. SODERSTROM. 1984. Neonatal administration of idiotypic or anti-idiotypic primes for protection against *Escherichia coli* K13 infection in mice. *J. Exp. Med.* 160: 1001-1011.

STEWART, G.J., J.P.P. TYLER, A.L. CUNNINGHAM, J.A. BARR, G.L. DRISCOLL, J. GOLD, and B.J. LAMONT. 1985. Transmission of human-T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) by artificial insemination by donor. *Lancet* 2: 581-585.

STOTT, E.J. 1991. Anti-cell antibody in macaques. *Nature (London)* 353: 393.

STOTT, E.J., M. CRANAGE, P. KITCHIN, G. FARRAR, F. TAFFS, T. ASHWORTH, M. PAGE, L. CHAN, P. GREENAWAY, and K. MMILLS. 1991. Vaccination against simian immunodeficiency virus infection of macaques. "Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases". *Septième Colloque des Cent Gardes*, pp. 261-266.

STOTT, E.J., W.L. CHAN, K. MILLS, M. PAGE, F. TAFFS, M. CRANAGE, P. GREENAWAY, and P. KITCHEN. 1991. Preliminary report: protection of cynomolgus macaques against simian immunodeficiency virus by fixed infected-cell vaccine. *Lancet* 336: 1538-1541.

STREBEL, K., D. DAUGHERTY, K. CLOUSE, D. COHEN, T. FOLKS and M.A. MARTIN. 1987. The HIV 'A' (*src*) gene product is essential for virus infectivity. *Nature (London)* 328: 728-730.

SUTJIPTO, S., N.C. PEDERSEN, C.J. MILLER, M.B. GARDNER, C.V. HANSO, A. GETTIE, M. JENNINGS, J. HIGGINS, and P.A. MARX. 1990. Inactivated Simian immunodeficiency virus vaccine failed to protect rhesus macaques from intravenous or genital mucosal infection but delayed disease in intravenously exposed animals. *J. Virol.* 64: 2290-2297.

TAKAHASHI, K., L.C. DAI, T.R. FUERST, W.E. BIDDISON, P.L. EARL, B. MOSS, and F.A. ENNIS. 1991. Specific lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by HLA-A3.1-restricted CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte clone that recognizes a conserved peptide sequence within the gp41 subunit of the envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10277-10281.

TARTAGLIA, J., W.I. COX, J. TAYLOR, M. PERKUS, M. RIVIERE, B. MEIGNIER, and E. PAOLETTI. 1992. Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1445-1447.

TAYLOR, H., S. ARMSTRONG, and N. DIMMOCK. 1987. Quantitative relationships between an influenza virus and neutralizing antibody. *Virology* 159: 288-298.

TERSMETTE, M., J.M.A. LANGE, R.E.Y. DEGOEDE, F. DEWOLF, J.K.M. EEFTINK-SCHATTENKERK, P.T.A. SCHELLEKENS, R.A. COUTINHO, H.G. HUISMAN, J. GOUDSMIT and F. MIEDEMA. 1989. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1: 983-985.

THIBODEAU, L., A. BOUDREAULT, and P. PERRIN. 1985. Immunosome technology: An approach to efficient and safe influenza and rabies vaccines. In: *Biotechnology: Applications and Research*. P. Cheremisinoff and R. Ouellette (eds.), pp. 370-379.

THIBODEAU, L., C. TREMBLAY, et L. LACHAPELLE. 1991. Une immunisation orale et parentérale avec l'immunosome-VIH induit une sécrétion d'IgA spécifiques dans la salive et la production d'IgA circulants chez la souris et le lapin. *C.R. Acad. Sci. Paris, t. 313 Série III*: 389-394.

THIBODEAU, L., L. CONSTANTINEAU, and C. TREMBLAY. 1992a. Oral priming followed by parenteral immunization with HIV-1 immunosomes induces HIV-specific salivary and circulatory IgA in mice and rabbits. *Vacc. Res.* 1: 233-240.

