



HAL
open science

Identification d'espèces moléculaires de lysophosphatidylcholine présentant des activités adjuvantes en vue d'un développement clinique

Guillaume Bach

► **To cite this version:**

Guillaume Bach. Identification d'espèces moléculaires de lysophosphatidylcholine présentant des activités adjuvantes en vue d'un développement clinique. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10181 . tel-00583087

HAL Id: tel-00583087

<https://theses.hal.science/tel-00583087>

Submitted on 4 Apr 2011

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE 340

BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET CELLULAIRE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 22 octobre 2009

par

M BACH Guillaume

**IDENTIFICATION D'ESPECES MOLECULAIRES DE
LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE PRESENTANT DES ACTIVITES ADJUVANTES EN
VUE D'UN DEVELOPPEMENT CLINIQUE**

Directeurs de thèse : Dr INCHAUSPE Geneviève / Dr LOTTEAU Vincent

JURY :

Dr GUY Bruno (Rapporteur)

Dr MARCHE Patrice (Rapporteur)

Dr DELAIR Thierry (Examineur)

Dr INCHAUSPE Geneviève (Directeur de thèse)

Dr FOURNILLIER Anne (Co-directeur de thèse)

Dr LOTTEAU Vincent (Directeur de thèse)

SOMMAIRE

Abréviations.....	6
Etude Bibliographique.....	8
I) Le système immunitaire humain : de la reconnaissance des pathogènes à la protection physiologique	9
A. Le système immunitaire inné.....	9
1. Reconnaissance	9
a. Les récepteurs de type toll (TLR).....	10
b. Les récepteurs de type non toll (non TLR).....	13
c. Le système du complément	16
2. Développement de l'immunité innée	17
3. Les cellules tueuses naturelles (Natural Killer, NK).....	18
a. Description	18
b. Activités cytotoxiques des NK	19
4. Les cellules dendritiques (CD).....	21
a. Les populations de cellules dendritiques	21
b. La présentation des antigènes par les CD	22
B. Le système immunitaire adaptatif.....	25
1. La synapse immunologique.....	25
2. Les réponses à médiation cellulaire et humorale	27
a. Développement des lymphocytes T CD4+	27
b. Développement des lymphocytes T CD8+	30
c. Développement de la réponse humorale	31
d. Protection physiologique de la réponse humorale	33
II) La vaccination.....	35
A. Généralités	35
1. Objectifs de la vaccination	35
2. Premières expériences historiques	37
B. Les différentes classes de vaccins.....	37
1. Les vaccins vivants atténués	37
2. Les vaccins inactivés	39
3. Les vaccins conjugués	39
4. Les vaccins vectorisés viraux	40
5. Les vaccins génétiques	41
6. Les vaccins sous-unitaires	42
7. Les vaccins basés sur l'utilisation des cellules dendritiques.....	43
C. Un aperçu des enjeux en vaccinologie	43
D. Adjuvantation	45
1. Définition et besoins actuels	45
2. Les différentes classes d'adjuvants	46
E. Les adjuvants présents sur le marché.....	48
1. Adjuvants à base d'aluminium	48
2. MF59	51
3. Monophosphoryl lipide A (MPLA) et RC529	53
4. Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIV)	54
5. Sous-unité B de la toxine cholérique (CTB)	56
F. Les adjuvants en développement clinique	57
1. Adjuvants à base d'aluminium	57
2. Emulsions	57

3. Ligands des Toll-Like Receptors	59
4. IRIV	60
5. Les saponines	61
6. Les cytokines	61
7. Les combinaisons d'adjuvants	63
G. Adjuvants en développement préclinique	64
III) La réponse de phase aiguë (RPA)	68
A. Définition	68
B. Changements métaboliques	68
C. Protéines majeures de la phase aiguë	71
1. La protéine C réactive	71
a. Caractéristiques	71
b. Fonctions	71
2. La protéine sérique amyloïde A	72
D. Les lipoprotéines pendant la réponse de phase aiguë	72
1. Description des lipoprotéines	73
2. Oxydation des lipoprotéines	74
a. Mécanisme	74
b. Importance biologique	75
E. La lysophosphatidylcholine (LPC)	76
1. Structure	76
2. Synthèse et localisation	77
3. Nomenclature	78
4. Les fonctions de la lysophosphatidylcholine	79
5. Démonstration de l'activité adjuvante	81
IV) Modèles d'étude	83
A. Le virus de l'hépatite C (VHC)	83
1. Epidémiologie et structure du virus	83
2. Corrélats de la protection contre le VHC	84
a. Réponses humorales	84
b. Réponses cellulaires	87
c. La protéine non structurale 3 (NS3)	88
B. Le virus de l'hépatite B (VHB)	90
1. Epidémiologie et structure du virus	90
2. Corrélats de la protection contre le VHB	91
a. Réponses humorales	91
b. Réponses cellulaires	92
c. La protéine de surface (HBsAg)	93
C. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	94
1. Epidémiologie et structure du virus	94
2. Corrélats de protection	95
a. Réponse humorale	95
b. Réponse cellulaire	97
Résultats	99
I) Objectifs des travaux de thèse	100
II) Résultats principaux : Identification d'espèces moléculaires de lysophosphatidylcholine présentant des activités adjuvantes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	101
A. Caractérisation <i>in vitro</i>	101
1. Objectifs	101

2. Méthodes	102
3. Résultats	103
B. Caractérisation <i>in vivo</i>	106
1. Objectifs et méthodes	106
a. Profil des cytokines induites par les LPC	106
b. Effet adjuvant de réponses immunes humorales.....	107
2. Résultats	108
a. Profil des cytokines induites par les LPC	108
b. Effet adjuvant de réponses immunes humorales.....	109
Article 1 : Identification d'espèces moléculaires de lysophosphatidylcholine présentant des activités adjuvantes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	113
III) Résultats complémentaires.....	152
A. Caractérisation structurale de la LPC	152
1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	153
2. Dichroïsme circulaire	156
B. Réponse humorale induite contre un antigène du VIH.	157
C. Réponses immunes cellulaires induites par les LPC	162
1. Evaluation des réponses immunes cellulaires contre des antigènes viraux.....	163
a. Réponses cellulaires contre la protéine NS3 du VHC	163
b. Réponses cellulaires contre la protéine E7 du VPH	166
2. Evaluation de l'effet adjuvant des LPC dans un modèle d'épreuve alternative.....	169
a. Description du modèle.....	170
b. Résultats	171
D. Effet adjuvant des LPC sur l'immunogénicité d'un vecteur viral MVA	173
1. Influence de la LPC sur le pouvoir infectieux du TG4040	173
2. Activité adjuvante de la LPC sur l'immunogénicité du TG4040.....	175
E. Implication d'un récepteur TLR dans l'activité des LPC.....	177
Discussion.....	180
Annexe technique	197
A. Test d'infectivité du MVA <i>in vitro</i> sur BHK-21	197
A. Test d'infectivité du MVA <i>in vitro</i> sur BHK-21	198
B. ELISpot IFNγ Murin (splénocytes)	199
C. ELISpot IFNγ Murin (ganglions lymphatiques et rates)	202
D. Marquage intracellulaire des lymphocytes T CD8+ et CD4+ sécrétants de l'IFNγ.....	204
E. Détection <i>ex vivo</i> des lymphocytes T cytotoxiques.....	207
F. Epreuve alternative à <i>Listéria monocytogenes</i>	211
G. ELISA pour la détection des anticorps anti-NS3 et anti-HBsAg.....	213
H. Analyses statistiques.....	214
Article 2 : Vaccination against hepatitis B and C: towards therapeutic application.....	215
Références bibliographiques	216

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Messieurs Bruno GUY, DVM, PhD, research scientist chez Sanofi-Pasteur, et Patrice MARCHE, directeur de recherche II à l'U823, qui ont accepté d'apporter leurs commentaires scientifiques à mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également M Thierry DELAIR, professeur 1^{ère} classe UCBL1, qui me fait l'honneur d'être l'examineur de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent ensuite aux équipes dirigeantes de Transgene et de l'unité INSERM - U851 qui m'ont permis d'effectuer une thèse en convention CIFRE au sein d'une société en pleine évolution et dans un laboratoire dynamique : Madame Geneviève INCHAUSPE, responsable du département des maladies infectieuses de Transgene, et Messieurs Philippe ARCHINARD, PDG de Transgene, Jean-Yves BONNEFOY, directeur scientifique chez Transgene et Vincent LOTTEAU, directeur de recherche II et directeur adjoint de l'unité U851.

Je souhaite remercier avec un intérêt tout particulier Anne FOURNILLIER, responsable du laboratoire des candidats vaccins chez Transgene et Laure PERRIN-COCON, chargée de recherche à l'U851, qui ont été à mes côtés durant cette thèse, m'éclairant et me guidant intellectuellement tout au long de ces 3 années.

Enfin, je remercie celles et ceux qui ont partagé mon quotidien dans les laboratoires durant ces 3 années. Chacun à sa manière m'a fait bénéficier de son expérience et de ses qualités qui sont autant de rencontres ayant agréablement rythmé mes journées. Mes remerciements s'adressent aux membres de l'IBCP: François Penin, Jean-Pierre Lavergne, Roland Montserret et Patrice Gouët ; aux membres de l'U851 : Aurélie, Sandra, Olivier pour leur aide technique, scientifique et leur gentillesse ; et aux membres de Transgene Lyon et Strasbourg. Je ne peux pas tous les nommer ici, mais je les remercie pour leur constant support, à la fois sur le plan scientifique, technique, professionnel et personnel

Abréviations

Ac :	anticorps
Ad :	adénovirus
BSA :	albumine de serum de boeuf
CBA :	cytometric bead assay
CD :	cellule dendritique
CDxx :	cluster de différenciation
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot :	enzyme-linked immunospot assay
HBsAg :	hepatitis B surface antigen
i. m. :	intra-musculaire
i. v. :	intra-veineux
ICS :	intracellular cytokine staining
Ig :	immunoglobuline
Il-x :	interleukine
IP-10 :	(γ) interferon inducible protein
IRIV :	immunopotentiating reconstituted influenza virosome
LB :	lymphocyte B
LDL :	low density lipoprotein
LPC :	lysophosphatidylcholine
LT :	lymphocyte T
MCP-1 :	monocyte chemotactic protein
MIP-1 :	macrophage inflammatory protein
Mkg :	Mikrogen
MoDC :	monocyte-derived dendritic cell
MPLA :	monophosphoryl lipid A
MVA :	modified virus of Ankara
nAc :	anticorps neutralisant
NK :	natural killer
NS3 :	non structurale 3
PAMP :	pathogen associated molecular pattern
PBS :	phosphate buffer saline
PCR :	protéine C réactive
RCPG :	récepteur couplé aux protéines G
RPA :	réponse de phase aiguë
s. c. :	sous-cutané
SAA :	protéine sérique amyloïde A

SFU:	spot-forming units
SVF :	sérum de veau foetal
Th :	lymphocyte T auxiliaire
TLR :	toll-like receptor
VHB :	virus de l'hépatite B
VHC :	virus de l'hépatite C
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
VPH :	virus du papillome humain

Etude Bibliographique

I) Le système immunitaire humain : de la reconnaissance des pathogènes à la protection physiologique

Les êtres humains sont protégés du monde extérieur par une surface épithéliale étendue qui forme les muqueuses et la peau et constitue le premier rempart aux agents étrangers. Porte privilégiée d'entrée du monde extérieur, on y retrouve tous les éléments nécessaires au développement de la réponse immunitaire innée. Cette réponse est non spécifique, rapide, coordonnée et est efficace et suffisante contre la plupart des agressions. De plus, elle est capable d'informer rapidement l'organisme de la présence d'un agent infectieux permettant, indirectement, le développement de la réponse immunitaire adaptative et mémoire.

A. Le système immunitaire inné

L'entrée d'un agent exogène déclenche une série de mécanismes qui visent à le reconnaître et à l'éliminer de l'organisme si il est considéré dangereux. La réponse immunitaire innée répond très rapidement à une grande variété d'agents étrangers sans qu'il y ait eu besoin d'une rencontre préalable. Nous allons voir dans ce paragraphe comment la discrimination se réalise et quelles sont les réponses induites.

1. Reconnaissance

Le système immunitaire des êtres vivants est capable de détecter et de répondre à la présence de la plupart des éléments étrangers. Pour cela, il reconnaît des motifs structuraux qui sont portés par les bactéries, les virus ou encore les parasites et les champignons [8]. On les appelle les « motifs moléculaires associées aux pathogènes » (PAMP pour Pathogen Associated Molecular Pattern), ils sont reconnus par des « récepteurs de reconnaissance des pathogènes » (PRR pour Pattern Recognition Receptor) retrouvés sur la plupart des

cellules de l'immunité innée (e. g. cellules dendritiques, macrophages, monocytes, neutrophiles ...) et par le système du complément qui sera évoqué plus loin. Les récepteurs PRR constituent la première ligne de défense de la réponse immunitaire innée et leur activation oriente les réponses immunitaires vers le système de défense le plus adapté pour combattre le pathogène. On peut regrouper les PRR en deux grands groupes, les récepteurs de type toll (TLR, Toll-Like Receptors) et les récepteurs de type non toll (Figure 1).

a. Les récepteurs de type toll (TLR)

Les TLR font partie d'une famille de glycoprotéines membranaires comprenant au moins 13 membres (TLR1 à 13). Ils possèdent un domaine extracellulaire constitué de motifs répétés riches en leucine en forme de fer à cheval (domaine LRR pour Leucine-Rich-Repeat [60]) et une queue cytoplasmique contenant un domaine homologue au récepteur à l'IL-1 appelé TIR (Toll/IL-1 receptor homology domain). Les TLR1, 2, 4, 5, 6, 10, 11, 12 sont exprimés à la surface des cellules et les TLR3, 7, 8, 9 sont exprimés dans les endosomes. L'homme exprime les TLR1 à 10 (TLR11 n'est pas fonctionnel) et la souris exprime les TLR1 à 13 (TLR10 est un pseudogène) [37]. Ces récepteurs sont associés à des molécules adaptatrices qui sont les premiers éléments d'une signalisation cytoplasmique complexe. Cinq molécules adaptatrices existent, l'adaptateur MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), l'adaptateur TIRAP ou MAL (TIR associated protein ou MyD88-adaptor-like), l'adaptateur TRIF ou TICAM1 (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN β ou TIR-domain-containing molecule 1), l'adaptateur TRAM (TRIF-related adaptor molecule) et l'adaptateur SARM (sterile alpha (SAM) and HEAT/Armadillo (ARM) motifs) [360]. La liaison d'un ligand sur un TLR entraîne la dimérisation du récepteur, homologue ou hétérologue, et des modifications conformationnelles qui lui permettent de recruter les molécules adaptatrices par interactions TIR-TIR avec sa queue cytoplasmique. La signalisation qui s'en suit, mise en évidence notamment grâce à des modèles de souris knock-out, fait intervenir de nombreux adaptateurs moléculaires et des réactions d'ubiquitination et de phosphorylation [8]. La signalisation MyD88 dépendante, engageable

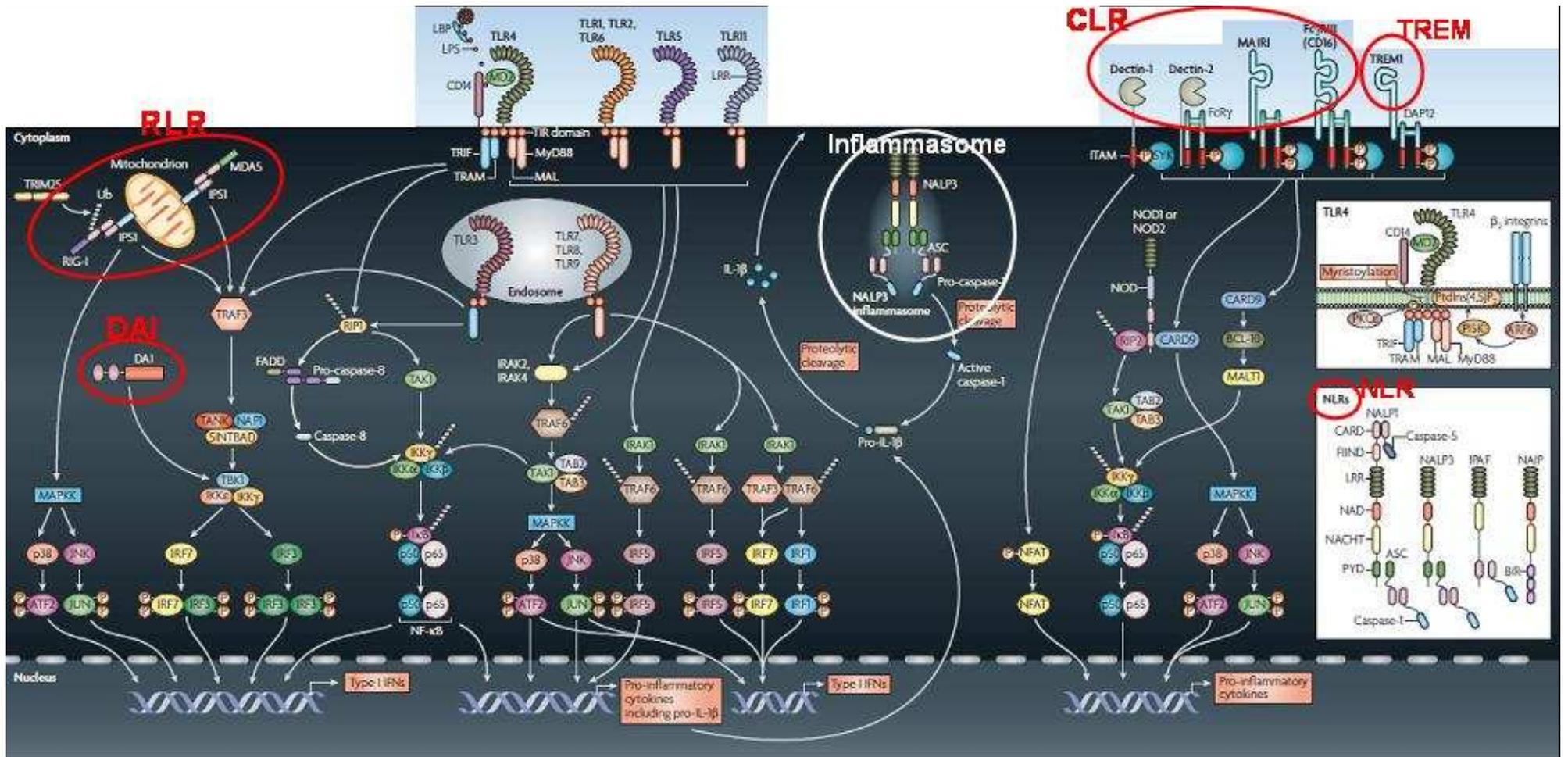


Figure 1: Représentation schématique des récepteurs de l'immunité innée et de leur signalisation (modifiée d'après [191]). Les récepteurs de type toll (TLR) sont présentés en forme de « points d'interrogation » colorés. On distingue TLR1, 2, 4, 6, 5 et 11 exposés à la surface de la cellule, et TLR3, 7, 8 et 9 présents dans l'endosome. Un agrandissement des interactions moléculaires autour de TLR4 est proposé sur la droite. L'adaptateur SARM n'est pas représenté sur ce schéma. Les récepteurs de type non toll sont indiqués par un cercle rouge. On distingue les RLR, DAI, CLR, TREM et NLR dont une structure associée est présentée dans le cercle blanc (*i. e.* inflammasome). Abréviations : se référer au texte.

par tous les TLR sauf TLR3 induit le recrutement et la phosphorylation d'IRAK1 et 4 (IL-1 receptor associated protein kinase) qui en retour s'associent à TRAF6 (TNF receptor-associated factor). Ce complexe subit une ubiquitination et recrute vers lui un autre complexe formé de TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) et de protéines associées (TAB1 à 3). D'autres phosphorylations MAP kinases dépendantes conduisent à la modulation des facteurs de transcription NF-KB, IRF-5 qui, consécutivement, stimulent les gènes impliqués dans la sécrétion de cytokines pro inflammatoires (*e. g.* IL-1 β , IL-6, TNF α). La deuxième voie de signalisation, TRIF dépendante, peut faire suite à l'activation des TLR3, 4, 7 et 9 et active la production des interférons de type I, IFN α et IFN β , aux activités, respectivement, antivirales et anti-prolifératives. TRIF peut interagir avec RIP1 (receptor-interacting protein 1) et induire directement l'activation de NF- KB et donc la production d'IFN α/β . TRIF s'associe également avec TRAF3 pour activer TBK-1 (TRAF-family-member-associated NF- KB activator binding kinase 1) qui phosphoryle IRF-3 et -7. Les homodimères IRF-3 ou IRF-7 atteignent le noyau et se lient aux ISRE (IFN-stimulated response element), responsables de l'activation des gènes de l'IFN de type I. La voie TRAM dépendante est activée après ligation avec TLR4 et ré-engage la signalisation vers la voie TRIF dépendante. Enfin, la fonction de SARM est encore conflictuelle. Une première étude sur cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293) montre que SARM agit directement sur TRIF par interaction avec ses domaines TIR et SAM. Cette liaison inhiberait la signalisation par TRIF et par TRAM après activation des TLR3 et 4, respectivement. Une seconde étude utilisant des souris SARM^{-/-} montre que le domaine ARM de SARM se lie à la mitochondrie des cellules neuronales et

recrute JNK3, impliqué dans la mort neuronale après stress cellulaire. Dans ce modèle de knock-out, les macrophages répondent normalement suite à l'activation des TLR3 et 4. Ces données contradictoires envisagent une spécificité d'espèce pour SARM [163].

De façon générale, les TLR5, 7, 8, 9 et 11 signalent uniquement par la voie MyD88, les TLR1, 2 et 6 utilisent la voie TIRAP en plus, le TLR3 agit par TRIF et toujours de façon MyD88 et TIRAP indépendante et enfin le TLR4 utilise les adaptateurs TIRAP et TRAM pour recruter MyD88 et TRIF.

La nature des PAMP reconnus par les TLR est très variée [8]. Les TLR3, 7, 8 et 9 reconnaissent les séquences d'acides nucléiques décelables durant des infections virales qui sont, respectivement, de l'ARN double brin, de l'ARN simple brin (TLR7 et 8) et de l'ADN (viral ou bactérien). Les TLR1, 2 et 6 reconnaissent les sucres et les lipides des bactéries, champignons et parasites (*e. g.* lipopeptides, zymosan, glycosylphosphatidyl). Les TLR 4 détectent les lipopolysaccharides bactériens, les protéines virales (*e. g.* enveloppe du virus respiratoire syncytial) et les molécules endogènes comme les protéines du choc thermique ou l'acide hyaluronique. Enfin, les TLR5 reconnaissent la flagelline des bactéries, et le ligand des TLR10 reste inconnu bien que sa proche parenté avec TLR1 et 6 laisse supposer des ligands identiques [148].

b. Les récepteurs de type non toll (non TLR)

La reconnaissance innée non induite par les TLR peut se faire via 5 familles de récepteurs : les CLR (C-type lectin-like receptors), les NLR (NOD-like receptors), les RLR (RIG-I-like receptors), les DAI (DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors) et le TREM (triggering receptor expressed on myeloïd cells) [183] (Figure 1).

Il existe 17 membres dans la famille des CLR et ils sont exprimés par les CD, les monocytes, les macrophages ou encore les plaquettes. Les CLR sont soit liées à la membrane, soit sous une forme soluble et ils partagent un domaine CRD (carbohydrate recognition domain) qui existe en un ou plusieurs exemplaires dans le récepteur. Ils reconnaissent une grande variété de ligands qui peuvent être des sucres endogènes, des

sucre pathogène ou des structures « non-sucre ». Outre leur capacité à activer des gènes de l'immunité innée, la signalisation via ces récepteurs peut moduler l'activation des récepteurs TLR. Ainsi, les CLR jouent un rôle se situant sans doute autant dans le maintien de l'homéostasie que dans le développement des défenses immunitaires. Ils peuvent interagir dans l'adhésion, la migration et la phagocytose, mais également dans la reconnaissance des virus, mycobactéries, champignons, bactéries et helminthes. Ils sont particulièrement importants pour permettre l'internalisation des pathogènes et aider la cellule phagocyte à dégrader ce dernier et ainsi favoriser l'induction de réponses immunes [112]. Parmi les CLR connus, on trouve le récepteur aux mannoses et les récepteurs DEC-205, DC-SIGN, SIGN-R1, dectin-1, langerin. On peut juger de leur mécanisme complexe en étudiant, par exemple, la reconnaissance par DEC-205 d'une structure qui, pour permettre le développement d'une réponse immunitaire plutôt que la tolérance, doit nécessairement engager un TLR en parallèle [349]. Enfin, si l'on prend en exemple l'un des CLR les plus étudiés, le récepteur Dectin-1 qui reconnaît les liaisons (1,3)- β -glucanes, les CLR activent diverses réactions cellulaires de défense. En effet, l'activation de Dectin-1 stimule par exemple l'endocytose, la maturation des CD ou encore la sécrétion de cytokines et de chimiokines (e. g. TNF, IL-6, IL-10) après co-activation d'un récepteur TLR. Dectin-1 signale par recrutement de SYK1, qui active le complexe Bcl10/Malt1 dépendant de CARD9. L'activation conduit à la stimulation de NF- κ B par le complexe IKK et est responsable de l'induction de cytokines pro- et anti-inflammatoires (e. g. IL-12, TGF- β , IL-10, IL-23 ...). Dectin-1 signale également par RAF-1 et, de façon collaborative avec DC-SIGN, stimule ainsi la différenciation des lymphocytes Th1 et la production d'IL-17 par les Th17, responsables d'une défense efficace contre les infections à champignons. D'autres voies de signalisation, Syk-indépendante, permettent de médier l'effet de ces récepteurs.

Les NLR sont exclusivement cytoplasmiques ; ils contiennent un motif central de liaison nucléotidique (NACHT), un domaine C terminal LRR et un domaine d'interaction N terminal CARD (caspase activation and recruitment domain), PYD (pyrin domain) ou BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat). On distingue les récepteurs NOD1 et NOD2 qui

reconnaissent des composants des peptidoglycanes bactériens (γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid iE-DAP et muramyl dipeptide MDP) résultant dans le recrutement de RICK/RIP2 et l'activation de NF-KB. On trouve également les récepteurs NLRP1, 3 et NLRC4 dont la stimulation active la production d'IL-1 β , d'IL-18 et d'IL-33 via la formation d'un complexe protéique appelé l'inflammasome et dont le nom est formé à partir du récepteur activé (*i. e.* inflammasomes NLRP1, 3 et NLRC4). Ce complexe est formé du récepteur NLR, de la cystéine protéase caspase-1 et/ou caspase-5 et de la molécule adaptatrice ASC, et clive les pro-séquences de pro-IL-1, pro-IL-18 et pro-IL-33. Les ligands de ces NLR restent imprécis, on sait toutefois que NLRC4 reconnaît la flagelline, et NLRP3 reconnaît l'ARN bactérien, l'ATP, les cristaux d'acide urique, les sels d'aluminium et l'hémozoïne [247]. Ce dernier est un cristal insoluble formé lors de la détoxification de l'hème par le *Plasmodium falciparum* dans les hématies d'un individu infecté, et qui est relâché dans la circulation sanguine après lyse des globules rouges. Les mécanismes précis d'activation des NLR restent flous, mais une étude récente montre l'implication d'une signalisation par les kinases Syk et Lyn en amont de l'activation du NLRP3 par l'hémozoïne, permettant une des premières élucidations des mécanismes globaux d'induction des NLR [339].