THIBODEAU, L., M. CHAGNON, L. FLAMAND, D. OTH, L. LACHAPELLE, C. TREMBLAY, et L. MONTAGNIER. 1989. Rôles des liposomes dans la présentation de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH et la réponse immunitaire chez la souris. *C.R. Acad. Sci. Paris, t. 309 Série III*: 741-747.

THIBODEAU, L., P. NAUD, and A. BOUDREAULT. 1981. An influenza immunosome: its structure and antigenic properties. A model for a new type of vaccine. In: *Genetic variation among influenza viruses*. D.P. Nayak (ed.) Acad. Press, N.Y. London, pp. 587-600.

THIBODEAU, L., P. PERRIN, and P. SUREAU. 1984. Rabies immunosomes: candidate for an RNA-free vaccine. In: *Modern Approaches to Vaccines*. R.M. Chanock and R.A. Lerner (eds.) pp. 373-377.

THIBODEAU, L., Z. COUTSINOS, and C. TREMBLAY. 1992b. Evaluation of different immunisation protocols to maximize systemic and mucosal immune responses in mice. "Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases". Septième Colloque des Cent Gardes pp. 187-192.

- TINDAL, B. and D.A. COOPER. 1991. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 5: 1-14.
- TSCHLACHLER, E., V. GROH, M. POPOVIC, D.L. MANN, K. KONRAD, B. SAFAI, L. ERON, F. DIMARZO VERONESE, K. WOLFF and G. STINGL. 1987. Epidermal Langerhans cells-a target for HTLV III/LAV infection. *J. Invest. Dermatol.* 88: 233-237.
- TYLER, D.S., S.D. STANLEY, S. ZOLLA-PAZNER, M.K. GORNY, P.P. SHADDUCK, A.J. LANGLOIS, T.J. MATTHEWS, D.P. BOLOGNESI, T.J. PALKER, and K.J. WEINHOLD. 1989. Identification of sites within gp41 that serve as targets for antibody-dependent cellular cytotoxicity by using human monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 145: 3276-3282.
- VAISHNAV, Y.N and F. WONG-STAAAL. 1991. The biochemistry of AIDS. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 577-630.
- VON BRIESEN, H., R. ANDREESEN and H. RUBSAMEN-WAIGMANN. 1990. Systematic classification of HIV biological subtypes on lymphocytes and monocytes/macrophages. *Virology* 178: 597-602.
- WAHREN, B., J. ROSEN, E. SANDSTRÖM, T. MATHIESEN, S. MODROW, and H. WIGZELL. 1989. HIV-1 peptides induce a proliferative response in lymphocytes from infected persons. *J. AIDS* 2: 448-456.
- WALKER, B.D., C. FLEXNER, K. BIRCH-LIMBERGER, L. FISHER, T.J. PARADIS, A. ALDOVINI, R. YOUNG, B. MOSS, and R.T. SCHOOLEY. 1989. Long term culture and specificity of human cytotoxic T-lymphocyte clones reactive with human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9514-9518.
- WALKER, W.A., K.J. ISSELBACHER, and K.J. BLOCH. 1972. Intestinal uptake of macromolecules: effect of oral immunization. *Science* 177: 608-610.
- WEISS, C.D., J.A. LEVY, and J.M. WHITE. 1990. Oligomeric organization of gp120 on infections human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 64: 5674-5677.
- WELTZIN, R., P. LUCIA-JANDRIS, P. MICHETTI, B.N. FIELDS, J.P. KRAEHENBUHL, and M.R. NEUTRA. 1989. Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J. Cell Biol.* 108: 1673-1685.

WHO, 1991. Organization mondiale de la santé. 1992. Programme mondial de lutte contre le SIDA: rapport d'activité 1991. OMS: 1-107.

WILLEY, R.L., J.S. BONIFACINO, B.J. POTTS, M.A. MARTIN and R.D. KLAUSNER. 1988. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8590-9584.

WINNER III, L., J. MACK, R. WELTZIN, J.J. MEKALANOS, J.-P. KRAEHENBUHL, and M.R. NEUTRA. 1991. New model for analysis of mucosal immunity: intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio Cholerae* infection. Infect. Immun. 59: 977-982.