Les RLR sont également des récepteurs cytoplasmiques qui reconnaissent les ARN simple et double brins. Trois protéines contenant toute un domaine hélicase existent. Les deux premières, RIG-I et MDA-5, reconnaissent les ARN double brin (et simple brin pour RIG-I) par leur domaine CARD et induisent la production d'interférons de type I. La troisième, LGP2, serait un régulateur négatif des réponses immunes induites par RIG-I et MDA-5 par liaison compétitive avec les ARN. Après activation, RIG-I et MDA-5 lient IPS-1 (également appelé Cardif) à la surface des mitochondries et activent les complexes IKK et TBK-1/TRAF3 qui induisent l'action de NF-KB et IRF-3 et -7 sur les gènes producteurs des IFN de type I. RIG-I est essentiel dans la reconnaissance des paramyxovirus (e. g. virus de la stomatite vésiculaire) et des orthomyxovirus (e. g. virus de la grippe) alors que MDA-5 est spécialisé dans la détection des picornavirus [182]. Ces récepteurs sont d'ailleurs la cible de protéines virales, comme la protéine non structurale 3 (NS3) du virus de l'hépatite C qui est capable de

cliver IPS-1, inactivant une voie de reconnaissance innée pouvant contribuer à la persistance virale [155].

Le DAI (également appelé ZBP1 ou DLM-1) est capable d'interagir directement avec de l'ADN double brin présent dans le cytoplasme cellulaire, qu'il soit pathogénique ou dérivé de l'hôte. L'activation de DAI stimule la production d'IFN de type I par activation d'IRF-3 via TBK-1 suivant, possiblement, la dimérisation / oligomérisation de molécules de DAI. Il existe sans doute d'autres récepteurs de type DAI et de nombreux régulateurs négatifs comme ceux déjà identifiés appartenant à la famille ADAR (adenosine deaminase acting on RNA 1) [368].

Les TREM sont des récepteurs encore peu connus qui amplifient ou réduisent les signaux induits par les TLR. On trouve dans cette famille les récepteurs TREM-1 et -2, TLT-1 et -2 (TREM-like transcript) et PDC-TREM (plasmacytoïd dendritic cell-TREM qui pourrait jouer un rôle dans les productions d'IFN α [369]). Ils ont la particularité d'exister sous forme membranaire et soluble. A l'heure actuelle, un seul ligand, B7-H3 (famille B7), liant TLT-2 à été identifié. La signalisation des TREM fait intervenir CARD9 et des interactions avec des protéines adaptatrices contenant des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine based activation motif) [104].

c. Le système du complément

Ce système est composé de plus de 30 membres parmi lesquels on trouve des protéines plasmiques, des glycoprotéines et des récepteurs. Il agit par cascade enzymatique grâce à des mécanismes d'interactions entre protéines, et il est largement impliqué dans la reconnaissance et la défense contre les pathogènes, mais aussi dans le développement de réponses pro-inflammatoires, anti-inflammatoires et immunes exacerbées défavorables à son hôte. Il existe trois voies d'activation du système du complément :

- la voie classique : activée par les complexes immuns « anticorps-antigène » ou « protéine de la phase aiguë-antigène » (voir chapitre III), cette voie active la molécule C1q,

- la voie alternative : activée par la liaison directe avec les pathogènes contenant des sucres et des lipides (e. g. LPS, zymosan), cette voie active la molécule C3,

- la voie lectine : activée par la liaison d'une protéine sérique circulant, la MBL (mannose-binding lectin), avec des structures pathogéniques répétées contenant du mannose, cette voie active les molécules C2 et C4.

En réponse à ces diverses activations, les cascades enzymatiques conduisent principalement à l'activation des molécules C5a et C3a (ou anaphylatoxines). Trois grandes fonctions sont attribuables aux produits intermédiaires et finaux de la cascade enzymatique : le recrutement de cellules inflammatoires (e. g. monocytes, neutrophiles), l'opsonisation des pathogènes, la lyse des pathogènes par formation de pores. Le rôle central de ces molécules en fait des cibles intéressantes dans le cadre des stratégies thérapeutiques [126], mais ces aspects ne seront pas développés dans ce mémoire.

2. Développement de l'immunité innée

Après intrusion d'un agent pathogène, les cellules exprimant les récepteurs TLR et non TLR (phagocytes polynucléaires : neutrophiles, éosinophiles, basophiles, et mononucléaires : macrophages, cellules dendritiques) sécrètent des cytokines et chimiokines qui sont massivement déversées dans la circulation sanguine et vont recruter de nouvelles cellules immunitaires. Parmi les molécules les plus sécrétées, on trouve l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le TNF α , GRO α ou encore MIP-1 α/β [348]. Très rapidement, et en réponse à ces signaux, neutrophiles (activités anti-bactérienne et anti-fongique), éosinophiles (activités anti-parasitaires et rôle dans les réactions allergiques) et monocytes, qui deviendront des macrophages ou des cellules dendritiques (voir paragraphe A.4.), s'accumulent sur le site d'intrusion et amplifient la réponse [37]. Pour que les cellules adhèrent, traversent la paroi endothéliale et entrent dans le tissu infecté, le TNF α et l'IL-1 β augmentent l'expression des molécules d'adhésion (VCAM, ICAM, sélectine) à la surface des cellules endothéliales et l'IL-8 stimule la diapédèse. Sur site, les cellules participent à l'élimination des pathogènes grâce à des mécanismes oxydatifs hautement agressifs qui

utilisent le peroxyde d'hydrogène et les ions superoxydes [37]. Ces activités sont complétées par l'action de cellules tueuses appelées les NK (Natural Killers).

3. Les cellules tueuses naturelles (Natural Killer, NK)

a. Description

Les cellules NK sont de larges lymphocytes granuleux dérivées de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ qui n'expriment ni le marqueur CD3 (marqueur des lymphocytes T) ni le marqueur CD19 (marqueur des lymphocytes B). En revanche, les NK sont principalement reconnues par l'expression du CD16 (Fcy receptor III) et du CD56 (isoforme de la molécule d'adhésion aux cellules neuronales humaine). CD56 n'est cependant pas exprimé par les NK des souris et il semble qu'un autre marqueur, NKp46, soit plus approprié pour identifier les NK entre espèces car il est exprimé par les NK de divers mammifères (souris, singes, rats, humains ...) [365]. Chez l'être humain, après leur production dans la moelle osseuse, les progéniteurs CD34⁺ se transforment en précurseurs des NK ayant un phénotype CD34⁺CD56⁻CCR7⁺CD62L⁺ et sont ensuite déversés dans la circulation. La transformation se fait par l'activation des récepteurs à tyrosines kinases des progéniteurs, c-kit (ou CD117) et flt-3 (ou CD135, FMS-related tyrosine kinase receptor 3), dont les ligands sont présents dans la moelle osseuse. L'expression de CCR7 (marqueur d'adressage aux organes lymphoïdes) et de CD62L (ligand de la sélectine) permet aux précurseurs d'atteindre les organes lymphoïdes secondaires qui ont récemment été identifiés comme le second lieu de développement des NK [97]. Dans ces organes, les précurseurs sont maintenus par la présence d'IL-15, sans doute fournie sous une forme membranaire liée aux cellules dendritiques [50]. Sous l'influence des cytokines produites par les cellules dendritiques activées et les lymphocytes T présents dans l'organe lymphoïde, l'IL-12 obligatoirement et l'IL-2, l'IL-15 ou l'IL-18 optionnellement, les précurseurs CD34⁺CD56⁻ se transformeront en NK exprimant fortement le marqueur CD56 (CD56^{bright}) et faiblement CD16 (CD16^{low}). Ces NK, CD56^{bright}, ont une fonction régulatrice sur les réponses immunitaires car elles sécrètent de larges quantités d'IFN γ , de TNF α/β , de GM-CSF et d'IL-10 (activités anti-

virales, amplification/inhibition des réponses) qui en retour activent cellules dendritiques et lymphocytes T, créant une dynamique bidirectionnelle entre la réponse innée et adaptative [101]. Les NK CD56^{bright} n'ont pas d'activités cytotoxiques, on les trouve dans les organes lymphoïdes et sur les sites d'inflammation. Il existe un second type de cellules NK qui expriment faiblement CD56 (CD56^{dim}) et fortement CD16 (CD16^{high}) dont l'origine semble être maintenant démontrée. En effet, une étude récente montre qu'une interaction entre le récepteur FGFR-1 (fibroblast growth factor-1), trouvé dans les organes lymphoïdes et les sites d'inflammation, et le récepteur CD56 des NK CD56^{bright}, transformerait ces dernières en NK CD56^{dim} [53]. Ces cellules circulent dans le sang et dans la rate et possèdent des activités cytotoxiques mais ne secrètent que peu de cytokines.

b. Activités cytotoxiques des NK

La première activité cytotoxique des NK CD56^{dim} passe par l'utilisation du récepteur CD16 permettant de lyser les cellules infectées couvertes par des immunoglobulines (Ig). On parle de toxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity). En effet, l'engagement du fragment Fc des Ig attachées au pathogène sur le récepteur CD16 des NK CD56^{dim} entraîne la dégranulation des NK, libérant la perforine, les granzymes A et B (GrzA/B) et la granulysine [57]. Il a longtemps été considéré que la perforine formait des trous dans la membrane cellulaire cible permettant aux autres molécules d'entrer dans la cellule. Il semble cependant que le GrzB puisse être internalisé après s'être fixé sur des récepteurs aux mannoses, entraînant avec lui les autres molécules. Également, les trous de la perforine pourraient laisser entrer du calcium dans la cellule qui, en réponse, initierait des systèmes de réparation membranaire permettant la prénétration des GrzA/B adhérents à sa membrane. Quelque soit le mécanisme, à l'intérieur de la cellule cible, les Grz sont susceptibles de lyser la membrane des mitochondries libérant du cytochrome-C activateur de la caspase 9, ou d'interagir directement avec le mécanisme des caspases, pour déclencher une apoptose intracellulaire [299]. Enfin, la granulysine, un membre de la

famille des saponines, peut former des pores sur les membranes cellulaires et mitochondriales [57].

La seconde activité lytique des cellules NK CD56^{dim} est une activité directe (Ig- et antigène-indépendante) qui se développe grâce à un ensemble de récepteurs inhibiteurs ou activateurs de la dégranulation exprimés par la NK. La régulation de la dégranulation est modulée par l'expression de ces récepteurs et par des signaux d'activation et d'inhibition reçus par la cellule [357]. On distingue 3 groupes de récepteurs : les récepteurs CLR (C-type lectin-like receptors) représentés par ceux des familles CD94 et NKG2, les récepteurs ILT (immunoglobulin-like transcripts) et les récepteurs KIR (killer immunoglobulin-like receptors). Les récepteurs inhibiteurs (*e. g.* récepteurs CD94-NKG2A, KIR-1L, ...), porteurs du motif cytoplasmique ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), répriment la NK lorsqu'ils détectent des ligands normalement exprimés en condition homéostatique sur la cellule cible. Ils ne l'activent que lorsqu'ils détectent une altération (*i. e.* absence ou diminution) dans l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), molécules qui sont exprimées par la majorité des cellules hématopoïétiques en condition homéostatique. Les récepteurs activateurs comme NKG2D (motifs ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif), activent la NK après détection d'un de leur ligand (*i. e.* MICA et MICB) exprimé par une cellule lorsqu'elle est stressée / infectée afin qu'elle soit détruite [358]. La cellule NK activée via ces récepteurs dégranule et peut également lyser la cellule cible par expression du ligand au récepteur d'activation de l'apoptose, le ligand Fas (FasL). La liaison de FasL sur son récepteur Fas (CD95) exprimé par la cellule cible active l'apoptose de celle-ci.

Les activités des cellules de l'immunité innée servent principalement à la défense précoce de l'hôte face au pathogène. Seules les cellules dendritiques sont capables d'instruire efficacement et de réguler finement les réponses immunitaires adaptatives.

4. Les cellules dendritiques (CD)

Les cellules dendritiques prennent leur origine dans la moelle osseuse et rejoignent la circulation et les tissus périphériques. Leur particularité anatomique, résidant en la présence de longs « bras » appelés dendrites, leur permet de sonder le milieu extérieur et surveiller en permanence la présence des corps étrangers. Il existe diverses sous populations de cellules dendritiques aux phénotypes et aux activités propres.

a. Les populations de cellules dendritiques

Les connaissances concernant les origines et les fonctions des CD sont en évolution constante. On considère actuellement que l'on peut classer les CD murines en deux catégories : les précurseurs des cellules dendritiques (pré-CD) et les cellules dendritiques conventionnelles (cCD) [305]. Cette classification semble prendre le pas sur celle qui divisait les cellules dendritiques en CD d'origine lymphoïdes et myéloïdes [380]. Il semble que l'équivalent humain à cette classification ne soit pas encore défini, nous avons donc choisi dans ce chapitre de ne présenter que les informations issues des études murines.

Les pré-CD sont des cellules qui n'ont ni la forme ni les fonctions classiques d'une CD, mais sont en phase finale de transformation en CD. Il existe différentes pré-CD qui se transforment en diverses cellules dendritiques, en condition homéostatique ou sous l'action de stimuli (pathogénique ou inflammatoire). En condition homéostatique, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pCD) sont considérés comme des pré-CD. Après activation par un stimulus viral (*e. g.* motifs CpG,...), les pCD acquièrent une morphologie de CD et circulent dans le sang et dans les organes lymphoïdes. Elles ont une longue durée de vie et sont caractérisées par un phénotype B220⁺ Ly6C⁺ (B220 : équivalent murin de CD45, marqueur des cellules hématopoïétique ; et Ly6C : marqueur des LT CD8 murines) et par un niveau intermédiaire de CD11c (CD11c^{int}, marqueur des CD murines). Elles sécrètent aussi de grandes quantités d'IFN de type I, notamment après activation de leurs TLR7 et 9 qu'elles sont les seules à exprimer [302]. Leur implication dans la présentation des antigènes et dans l'activation des lymphocytes T est encore conflictuelle. Les monocytes, précurseurs des

macrophages, peuvent aussi être considérés comme des pré-CD. Durant l'inflammation ou pendant une situation de stress cellulaire, des monocytes inflammatoires ou non inflammatoires se différencient en CD qui expriment, respectivement, les marqueurs Ly6C⁺GR1⁺ ou Ly6C⁻GR1⁻ chez la souris et CD14^{high}CD16⁻ ou CD14^{low}CD16⁺ chez l'homme [193].

Les CD conventionnelles expriment CD11c et sont sous divisées en 2 catégories. Dans la première catégorie on trouve les cCD « résidentes », issues d'un précurseur du sang, elles se dirigent vers un organe lymphoïde qu'elles ne quitteront plus. Sous l'action du ligand flt-3 (FMS-related tyrosine kinase 3), les cCD se transforment en CD CD8α⁺ aux activités pro-Th1 ou en CD CD8α⁻ aux activités pro-Th2. Elles sont fortement représentées dans le thymus (CD thymiques) et sont les seules CD retrouvées dans la rate (CD spléniques). Dans la seconde catégorie on trouve les cCD « migratoires » qui se logent dans les tissus périphériques puis migrent vers les ganglions drainants sous l'influence ou non d'une stimulation. On trouve parmi les cCD migratoires : les cCD de l'épiderme (appelées cellules de Langherans), les cCD interstitielles et enfin les cCD de l'épithélium dont il existe deux types, pulmonaire (CD103⁺CD11b⁻ et CD103⁻CD11b⁺) et dermique (CD103⁺CD11b⁻langerin⁺ et CD103⁻CD11b⁺langerin⁻) [356].

b. La présentation des antigènes par les CD

Dans les tissus périphériques, les CD patrouillent et ingèrent des particules et sont, éventuellement (cas de la présence d'un pathogène), stimulées par les motifs PAMP. Suivant un mécanisme MAP kinase dépendant, cette stimulation est responsable de réarrangements des structures d'actine de la CD conduisant à des modifications de ses fonctions [370].

L'une des principales fonctions de la CD est son activité de présentation d'antigènes pour la future activation des lymphocytes T (LT). Deux types de présentations ont lieu, la présentation sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ou sur le CMH II. La présentation sur ces molécules est responsable de l'activation des

lymphocytes de type CD8⁺ et de type CD4⁺, respectivement, et permet le développement des réponses cellulaires (voir paragraphe I) B.2) Le premier type de présentation est utilisé pour les protéines endogènes retrouvées dans le cytoplasme, notamment après synthèse intra-cellulaire. Cette présentation a lieu dans la grande majorité des cellules de l'organisme. Elle fait intervenir plusieurs éléments : un complexe multi-protéique (le protéasome) qui dégrade les protéines en peptides, les protéines de transport des peptides (TAP, transporter associated proteins) qui les amènent dans le réticulum endoplasmique (RE) et des molécules du CMH I, constitutivement exprimées dans le RE, sur lesquels sont chargées les peptides. Ce chargement fait intervenir les éléments du complexe de chargement des peptides du CMH I comprenant des protéines chaperones du RE (calreticuline, ERp57 et tapasine) [122]. Le complexe CMH I-peptide est ensuite transporté à la surface de la cellule via l'appareil de Golgi. De son côté, la présentation sur le CMH II est utilisée pour présenter des peptides issus de la dégradation des protéines dans les endosomes. Les protéines du milieu extracellulaire accèdent à l'endosome après endocytose et les protéines endogènes y accèdent par autophagie [77]. Cette présentation est constitutivement fonctionnelle chez les cellules présentatrices d'antigènes dites professionnelles (*i. e.* CD, lymphocytes B, macrophages). Dans l'endosome, des protéases dégradent les protéines en peptides, qui sont ensuite chargés sur des molécules du CMH II issus du RE, puis le complexe peptide-CMH II est exposé à la surface de la cellule [153]. Parallèlement, il existe une voie de présentation des protéines extra-cellulaires sur des molécules du CMH I que seuls les macrophages et les cCD CD8⁺ utilisent de manière optimale : la présentation croisée [340]. Divers mécanismes sont mis en jeu durant cette présentation pour que les protéines exogènes soient amenées dans le cytoplasme et réorientées vers la présentation classique sur le CMH I. Par exemple, il a été montré que si les protéines exogènes ne sont pas engagées dans la présentation sur les CMH II alors qu'elles se trouvent dans l'endosome, elles peuvent être transportées activement vers le cytoplasme par des molécules de type TAP. Le passage dans l'une ou l'autre des voies est dépendant de la régulation des activités des enzymes protéolytiques dans l'endosome. On sait également que les protéines

exogènes peuvent être internalisées dans les phagosomes. Les composants du RE peuvent alors incorporer le phagosome et directement activer le chargement des peptides sur le CMH I ou activer le transfert actif de la protéine dans le cytoplasme par l'intermédiaire d'un transporteur appelé Sec-61. Enfin, les protéines du milieu extra-cellulaire peuvent être internalisées par liaison sur le récepteur aux mannoses. De cette façon, les protéines se retrouvent dans des structures endosomales précoces et sont ensuite activement transportées vers le cytoplasme [153].

L'activité des CD est conditionnée par un ensemble d'étapes cruciales définies en trois signaux : le signal 0 (activation des récepteurs innés type toll et non toll, internalisation d'un antigène), le signal 1 (présentation de l'antigène), et le signal 2 (molécules de co-stimulation) (Figure 2). Après rencontre avec le pathogène au niveau du site d'infection

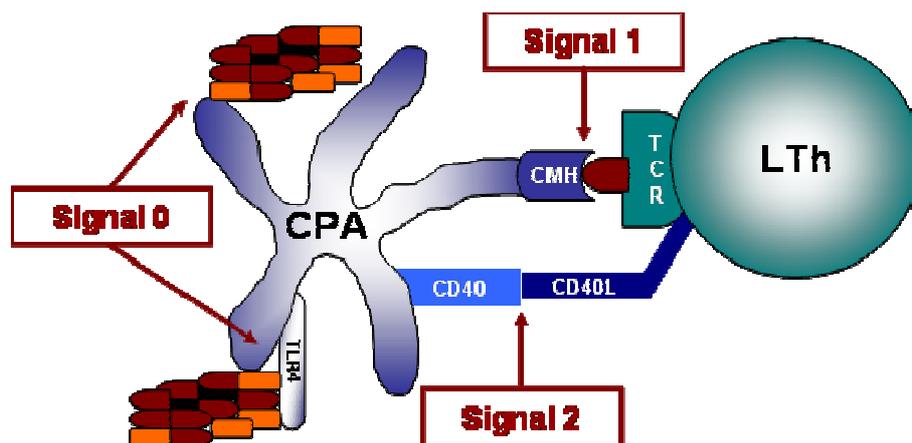


Figure 2: Signaux conditionnant les réponses immunitaires induites par la cellule dendritique (adaptée de [20;129]). Trois signaux gouvernent l'activité des CD. Le contact avec un agent pathogène constitue le signal 0. La présentation de l'antigène sur le CMH de la CD représente le signal 1. Enfin, le signal 2 est apporté par les molécules de co-stimulation de la CD aidant à la stimulation du LTh. CPA : cellule présentatrice d'antigènes, CMH : complex majeur d'histocompatibilité, TCR : T cell receptor, LTh : lymphocyte T auxiliaire.

(signal 0), les cellules dendritiques des tissus périphériques entrent dans une phase de maturation. La CD apprête l'antigène pathogène à sa surface (signal 1), perd ses capacités de phagocytose et exprime un récepteur de migration, CCR7, qui la guidera vers le ganglion drainant du site d'infection en suivant un gradient de concentration des chimiokines CCL19

et CCL21. Durant ce trajet, elle exprime à sa surface des molécules de présentation et de co-stimulation (signal 2) (e. g. MHC I et II, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD40, OX40, ...) qui vont contribuer à l'activation des lymphocytes T. Enfin, l'environnement stimulateur (signal 0) auquel la CD est exposée dans le tissu périphérique conditionne le devenir de la CD et son influence future sur la réponse adaptative comme nous le verrons plus loin [20].

Dans son ensemble, la situation qui fait intervenir les acteurs du système immunitaire inné précédemment décrits est dite inflammatoire et se traduit par le développement de quatre états majeurs superposés : la rougeur, le gonflement, la chaleur et la douleur. L'augmentation des réactions métaboliques et de l'afflux sanguin associé au recrutement de globules blancs explique la rougeur, le gonflement et la chaleur. La sécrétion d'un puissant vasodilatateur, la bradykinine [203], est impliquée dans les phénomènes de douleur (figure 3). Le déclenchement de la réponse immunitaire innée est un élément indispensable pour permettre la mise en place de la réponse adaptative, plus spécifique du pathogène ciblé.

B. Le système immunitaire adaptatif

1. La synapse immunologique

Les cellules dendritiques matures rejoignent les zones paracorticales (riches en lymphocytes T (LT)) et corticales (riches en lymphocytes B (LB)) du ganglion drainant du site d'infection. L'arrivée de ces populations se fait par des veines post-capillaires (HEV, high endothelial veinules) qui alimentent l'organe lymphoïde en liquide lymphatique, et qui permet la co-localisation des CD, LT et LB (figure 4A) [199]. Chaque clone de LT et LB porte plusieurs exemplaires d'un récepteur, respectivement TCR ou BCR (T cell receptor ou B cell receptor), qui reconnaît un déterminant antigénique unique déterminé lors de son développement par réassociation de gènes [156]. En effet, lors de l'éducation des

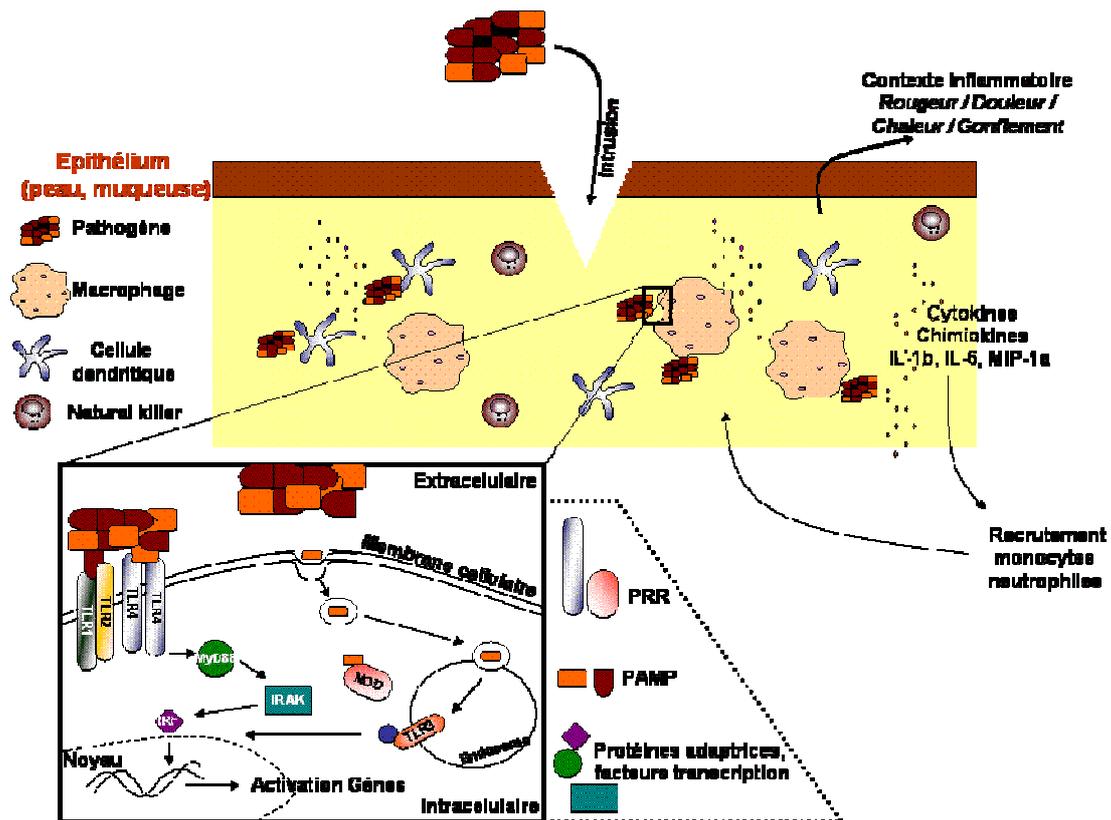


Figure 3: Etapes précoces de la réponse immunitaire innée et de l'inflammation. L'entrée d'un pathogène au niveau d'un épithélium entraîne sa prise en charge par les cellules du système immunitaire inné. La reconnaissance se fait par l'intermédiaire des PRR reconnaissant les PAMP des pathogènes. Les PRR activés, membranaires ou cytoplasmiques, activent les gènes dans le noyau cellulaire. En réponse, diverses cytokines et chimiokines sont déversées dans le milieu extracellulaire et dans la circulation sanguine. L'action systémique de ces substances permet le recrutement de polynucléaires et mononucléaires. Au niveau local, les sécrétions de cytokines, de chimiokines et l'afflux de cellules immunitaires déclenchent un état d'inflammation. PRR : Pattern Recognition Receptor, PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern.

lymphocytes T (dans le thymus) et B (dans la moelle osseuse), chaque cellule a subi une recombinaison originale des différentes parties des gènes V (variable), D (diversity) et J (joining) codant pour les unités structurales des TCR et BCR, respectivement. De plus, entre les segments V, D et J, l'enzyme TdT (terminal deoxynucleotide transferase) ajoute des nucléotides qui augmentent la diversité des réarrangements. Au final, cette association, orchestrée par les enzymes RAG1/2 (recombination-activating proteins), a eu pour effet de créer un récepteur unique qui sera exprimé en de multiples copies à la surface du lymphocyte. Ainsi, de nombreuses cellules dendritiques vont entrer en contact avec les