WONG-STAAAL, F. 1990. "Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication". In: Fields, B.N., D.M. Knipe (ed.): Virology, 2nd Ed. Raven Press, New York, pp. 1529-1543.

YAHJ, N., S. BAGHDIGUIAN, H. MOREAU, and J. FANTINI. 1992. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. J. Virol. 66: 4848-4854.

YAMAMOTO, J.K., T. HOHDATSU, R.A. OLMSTED, R. PU, H. LOVIE, H.A. ZOCHLINSKI, J. ACEVEDO, H.M. JOHNSON, G.A. SOULDS, and M.B. GARDNER. 1993. Experimental vaccine protection against homologous and heterologous strains of feline immunodeficiency virus. J. Virol. 67: 601-605.

YAMAMOTO, J.K., T. OKUDA, C.D. ACKLEY, H. LOUIE, H. ZOCHLINSKI, E. PEMBROKE and M.B. GARDNER. 1991. Experimental vaccine protection against feline immunodeficiency virus. AIDS Res. Hum. Retroviruses 7: 911-922.

YU, X., Y. XIN, Z. MATSUDA, T.H. LEE and M. ESSEX. 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. J. Virol. 66: 4966-4971.

ZAGURY, D., R. LEONARD, M. FOUCHARD, B. REVEIL, J. BERNARD, D. ITTELE, A. CATTAN, L. ZIRMWABAGABO, M. KALUMBU, W. JUSTIN, J.-J. SALAUN, and B. GOUSSARD. 1987. Immunization against AIDS in humans. Nature (London) 326: 249-250.

ZHOU, E.M., and R.C. KENNEDY. 1989. Strategies for developing vaccines against acquired immunodeficiency syndrome. *Biochem. Biophys. Acta* 989: 301-313.

ANNEXES

ANNEXE I

COMMUNICATIONS ET PUBLICATION:

1) Communications:

- i) THIBODEAU, L., COUTSINOS, Z., and TREMBLAY, C. 1994. Influence of antigen presentation and protocol in the induction of anti-HIV systemic and mucosal immune responses in laboratory animals. Seventh International Conference of Comparative and Applied Virology, qui aura lieu du 12 au 17 Octobre à Montréal, Québec, Canada.
- ii) THIBODEAU, L., COUTSINOS, Z., TREMBLAY, C., DESCOTEAUX, J.P. 1993. Role of protocol in the induction of systemic and mucosal immune responses in mice and rabbits immunized with HIV-Immunosomes. Conference on Advances in AIDS Vaccine Development 1993, VINCVDG meeting, du 30 Octobre au 3 Novembre, Virginie, Etats-Unis.
- iii) COUTSINOS, Z. et THIBODEAU, L. 1993. Induction d'une immunité mucoale anti-VIH chez les animaux de laboratoire; présentée lors du 61ème congrès de l'ACFAS qui a eu lieu du 17 au 21 Mai 1993 à l'Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada.
- iv) THIBODEAU, L., COUTSINOS, Z. and TREMBLAY, C. 1993. Mucosal and systemic responses to HIV- Immunosomes; présentée lors de «The Canadian Association for HIV Research Third Annual Canadian Conference on HIV/AIDS Research» tenue à Montréal du 13 au 15 Mai 1993.
- v) THIBODEAU, L., COUTSINOS, Z., TREMBLAY, C. and LACHAPELLE, L. 1992. Evaluation of different immunization protocols to maximize systemic and mucosal immune responses in mice; présentée au 7ème Colloque des Cent Gardes, Paris, France, Octobre 26-28 1992.

2) Publication:

THIBODEAU, L., COUTSINOS, Z., TREMBLAY, C. and LACHAPELLE, L.
1992. Evaluation of different immunization protocols to maximize
systemic and mucosal immune responses in mice. *Retroviruses of Human
A.I.D.S. and Related Animal Diseases*. Septième Colloque des Cent Gardes
1992 : 187-192.