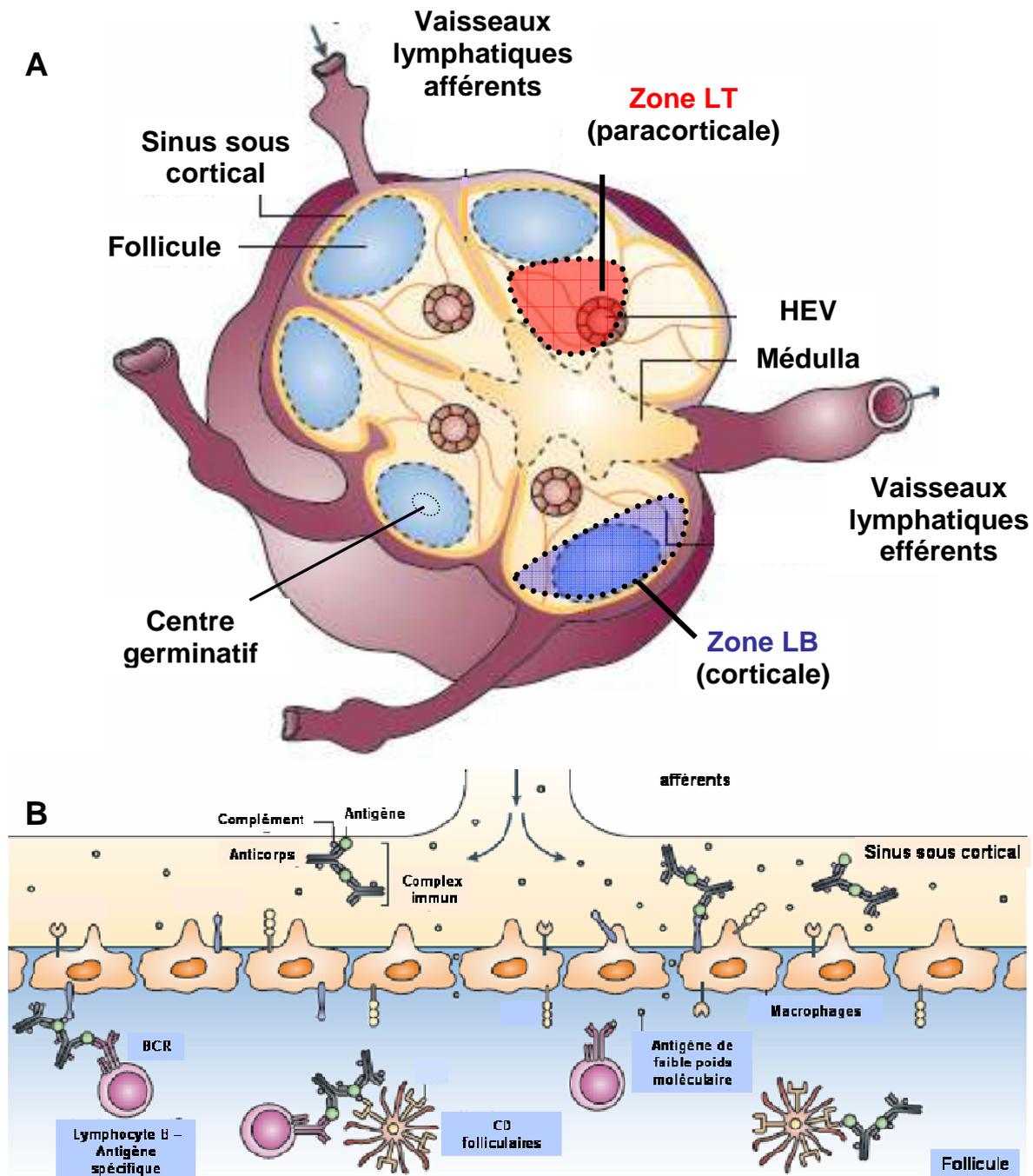
lymphocytes par l'intermédiaire du récepteur TCR ou BCR pour trouver le récepteur spécifique de l'antigène apprêté. L'interaction forme une synapse immunologique qui est constituée de deux parties se situant au niveau de la zone de contact avec la CPA. L'une centrale, c-SMAC (central supramolecular activation cluster), est le lieu des interactions de reconnaissance. On y trouve les molécules CMH, CD4, CD8 ou CD28 mais aussi des kinases pour l'aide à la formation de la synapse (LYN et SYK). L'autre périphérique, p-SMAC (peripheral SMAC), aide au renforcement de l'attache lymphocyte-CPA. On y trouve des intégrines comme LFA-1 et CD45 [266].

2. Les réponses à médiation cellulaire et humorale

a. Développement des lymphocytes T CD4+

Dans le ganglion, ce sont les cCD migratoires, venues des tissus infectés, et les cCD résidentes qui interagissent avec les LT exprimant CD4 et appelés LT CD4+ naïfs pour initier la réponse à médiation cellulaire (figure 5). Cellules dendritiques conventionnelles et LT sont les seuls partenaires capables d'initier les réponses immunitaires adaptatives et mémoires spécifiques d'un pathogène. Lorsque l'antigène porté par la CD reconnaît le LT exprimant le TCR adéquat, la synapse immunologique se renforce et déclenche une prolifération clonale du LT dont le devenir est influencé par les cytokines produites par la CD mais aussi par les molécules de co-stimulation de cette dernière [216]. Par exemple, CD80 et CD86 lient CD28 sur le LT, augmentant l'expression de CD40L à la surface du LT. En réponse, CD40L se lie sur le CD40 de la CD stimulant alors la production d'IL-12, d'IL-18 et d'IFN γ qui impacteront sur le LT naïf. L'expansion clonale est donc orientée, et durant celle-ci les LT CD4+ se transforment en lymphocytes T auxiliaires (LT helper) aux propriétés variées [323] :

- les LT helper 1 (Th1) dont l'apparition est conditionnée par la présence d'IL-2, d'IL-12 et d'IFN γ . Ils expriment CXCR3, CCR5, STAT1-4, T-bet et sécrètent de l'IFN γ et du TNF α aux activités antivirales et antibactériennes,



Figures 4: Organisation d'un organe lymphoïde et interactions. A) Un organe lymphoïde est constitué d'une zone centrale (médulla) et d'une zone corticale (riche en LB) contenant les follicules. Entre les deux, la zone paracorticale (riche en LT) se distingue, irriguée par les HEV. Les centres germinaux se développent au sein des follicules. Le réseau lymphatique irrigue l'organe par les vaisseaux lymphatiques afférents et repart par les vaisseaux efférents. B) L'arrivée par les vaisseaux afférents irrigue le sinus sous cortical. On y trouve des antigènes solubles ou complexés aux anticorps. Les macrophages forment une jonction entre le sinus sous cortical et le follicule où les LB et les FDC interagissent. HEV : high endothelial veinules, LB : lymphocyte B, FDC : cellule dendritique folliculaire.

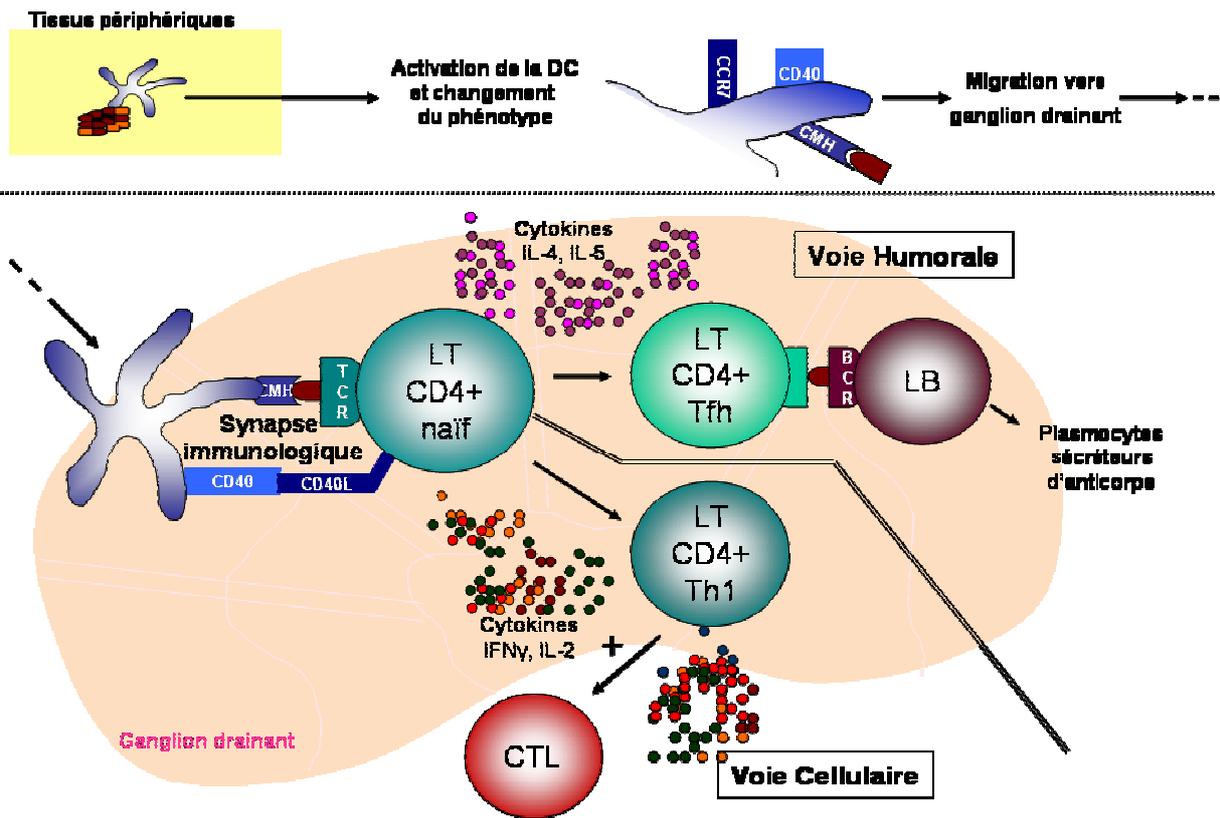


Figure 5: Réponses à médiation cellulaire et humorale. Dans les tissus périphériques, la CD est activée par la rencontre avec des agents pathogènes. Elle exprime alors des molécules de co-stimulation (CD40) et de localisation (CCR7) et entame sa migration vers le ganglion drainant du site d'infection. A son arrivée, elle contacte les LT CD4+ naïfs créant une synapse immunologique. Les LT CD4+ Th1 produisent IL-2, IFN γ et activent l'expansion clonale des CTL aux activités à médiation cellulaire. Les LT CD4+ Tfh supportent l'activation des LB qui se transforment alors en plasmocytes sécrétant d'anticorps (médiation humorale). CD : cellule dendritique, LT-LB : lymphocyte T-B, Th1-Tfh : LT helper1-folliculaire.

- les LT helper 2 (Th2) qui apparaissent sous l'action de l'IL-4 et de l'IL-5. Ces cellules produisent de l'IL-4 et de l'IL-13, expriment GATA-3, STAT-6 et entrent en jeu dans l'immunité contre les parasites extracellulaires,
- les LT helper 17 (Th17), qui se développent sous l'influence de l'IL-6, du TGF- β , et de l'IL-21, et qui sécrètent de l'IL-17 via l'activité du facteur de transcription ROR γ T. Les Th17 interviennent dans la régulation de l'inflammation et des infections par les champignons [178],

- les LT folliculaires (Tfh) qui sécrètent de l'IL-21, expriment CXCR5 et son ligand CXCL13 et sont les lymphocytes indispensables pour la stimulation des LB (prolifération, différenciation, réarrangement de gènes) [170].

Les lymphocytes T auxiliaires (Th1, Th2, Th17) peuvent être regroupés dans une même catégorie, et séparés des lymphocytes Tfh. En effet, les caractéristiques phénotypiques des LT auxiliaires (CCR7⁺) impliquent qu'ils se trouvent préférentiellement dans les zones corticales, (ou extra-folliculaires), tandis que les Tfh (CCR5⁺) résident dans les régions folliculaires. De plus, il semble que les Tfh soient issues d'un programme développemental distinct de celui permettant de générer les Th, expliquant sans doute les fonctions effectrices divergentes. Les Tfh sont en effet riches en molécules de costimulation exprimées à leur surface, alors que les Th privilégient une action via la sécrétion de cytokines [99].

Enfin, les LT CD4⁺ naïfs peuvent également se transformer en LT régulateurs (Treg). Les Treg jouent un rôle majeur dans la régulation des réponses immunes et dans l'induction de la tolérance [31]. Ces Treg sont celles dites « naturelles » qui se développent à partir du thymus des individus et qui expriment le marqueur de surface CD25 et la facteur de transcription FoxP3. Les Treg naturelles agissent de préférence, par la sécrétion de cytokines (IL-10 et TGF- β), par contact cellulaire (*e. g.* avec les CD via CTLA4), par activités lytiques (*e. g.* granzymes) ou par consommation des cytokines du milieu environnant [355]. Il existe une seconde classe de Treg, les « inductibles », qui se développent sous l'influence de LT effecteurs en conditions pathologiques. On trouve dans cette catégorie les lymphocytes T régulateurs 1 (Tr1) et les lymphocytes T helper 3 (Th3), qui n'expriment pas FoxP3. Ces cellules médient principalement leur effet par la sécrétion de cytokines, respectivement, IL-10 et TGF- β [30].

b. Développement des lymphocytes T CD8+

L'initiation de la réponse cellulaire par les CD4⁺ permet le développement d'une réponse cellulaire cytotoxique. Cette dernière se développe par l'intermédiaire des LT CD4⁺ Th1 qui vont activer des lymphocytes T spécifiques de l'antigène présenté et qui expriment le

marqueur CD8 (LT CD8+). L'expression du CD8 est stimulée par la présentation, directe ou croisée, d'antigènes sur des molécules du CMH de classe I (voir paragraphe I) A.4). Après activation, ces LT CD8+ connaissent une phase d'expansion clonale et colonisent les tissus périphériques où ils développent des activités cytotoxiques à l'égard du pathogène, on les nomme CTL (cytotoxic T lymphocytes). Cette phase dure environ 7 à 10 jours puis une phase de contraction a lieu où les CTL meurent par apoptose, mécanisme de mort cellulaire programmée et orchestrée par des caspases [299]. Enfin, une minorité (5% à 10%) des CTL se transforme en cellules mémoires [376]. Il semblerait que le devenir des CTL, effecteurs ou mémoires, soit défini par un programme interne initié dès les premiers instants suivant l'infection. Les cellules mémoires ont une longue durée de vie, se divisent peu fréquemment, restent spécifiques sans nouvelle exposition à l'antigène et expriment les marqueurs CCR7, CD62L et IL-7R α . Leur survie est assurée par de fréquentes stimulations par les cytokines IL-15 et IL-7 [158].

Dans les tissus périphériques, les CTL détectent les cellules infectées qui exposent à leur surface un antigène du pathogène associé au CMH I et, en réponse, sécrètent IFN γ et TNF α aux activités antivirales mais également de la perforine, des granzymes A/B et de la granulysine aux fonctions lytiques (activité de dégranulation, voir paragraphe I) A.3). Les CTL possèdent également un stock intracellulaire de ligand Fas (FasL) qu'ils sécrètent après activation. La liaison de FasL sur son récepteur Fas (CD95) induit aussi l'apoptose des cellules infectées [137].

c. Développement de la réponse humorale

Le développement d'une réponse humorale peut se faire de deux manières distinctes en utilisant, ou non, l'aide des lymphocytes T auxiliaires (réponses T-dépendantes ou indépendantes). L'engagement vers l'une ou l'autre des réponses se fait en fonction de l'antigène rencontré.

Réponses T dépendantes. L'initiation de la réponse B se fait après l'engagement d'un antigène sur le BCR au niveau de la zone corticale de l'organe lymphoïde (Figure 4A et 4B). Trois voies existent pour engager l'antigène sur le récepteur [26]. Les cCD migratoires et résidentes présentent l'antigène aux LB via présentation sur les CMH II. Les antigènes solubles de petites tailles moléculaires, arrivés par les vaisseaux afférents, peuvent être directement reconnus par le BCR en diffusant vers la zone corticale. Enfin, les macrophages, présents dans le ganglion à la jonction entre la zone corticale et le sinus sous capsulaire, peuvent transférer l'antigène aux LB. Ils captent pour cela les antigènes de haut poids moléculaires qui arrivent dans le sinus sous capsulaire via les vaisseaux afférents et qui sont incapable de diffuser librement vers la zone riche en LB (Figure 4B). Les mécanismes gouvernant le devenir des LB après leur rencontre avec l'antigène se divisent en deux réactions distinctes : la réaction extra folliculaire et la réaction folliculaire.

Dans la réaction extra folliculaire, les LT CD4⁺ Tfh et les LB qui ont engagé un antigène sur leur BCR se rencontrent à l'interface des zones corticales et paracorticales. Les LB se différencient alors rapidement en cellules productrices d'anticorps à courte durée de vie spécifiques de l'antigène (IgM, IgG et IgA), et sont responsables des réponses humorales précoces de faible affinité [267].

La réaction folliculaire se développe dans des structures spécialisées appelées les follicules et qui existent constitutivement dans la zone corticale. Les follicules sont constitués d'agrégats de LB et de cellules dendritiques folliculaires (VCAM⁺ICAM⁺Fc⁺, origine imprécise) dont le développement est dépendant de la présence des LB. Les LB qui ont rencontré un antigène sont activés par leur contact avec les LT CD4⁺ Tfh ayant été guidé dans le follicule par l'intermédiaire de leur récepteur CXCR5 (lie CXCL13) [99]. Les LB subissent alors un programme de différenciation qui donne naissance aux centres germinaux localisés au sein du follicule. Ici, les LB prolifèrent rapidement en plasmocytes sécréteurs d'anticorps à longue durée de vie et en LB mémoires. Les centres germinaux sont donc les lieux de l'affinage de la maturation des anticorps (*i. e.* sécrétion d'anticorps à haute affinité par un processus d'hyper mutations somatiques) et de la formation des LB mémoires [26].

Les principales caractéristiques des cellules mémoires résident dans leur capacité à produire rapidement des anticorps à haute affinité et en grande quantité à la prochaine rencontre avec l'antigène.

Le développement des LB est favorisé par les cytokines produites par les Th2 qui stimulent la prolifération des LB, aident à la commutation des Ig (class switching) et augmente l'expression des CMH II. De plus, les cellules Th1 et Th2 sont indispensables pour induire la production d'IgG aux sous-types variés, et notamment les Th1 producteurs d'IFN γ permettent la sécrétion d'IgG2a, alors que les Th2 producteurs d'IL-4 favorisent la sécrétion d'IgG1.

Réponses T indépendantes. Ces réponses se développent lorsque l'antigène présent sur le site d'infection est un polysaccharide (PS) de la surface des bactéries (*e. g. Salmonella typhi, Haemophilus influenzae*) ou une protéine polymérique. L'antigène rejoint alors le ganglion drainant où il se lie directement aux LB (agrégation sur les BCR) et les active, sans l'aide de LT auxiliaires. On parle d'antigènes thymo-indépendants [308]. Cette liaison entraîne le développement d'une réponse extrafolliculaire, et les LB se transforment en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. La caractéristique majeure de ces anticorps est leur affinité faible et ils sont produits en quantité modérée. De plus, la réponse est marquée par une réponse mémoire faible, voire absente. Ceci oblige l'organisme à combattre chaque infection par ces antigènes comme une primo-infection. Il est important de souligner que les PS n'activent directement que les LB matures. Ainsi, chez les enfants de moins de 5 ans qui possèdent majoritairement des LB immatures, les infections bactériennes contenant des PS sont problématiques car ils ne peuvent combattre l'infection (*e. g. otite ou pneumonie à Streptococcus pneumoniae, méningite à Neisseria meningitidis*).

d. Protection physiologique de la réponse humorale

L'action des anticorps oriente l'élimination du pathogène via les cellules phagocytaires selon deux voies :

- les anticorps ont une action neutralisante / opsonisante qui empêche les actions de contact (e. g. fixation sur la cellule cible ou action de la toxine) et facilite l'élimination par phagocytose,

- les anticorps stimulent les voies du complément [175]. Ce système enzymatique activable en cascade favorise la phagocytose et peut lyser les cellules en formant des pores.

D'une manière générale, on peut dire que les réponses à médiation cellulaire, qui utilisent les LT Th1 et participent au développement des CTL, fournissent à l'hôte un mécanisme de défense contre les pathogènes intra-cellulaires. On parle de réponses aux profils Th1 ou cellulaires. De son côté, la réponse à médiation humorale, aux activités relayées par les anticorps et supportées par les LT Th2 et Tfh, dote l'individu d'un moyen de défense contre les pathogènes extra-cellulaires. On parle alors de réponses aux profils Th2 ou humorales.

II) La vaccination

A. Généralités

1. Objectifs de la vaccination

Le terme de vaccination désigne le procédé par lequel la totalité, ou parties, d'une substance pathogène sont introduites dans un organisme afin de stimuler son système immunitaire et lui conférer une immunité protectrice contre une infection future par ce pathogène, sans que cela n'engendre la maladie. Il y a deux objectifs majeurs à la vaccination:

- 1) protéger l'individu contre le développement d'une maladie et de ses symptômes,
- 2) protéger les groupes de population en évitant la propagation de l'infection.

Le second objectif est étroitement lié au succès du premier car une chute de la prévalence (*i. e.* nombre d'individus infectés à un instant donné) limite mécaniquement les transmissions d'un hôte à l'autre et protège donc les groupes de population, c'est le principe de l'immunité de masse [154]. La vaccination est le moyen de prévention le plus économiquement rentable contre de nombreuses maladies infectieuses d'origine virale ou bactérienne [87] (tableau 1). Elle a notamment permis l'éradication complète de la variole qui a été prononcée en 1980 par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé, www.who.int).

L'acte de vacciner n'est devenu routinier qu'au XX^e siècle et reste aujourd'hui l'un des plus grands accomplissements médicaux de l'homme. Mais la vaccination est responsable d'un « oubli collectif » de la menace que représentent les maladies infectieuses et un nombre grandissant de personnes considèrent l'immunité collective comme suffisante pour les protéger [261]. Toutefois, il ne faut pas oublier que l'immunité de masse n'est possible que si un seuil critique du nombre de vaccinés est atteint [324]. De plus, il existe une méfiance vis à vis de la vaccination, de la part notamment des nouvelles générations n'ayant pas ou peu connu les désastres causés par certaines infections [14]. Les maladies infectieuses restent cependant responsables d'un décès sur quatre dans le monde

Tableau 1 : Liste des pathologies d'origine infectieuse pour lesquelles la vaccination est recommandée par l'OMS.

(adaptée des recommandations émises par l'OMS, mise à jour du 21 avril 2009)

Catégorie du vaccin	Vivant atténué	Inactivé	Conjugué	Sous unitaire
Pathologie	Tuberculose* Fièvre jaune Rougeole* Oreillons Rubéole Fièvre typhoïde Infections à rotavirus	Cholera Coqueluche* Grippe Rage Encéphalite japonaise Hépatite A Poliomyélite	Infections à pneumocoques* Infections à méningocoques Infections à <i>Haemophilus influenzae b</i> *	Hépatite B* Infections au virus du papillome* Diphtérie (toxoiide)* Tétanos (toxoiide)*

* : la vaccination est recommandée pour tous (indépendamment de la région et des groupes de population) (OMS, 2009)

toxoiide : le vaccin est composé de la toxine inactivée du pathogène

expliquant l'importance de poursuivre l'éducation des populations et la découverte de nouveaux vaccins [223].

2. Premières expériences historiques

Bien que faiblement documentées, les premières tentatives vaccinales figurent dans des écrits venus de la Chine du X^e siècle [124]. On retrouve ensuite diverses initiatives d'inoculation similaires jusqu'au XVIII^e siècle [279] : le terme variolisation, dérivé de la variole, était alors employé pour définir ces pratiques. En effet, la variole causée par le virus de la variole, était l'une des maladies infectieuses les plus dévastatrices et le développement du premier vaccin contre cette maladie a résulté d'un ensemble d'expérimentations sur plusieurs siècles. C'est Edward JENNER en 1798 qui réalisa le premier essai concluant à grande échelle de traitement contre la variole. Il fit la première démonstration scientifique de la possibilité d'éduquer le système immunitaire à se défendre contre une infection virale avant d'y être exposé naturellement [124].

B. Les différentes classes de vaccins

La grande majorité des vaccins utilisés de nos jours ont été développés de manière empirique. On sait aujourd'hui que la plupart induisent au moins une réponse humorale et que les pathogènes ciblés sont souvent contrôlables par des anticorps neutralisants [274]. On peut les regrouper en six grandes catégories en fonction de leur composition et un aperçu de l'historique du développement des vaccins est présenté dans la figure 6. Nous avons volontairement référencé principalement dans ce chapitre des vaccins de type préventif utilisés dans le cadre de vaccination contre les maladies infectieuses humaines.

1. Les vaccins vivants atténués

On retrouve dans cette catégorie les préparations vaccinales contenant l'organisme pathogène complet ayant perdu sa virulence contre l'homme. L'atténuation du pathogène est

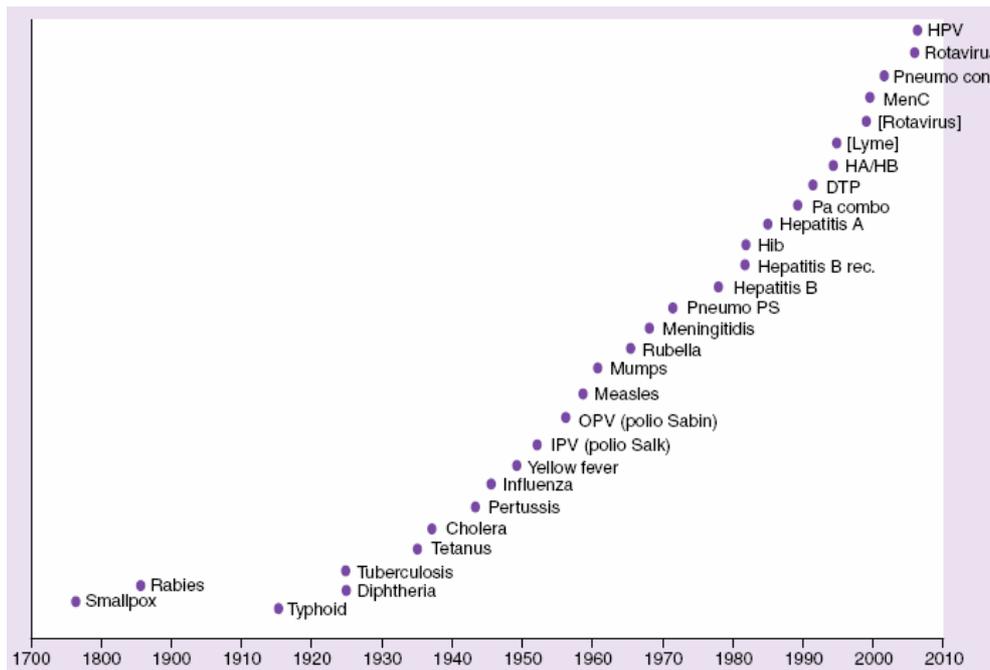


Figure 6 : Date de disponibilité commerciale d'un vaccin pour le pathogène indiqué (d'après [109]). Les crochets indiquent à un vaccin qui n'est plus disponible. DTP : diphtérie, tétanos, coqueluche ; HA/HB : hépatites A et B ; rec : recombinant ; Hib : *Haemophilus influenzae* de type B ; HPV : virus du papillome humain ; IPV : vaccin inactivé de la polyomyélite ; MenC : *Neisseria meningitidis* type C ; OPV : vaccin oral de la polyomyélite ; Pa combo : combinaisons acellulaires du vaccin de la coqueluche ; Pneumo conj : vaccin conjugué des infections à pneumocoques ; Pneumo PS : vaccin polysaccharide des infections à pneumocoques.

obtenue en utilisant soit 1/ une souche animale (vaccin de JENNER [124]), 2/ une souche ayant été passée de nombreuses fois en culture *in vitro* (vaccin fièvre jaune [335]), 3/ une souche thermosensible qui ne se réplique que peu ou pas aux conditions de vie de l'hôte à 37°C (vaccin de la grippe [205]), 4/ une souche génétiquement modifiée (vaccin rotavirus constitué de réassortants génétiques [115]) ou 5/ une souche auxotrophe (ayant perdu la capacité de biosynthèse d'un métabolite essentiel), phénotype qui réduit les capacités de répllication intracellulaire chez le vacciné (vaccin contre les infections à *Shigella* [180]) [261].

L'immunogénicité forte des vaccins vivants atténués s'explique en partie par la présence de nombreux motifs de types PAMP reconnus par les macrophages et les cellules dendritiques mimant l'infection naturelle [268]. Elle est accentuée par la dissémination du pathogène chez l'hôte par effet réplicatif, activant les cellules de l'immunité innée en

plusieurs endroits dans l'organisme [159]. Le succès reconnu de ces vaccins explique leur présence en nombre sur le marché et les nouvelles études en cours de développement. On peut citer comme exemple le développement d'une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* pour un vaccin contre la tuberculose [51] et d'une souche mutante de *Francisella tularensis* pour un vaccin contre la tularémie (implication dans le bioterrorisme) [294]. L'un des principaux obstacles au développement des vaccins réplicatifs est le risque de réversion du pathogène vers un état virulent (e. g. troubles paralytiques associés au vaccin oral contre le virus de la poliomyélite [273]) [283].