ANNEXE II

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES CELLULAIRES

1) Milieu de croissance pour cellules CEM

Milieu RPMI	90	%
Sérum foetal bovin	10	%
Glutamine	2	mM
Gentamicine	50	µg/mL
β-mercaptoéthanol	0,01	mM
Polybrène	2	µg/mL
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	21	mM
HEPES	15	mM

2) Milieu de croissance pour cellules HeLa-CD4-LTR-βgal

Milieu DMEM	90	%
Sérum foetal bovin	10	%
G418	0,2	mg/mL
Hygromicine	0,1	mg/mL

ANNEXE III

COMPOSITION DES GELS DE REGROUPEMENT ET DE SEPARATION

1) Gel de regroupement (4 %)

Solution A	2,0	mL
Solution B	5,1	mL
Saccharose 40 %	8,0	mL
H ₂ O distillée-déionisée	0,9	mL
TEMED	40	μL
*SDS 10 %	160	μL
**Persulfate d'ammonium 10 %	100	μL

a) Solution A: Tris-base 0,5M pH 6,7

Tris-base	5,98	g
Ajouter 50 mL de H ₂ O distillée-déionisée		
Ajuster le pH à 6,7 avec HCl 12 M		
Compléter à 100 mL avec H ₂ O distillée-déionisée		

b) Solution B: Acrylamide : bis-acrylamide (10 : 2,5)

Acrylamide	10,0	g
Bis-acrylamide	2,5	g
Compléter à 100 mL avec H ₂ O distillée-déionisée		
Filtrer sur papier Wattman 3 M		

* Dégazer sous vide avant d'ajouter le SDS

** Le persulfate d'ammonium est fraîchement préparé

2) Gel de séparation (10,5 %)

Solution C	6,0	mL
Solution D	12,7	mL
H ₂ O distillée-déionisée	28,8	mL
TEMED	115	μL
SDS 10 %	480	μL
Persulfate d'ammonium 10 %	120	μL

a) Solution C: Tris-base 3 M pH 8,5

Tris-base	36,6	g
Ajouter 50 mL de HCl 1 N		
Ajuster le pH à 8,5		
Compléter à 100 mL avec H ₂ O distillée-déionisée		

b) Solution D: Acrylamide : bis-acrylamide (40 : 1,1)

Acrylamide	40,0	g
Bis-acrylamide	1,1	g
Compléter à 100 mL avec H ₂ O distillée-déionisée		
Filtrer sur papier Wattman 3 M		

COMPOSITION DES TAMPONS

1) Tampon d'électrophorèse

Tris-base (25 mM)	18,0	g
Glycine (192 mM)	86,4	g
SDS (0,1%)	6,0	g
Compléter à 6 L avec H ₂ O distillée-déionisée		

2) Tampon dissociant (2X) pH 7,0

Tris-base (10 mM)	0,121	g
Glycérol (10 %)	10,0	mL
β-mercaptoéthanol (5 %).....	5,0	mL
SDS (1 %)	1,0	g
Compléter à 100 mL avec H ₂ O distillée-déionisée		

ANNEXE IV

SOLUTIONS DE LAVAGE ET DE GAVAGE

1) Solution de lavage (expériences de souris)

NaCl (136,0 mM)	800	mg
KCl (2,7 mM)	20	mg
Na ₂ HPO ₄ (4,1 mM).....	115	mg
KH ₂ PO ₄ (0,7 mM).....	20	mg
EDTA (50,0 mM)	2,08	g
PMSF (0,1 mM)	0,2	mL
Compléter à 100 mL avec H ₂ O distillée-déionisée		

2) Solution de gavage (expériences de lapins)

NaCl (25,0 mM)	146	mg
Na ₂ SO ₄ (40,0 mM).....	568	mg
KCl (10,0 mM)	75	mg
NaHCO ₃ (20,0 mM)	168	mg
PEG 3350 (48,5 mM)	16,25	g
Compléter à 100 mL avec H ₂ O distillée-déionisée		