2. Les vaccins inactivés

On retrouve dans cette catégorie les préparations vaccinales contenant un pathogène complet inactivé. Cette approche est apparue à la fin du XIX^e siècle avec des vaccins dont le pathogène était inactivé par la chaleur, des agents chimiques ou le vieillissement de la souche (e. g. vaccins contre la poliomyélite de Salk [290], vaccins contre l'hépatite A) [260]. Ces vaccins s'avèrent en général plus sûrs que les vaccins atténués, en revanche leur immunogénicité peut aussi être plus faible (e. g. vaccin de la grippe inactivé moins efficace que le vivant atténué thermosensible [32]).

3. Les vaccins conjugués

Ces vaccins sont parmi les premiers à avoir bénéficié de l'accroissement des connaissances scientifiques et techniques qui ont permis de rationaliser l'approche du développement de nouveaux vaccins. Ils sont obtenus en couplant un ou plusieurs polysaccharides spécifiques du pathogène à une protéine porteuse [172] et ont directement profité des connaissances en immunologie. En effet par exemple, les défenses des nourrissons sont trop immatures pour développer des réponses B, T indépendantes, contre les sucres d'enveloppes des bactéries encapsulées [224]. En les couplant à une protéine porteuse telle que la toxine diphtérique, ils développent une réponse spécifique humorale

protectrice T dépendante. Les vaccins conjugués sont utilisés pour vacciner contre l'*Haemophilus influenza* de type b (e. g. Act-HIB®, Sanofi-Pasteur), les infections à pneumocoques (e. g. Synflorix™, GSK) ou à méningocoques (e. g. Meningitec™, Wyeth) [212] [173].

4. Les vaccins vectorisés viraux

On trouve dans cette catégorie les vaccins dont le ou les antigènes recombinants sont apportés par un vecteur viral qui conserve son aptitude à infecter les cellules humaines mais n'est pas pathogène. De nombreux virus servent de plate-forme en recherche et en clinique (tableau 2) pour introduire des antigènes vaccinaux [89] mais actuellement aucun n'est commercialisé. On peut citer comme exemple les vecteurs dérivés des poxvirus (e. g. souche MVA et NYVAC [119], ...), les adénovirus (e. g. sérotypes 5, 35, ... [277]), le virus de la rougeole [200], les alphavirus (e. g. virus de la forêt de Semliki, ...) ou encore le virus de l'herpes [89].

Les vaccins vectorisés viraux miment, dans une certaine mesure, une infection naturelle et sont donc capables de stimuler efficacement le système immunitaire, notamment grâce à la présence de PAMP. De plus, ils peuvent exprimer un ou plusieurs antigènes d'intérêt vaccinal dans le cytoplasme des cellules infectées ce qui leur permet donc d'accéder à la présentation par des molécules du CMH I et à la reconnaissance par les T CD8+. Classiquement, ils sont faciles à produire avec un taux de rendement élevé et sont aisément manipulables pouvant accueillir de larges antigènes vaccinaux hétérologues. De plus, et à titre d'exemple, les adénovirus ont une pathogénicité limitée chez l'homme, et les poxvirus NYVAC et MVA sont non propagatifs sur la plupart des cellules mammifères, augmentant leur profil de sécurité et rendant ces vecteurs attractifs pour un usage vaccinal [277].

Tableau 2 : Liste des vecteurs viraux, non viraux et de leur association en essais cliniques en 2009 (d'après Journal of Gene Medecine, mise à jour mars 2009). Il est important de noter que certains vecteurs indiqués sont utilisés dans des indications autres que la vaccination préventive contre les maladies infectieuses humaines.

Vecteurs	Essais cliniques en 2009		Vecteurs	Essais cliniques en 2009	
	Nombre	%		Nombre	%
Adeno-associated virus	67	4.4	Poxvirus + Vaccinia virus	27	1.8
Adenovirus	370	24.1	Retrovirus	326	21.2
Adenovirus + Retrovirus	3	0.2	RNA transfer	22	1.4
Adenovirus + Vaccinia virus	2	0.1	RNA virus	5	0.3
E. coli	1	0.1	Saccharomyces cerevisiae	5	0.3
Flavivirus	8	0.5	Salmonella typhimurium	2	0.1
Herpes simplex virus	51	3.3	Semliki forest virus	1	0.1
Lactococcus lactis	4	0.3	Sendai virus	2	0.1
Lentivirus	21	1.4	Shigella dysenteriae	1	0.1
Lipofection	109	7.1	Simian virus 40	1	0.1
Listeria monocytogenes	3	0.2	Sleeping Beauty transposon	1	0.1
Measles virus	3	0.2	Streptococcus mutans	1	0.1
Naked/Plasmid DNA	278	18.1	Vaccinia virus	94	6.1
Naked/Plasmid DNA + Adenovirus	2	0.1	Venezuelan equine encephalitis virus replicon	2	0.1
Naked/Plasmid DNA + Vaccinia virus	1	0.1	Vesicular stomatitis virus	2	0.1
Newcastle disease virus	1	0.1	Vibrio cholerae	1	0.1
Poliovirus	1	0.1	Unknown	50	3.3
Poxvirus	64	4.2	Total	1532	

5. Les vaccins génétiques

L'antigène recombinant du pathogène est ici apporté par un vecteur ADN (tableau 2). L'injection se fait par « bombardement » sur la peau ou injection intra-musculaire. Les kératinocytes et les myocytes vont capturer les vecteurs ADN et synthétiser l'antigène d'intérêt permettant le déclenchement de la réponse immunitaire par présentation aux APC. Ces dernières peuvent aussi capter directement les vecteurs ADN. Enfin, la présence de PAMP sur le vecteur ADN contribue à activer l'immunité innée. L'efficacité des vaccins génétiques a été largement montrée dans diverses espèces animales bien que leur immunogénicité reste généralement faible chez l'homme [344]. De nombreuses modifications sont envisagées pour améliorer l'immunogénicité comme l'ajout de séquences et de promoteurs optimisés ou l'emploi de modes de délivrance modifiés (microparticules,

électroporation). A titre d'exemple, les vaccins à ADN sont employés dans la recherche d'un vaccin contre les infections au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [121].

6. Les vaccins sous-unitaires

L'élément vaccinal inclus dans ces vaccins se présente sous des formes diverses, parmi les plus employées on trouve :

- des protéines recombinantes produites par exemple dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (e. g. protéine de surface du virus de l'hépatite B, HBsAg, utilisée dans les vaccins préventifs contre ce virus [263]) ou dans la bactérie *Escherichia coli* (e. g. protéine de surface de *Borrelia burgdorferi*, agent responsable de la maladie de Lyme, utilisée jusqu'en 2002 dans le vaccin LYMERix™ (Smith Kline Beecham) [132]),
- des particules virales faites d'une ou plusieurs protéines recombinantes virales auto-assemblées ne contenant ni matériel génétique ni produit vivant, produites en levure, cellules d'insectes ou de mammifères et appelées VLP (virus-like particles) [285]. Cette technologie est par exemple employée dans les vaccins contre les infections dues au virus du papillome humain (Gardasil®, Merck et Cervarix®, GSK) [80],

Les vaccins, notamment génétiques et sous-unitaires développés de manière rationnelle, permettent de limiter l'introduction de sources exogènes contaminantes et responsables d'effets indésirables en n'introduisant que les antigènes viraux ou bactériens nécessaires à la protection vaccinale. De nombreuses techniques sont employées pour accroître le bénéfice de ces vaccins pour les patients. Par exemple, l'élément vaccinal peut être dirigé préférentiellement vers un compartiment cellulaire pour améliorer l'efficacité de la vaccination. Ainsi, on utilise des techniques d'électroporation pour augmenter la quantité de vecteurs à ADN qui entrent dans les cellules cibles. Au moment de l'injection, un choc électrique crée de multiples ouvertures transitoires dans la membrane des cellules permettant l'accès du vecteur avec une meilleure efficacité (e. g. électroporation d'un vecteur ADN codant pour les protéines NS3-4 du virus de l'hépatite C [6]).

7. Les vaccins basés sur l'utilisation des cellules dendritiques

Le rôle central des CD dans l'induction de réponses immunes les place comme des éléments cellulaires de choix à utiliser, afin d'envisager le développement de nouveaux vaccins. Ainsi, les cellules dendritiques d'un patient, notamment dans les thérapies anti-cancéreuses, peuvent être cultivées *ex vivo* puis chargées avec l'antigène vaccinal avant d'être réinjectées chez son hôte [387]. De nombreuses stratégies permettent de transférer les CD avec soit une protéine d'intérêt vaccinal, soit un ARN ou encore un plasmide ADN codant pour des séquences d'intérêt. Parallèlement, les CD peuvent être stimulées pour être activées (*e. g.* à l'aide de cytokines, de ligands de costimulation). Le grand atout de l'utilisation de cette vaccination est qu'elle permet à la fois de cibler spécifiquement l'élément vaccinal aux cellules clés que sont les CD et d'activer cette population, initiant ainsi une réponse immune spécifique chez le vacciné. La limite de cette stratégie réside sans doute dans les difficultés de sa mise en œuvre lourde et coûteuse.

C. Un aperçu des enjeux en vaccinologie

La majorité des vaccins commerciaux est destinée à être administrée à des individus sains expliquant la raison pour laquelle, au-delà des considérations scientifiques, il faut tenir compte de nouvelles contraintes émanant des attentes de plus en plus grandes de la société et qui représentent un des nouveaux défis pour la vaccinologie moderne. Relayées par les autorités réglementaires, ces dernières se tournent vers des compositions vaccinales caractérisées et minimalement réactogènes entraînant alors une complexification de la mise sur le marché d'un vaccin par, notamment, l'augmentation des données réglementaires à générer et les défis liés à une production qui se doit d'être qualitative et quantitative [45]. Dans cette optique, quatre points fondamentaux sont à respecter lors du développement d'un vaccin : 1/ définir avec précision le processus de fabrication, 2/ garantir le respect du suivi de ce processus, 3/ valider le produit fini et faire la démonstration de son efficacité et de son innocuité, et 4/ obtenir l'aval des autorités pour la distribution du vaccin. Chacune de ces

étapes nécessite une expertise particulière et présente des contraintes spécifiques qui vont, à titre d'exemple, de la mise en place d'un processus de fabrication reproductible pour réaliser une préparation vaccinale stable dans le temps, à la sécurisation du transport des produits finis afin d'éviter des variations de températures et donc leur altération. Au niveau réglementaire, un tissu dense d'autorités (e. g. agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, comité de protection des personnes, haut conseil des biotechnologies) réglemente les étapes du développement vaccinal et ce de manière parfois non homogène à l'échelle internationale créant d'importantes barrières au développement. Toutefois, ces autorités restent aussi de précieuses alliées, en tant que consultantes, indispensables à la mise sur le marché.

Ainsi, il apparaît que le développement industriel d'un vaccin est un processus de plus en plus complexe, de plus en plus coûteux nécessitant de nombreuses compétences, techniques et transversales, pour continuer à développer et distribuer des vaccins performants, sécuritaires et accessibles au plus grand nombre. Le temps de développement, de l'ordre de 15 à 20 années, nécessite aussi une organisation des plus efficaces pour ne pas augmenter ce délai. Les nouveaux vaccins, et notamment les vaccins sous unitaires, apparaissent appropriés pour répondre à ces contraintes mais ils sont généralement limités par leur manque d'immunogénicité [343]. La prise en compte de cette limitation amène à explorer de nouvelles pistes et actuellement de nombreux espoirs reposent sur la découverte d'adjuvants de vaccination efficaces (Paragraphe D.).

A l'origine, la vaccination a été pensée pour prévenir la maladie. De nos jours, la notion de vaccination thérapeutique est également devenue incontournable. Elle correspond à l'emploi d'une préparation vaccinale qui doit contrôler et / ou éliminer une infection installée chez le patient. Les infections virales [149] et bactériennes, les affections cancéreuses et les maladies auto-immunes et neuro-dégénératives [303], sont largement ciblées par la vaccination thérapeutique. Le bénéfice de ce type de vaccination est à apprécier en fonction d'un rapport bénéfice / risque propre à chaque patient et en fonction de la pathologie. Dans

un souci de clarté, nous avons décidé de ne parler ici de ce type de vaccination qui représente un secteur de recherche dynamique à part entière.

D. Adjuvantation

1. Définition et besoins actuels

Le terme adjuvant est issu du latin « *adjuvare* » signifiant « aider » et il désigne en vaccination l'élément qui augmente l'immunogénicité de l'antigène auquel il est combiné [295]. En vaccinologie humaine, la première démonstration de l'existence d'un « pouvoir adjuvant » a été faite en 1926 [116]. Au cours de travaux sur le potentiel immunogénique de précipités de toxines-antitoxines diphtériques, il a été observé que la précipitation réalisée avec du potassium d'aluminium augmentait considérablement la réponse immunitaire spécifique induite chez le cochon d'Inde. Depuis plus de 80 ans, les dérivés d'aluminium entrent dans la composition de la majorité des vaccins et restent les seuls adjuvants autorisés chez l'homme aux Etats-Unis (Tableau 3 et [100]).

Tableau 3 : Principales maladies pour lesquelles un vaccin contenant des dérivés d'aluminium existe et est commercialisé aux Etats-Unis. La composition chimique du dérivé aluminé contenu dans le vaccin est indiquée. (Adapté de [29] et [359])

	Vaccination contre	Forme chimique de l'aluminium
Vaccination infantile	Diphtérie et Tétanos (DT)	<i>sulfate d'aluminium et de potassium ou phosphate d'aluminium</i>
	DT et coqueluche (DTP)	<i>sulfate d'aluminium et de potassium ou phosphate d'aluminium</i>
	DT et coqueluche (DTaP)	<i>sulfate d'aluminium et de potassium ou hydroxyde d'aluminium ou phosphate d'aluminium</i>
	Infections à <i>Haemophilus influenzae</i> de type B (Hib)	<i>hydroxyde d'aluminium</i>
	Infections à Pneumocoques	<i>phosphate d'aluminium</i>
	Hépatite B	<i>hydroxyde d'aluminium</i>
	Hépatite A	<i>hydroxyde d'aluminium</i>
	Infections par le virus du papillome humain	<i>hydroxyde et phosphate d'aluminium</i>
	Maladie du charbon	<i>hydroxyde d'aluminium</i>
	Rage	<i>phosphate d'aluminium</i>

Le développement d'adjuvants de vaccination est aujourd'hui dynamisé par plusieurs facteurs [251]. Tout d'abord, l'emploi d'adjuvants est une condition *sine qua non* au développement des vaccins sous unitaires limités par leur faible immunogénicité [275]. De plus, l'emploi d'adjuvants est favorisé pour réduire le nombre de rappels et les doses d'antigènes sans perte d'efficacité [234]. Egalement, il est urgent de découvrir de nouveaux adjuvants car les dérivés d'aluminium n'induisent notamment pas de réponses T cytotoxiques nécessaires à la protection contre de nombreux pathogènes comme ceux responsables du SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise, virus de l'immunodéficience humaine), du paludisme (*Plasmodium falciparum*) et de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) (OMS, objectifs du millénaire pour le développement, <http://www.who.int/mdg/goals/en/index.html>) [40;139;341]. Enfin, les sujets immunodéprimés qui développent des réponses non optimales à la vaccination pourraient bénéficier de nouveaux adjuvants [16;275].

De nombreuses descriptions de l'adjuvant « idéal » ont été proposées [5;162;311]. Il doit être stable, avoir une longue durée de vie (≥ 2 ans), être biodégradable, être fabricable à moindre coût et de manière reproductible, être immunologiquement inerte (aspect sécuritaire) et orienter les réponses immunes vers le profil choisi. Le très faible nombre d'adjuvants commercialisés indique que ces objectifs ne sont pas triviaux à atteindre. Le développement des adjuvants qui a débuté de manière empirique se dirige maintenant vers une recherche rationnelle pour répondre à ces besoins.

2. Les différentes classes d'adjuvants

Il n'existe pas de classification officielle pour les adjuvants de vaccination mais on peut distinguer diverses méthodes de regroupement [258], dont un regroupement en fonction de leur origine (tableau 4), en fonction de la voie d'administration, ou en fonction de leur mode d'action « véhicules » ou immunostimulants [312]. Les véhicules favorisent la prise en charge de l'antigène par les cellules dendritiques au site d'injection en augmentant la persistance sur site et en aidant à la formation de complexes particuliers favorables à la

phagocytose [73]. Les immunostimulants stimulent les cellules de l'hôte par interaction avec différents récepteurs, TLR et non TLR [183]. Il en résulte une modulation des profils phénotypiques et fonctionnels des cellules dendritiques, macrophages et / ou lymphocytes T et B. Ce regroupement en fonction du mode d'action apparaît arbitraire car de nombreux adjuvants possèdent les deux propriétés à des degrés variés [129].

Tableau 4 : Présentation des principaux adjuvants en fonction de leur origine (adaptée et modifiée de [354]).

ADJUVANT	ORIGINE ou COMPOSITION CHIMIQUE	EFFETS SUR LA REPOSE IMMUNE
Alun	<i>minérale</i>	stimulation de la réponse Th2
Adjuvant incomplet de Freund	<i>émulsions E/H</i>	importante production d'anticorps, fortement inflammatoire
Adjuvant complet de Freund	<i>émulsions E/H + mycobactéries inactivées</i>	réponse mixte humorale et cellulaire
MF59	<i>émulsion H/E à base de squalène</i>	stimulation de la réponse Th2
Monophosphoryl lipide A	<i>composant bactérien dérivé du lipopolysaccharide</i>	réponse mixte humorale et cellulaire
Muramyl dipeptide et dérivés	<i>composants de la paroi des mycobactéries</i>	stimulation préférentielle de la réponse Th2
Oligonucléotides CpG	<i>motifs moléculaires des procaryotes</i>	induction de réponse Th1
Cytokines	<i>protéines généralement utilisées sous forme recombinante</i>	action directe et spécifique, dose- et espèce-dépendante
Saponines et Immuno Stimulating COMplexes	<i>agents amphipathiques d'origine végétale, permettant la formation de</i>	production d'anticorps et stimulation des LT cytotoxiques
Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes	<i>dérivés viraux et lipides</i>	induction d'une réponse mixte humorale et cellulaire
Toxines bactériennes	<i>sous forme entière, inactivée, sous-unitaire ou mutée</i>	favorise les réponses Th2, production d'IgA sécrétoires

Quelle soit la méthode de présentation choisie, il est impossible de dresser une liste exhaustive de l'ensemble des composés connus ayant des propriétés adjuvantes [162]. Il a donc d'abord été choisi de présenter dans ce mémoire les mécanismes d'action proposés des adjuvants de vaccination actuellement commercialisés pour l'homme. Ensuite, pour illustrer le dynamisme de la recherche sur les adjuvants [251], une revue non exhaustive des plus prometteurs en développement clinique et pré-clinique sera également proposée. L'accent est mis sur les adjuvants inclus dans des vaccins contre les maladies infectieuses humaines.

E. Les adjuvants présents sur le marché

1. Adjuvants à base d'aluminium

Ils sont largement employés dans les vaccins mais paradoxalement le mécanisme d'action de ces composés est peu connu [197]. Le terme « alun » est utilisé en général pour définir l'adjuvant à base d'aluminium intégré à un vaccin. D'un point de vue chimique, l'alun est une forme soluble de sulfate d'aluminium et de potassium ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$). De leur côté, les vaccins commercialisés contiennent majoritairement de l'hydroxyde d'aluminium ($\text{Al}(\text{OH})_3$, communément appelé Alhydrogel) et / ou du phosphate d'aluminium (AlPO_4 , communément appelé Adju-Phos). Enfin, en recherche pré-clinique, l'Imject® Alum (Pierce, Rockford, IL) est un mélange d'hydroxyde d'aluminium, d'hydroxyde de magnésium ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) et de stabilisateurs inactivés [207]. Or la nature de ces différents produits à base d'aluminium va influencer la diffusion de l'antigène et par conséquent la réponse immunitaire [135] et il est donc difficile de comparer strictement les diverses études. Nous emploierons le terme alun dans la suite de ce mémoire pour désigner toutes les substances adjuvantes contenant de l'aluminium.

L'alun a longtemps été considéré comme un adjuvant à « effet dépôt » permettant la rétention sur le site d'injection de l'antigène adsorbé, ou non, sur lui [33;284]. Cette rétention augmenterait la durée de contact de l'antigène avec les cellules dendritiques résidentes et améliorerait ainsi les réponses induites. Cependant on sait aujourd'hui que l'alun est un adjuvant à la fois véhicule et immunostimulant et qu'il présente deux activités majeures : 1/ l'attraction et l'activation des cellules de l'immunité innée au site d'injection et 2/ l'orientation vers un profil Th2 de la réponse immunitaire.

En effet, l'injection intra péritonéale (i. p.) d'alun chez la souris induit la sécrétion des chimiokines inflammatoires CCL2 (MCP-1), CXCL11 (éotaxine) et CXCL1 (équivalent murin de l'IL-8) par une population cellulaire non définie. Cette production se traduit par le recrutement rapide de monocytes inflammatoires ($\text{CD11b}^+\text{Ly6C}^+$, précurseurs directs des CD [113]), de CD conventionnelles (CD11c^+), de CD plasmacytoïdes ($\text{CD11c}^{\text{int}}$), d'éosinophiles et de neutrophiles sur le site d'injection [177]. Une autre étude confirme ces résultats en

montrant que dans les cellules musculaires murines, l'expression du gène codant pour CCL2 est augmentée en réponse à l'alun. Dans cette étude, l'alun induit aussi le recrutement des monocytes inflammatoires CD11b⁺ dans les 4 jours [225]. Le mécanisme d'activation des CD reste flou mais *in vitro* l'alun s'est montré capable d'activer directement ces cellules en augmentant leur expression de CD80 et CD86 et leur sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 selon un mécanisme caspase-1 dépendant [315]. Cette activité sur les CD n'est pas TLR dépendante car l'alun n'active pas directement ces récepteurs [111]. En revanche, l'alun active un récepteur NLR cytoplasmique, Nalp3 (NOD-like receptor, pyrin domain containing 3) qui s'associe ensuite avec l'ASC (apoptosis-associated speck-like protein) et la pro-caspase1 pour former un complexe appelé l'inflammasome NLRP3 [246]. L'activation de l'inflammasome stimule les activités d'une cystéine protéase caspase-1 qui transforme pro-IL-1 β en IL-1 β active dont la conséquence immédiate est le recrutement de monocytes immatures et de CD [176]. L'alun est également capable d'induire la nécrose d'une cible cellulaire encore non identifiée conduisant à la production d'acide urique. Ce composé est un activateur de l'inflammasome NLRP3 [177]. L'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'alun semble indispensable pour qu'il y ait une activité adjuvante et recrutement de cellules immunitaires, même si cet effet est contesté par d'autres travaux [106]. Toujours au niveau local, l'alun augmente les capacités d'internalisation d'antigènes (macropinocytose et phagocytose [221]) des monocytes inflammatoires CD11b⁺ Ly6C⁺, déclenchant leur migration vers les organes lymphoïdes et leur transformation en CD CD86⁺ CD40⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ présentatrices d'antigènes [177]. L'alun induit donc un état inflammatoire permettant le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité innée ainsi que la préparation des CD à initier les réponses adaptatives.

Concernant l'activité d'orientation, l'alun influence la réponse immunitaire induite vers un profil Th2. Dans une étude *in vitro*, les CD de la moelle osseuse de souris incubées en présence d'alun induisent l'activation de LT CD4⁺ naïves en LT CD4⁺ Th2 sécrétrices d'IL-4 et d'IL-5. Dans ces cultures, la neutralisation de l'IL-1 β , de l'IL-18 et de la cystéine protéase caspase-1 abolit les sécrétions d'IL-4 et d'IL-5 et restaure un profil Th1, indiquant également

que l'alun est un adjuvant pour induire des réponses Th2 [315]. Enfin, *in vivo* après injection i. p. d'alun chez la souris, une population éosinophile sécrétrice d'IL-4 est retrouvée dans la rate, responsable du priming des lymphocytes B et de la production d'IgM donnant une orientation Th2 à la réponse [366] (figure 7).

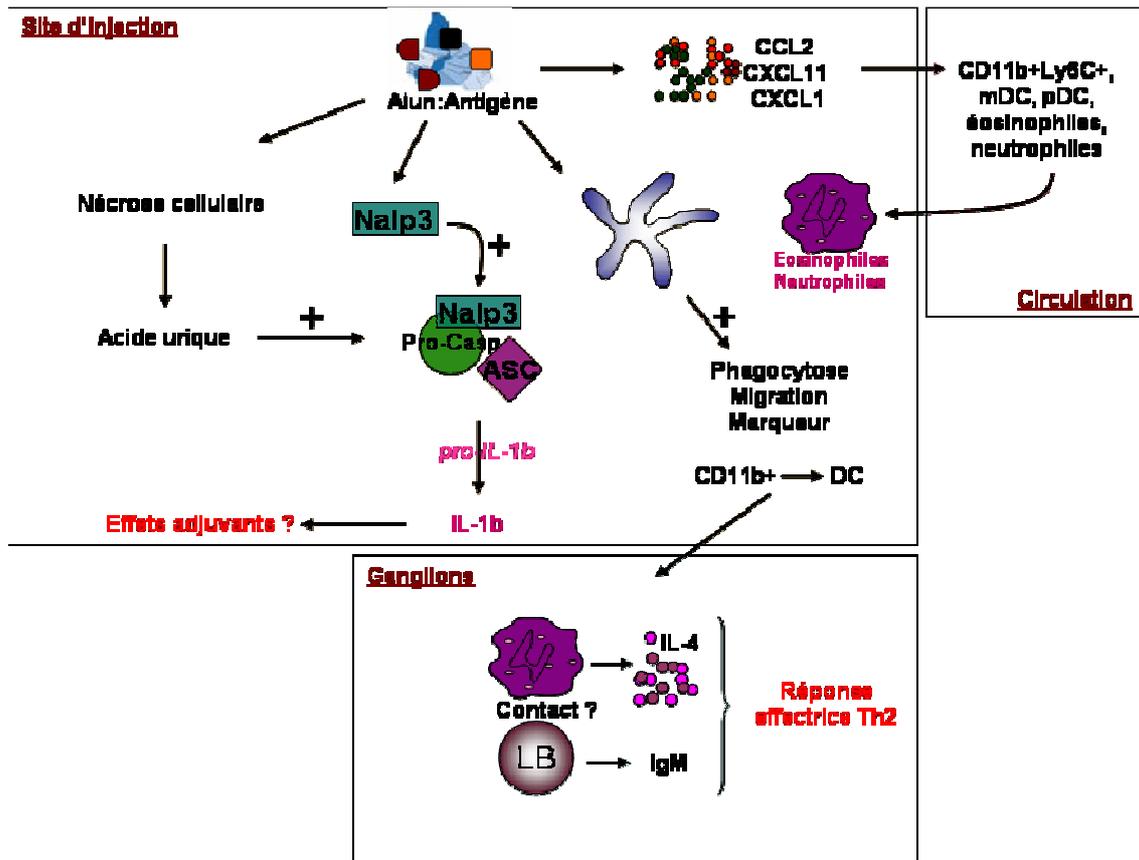


Figure 7 : Mécanisme d'action proposé de l'alun (adapté de [82;185]). Après injection, l'alun active l'inflammasome Nalp3 responsable de la sécrétion d'IL-1 β . L'activité nécrosante de l'alun stimule les sécrétions d'acide urique activant également Nalp3. L'alun induit la sécrétion de chimiokines qui attirent de nouvelles cellules sur site. Il favorise également la maturation de monocytes en CD et leur migration vers les ganglions lymphatiques. Dans le ganglion, les CD activent une population éosinophile sécrétrice d'IL-4 qui l'implique dans la réponse effectrice Th2.

En ce qui concerne sa sûreté, l'alun a été administré à des centaines de millions de personnes et c'est un adjuvant peu toxique bien qu'il soit occasionnellement associé à l'induction d'érythèmes, de granulomes inflammatoires, de nodules sous-cutanés et de

réactions allergiques IgE dépendantes [128]. Principalement, son utilisation est donc limitée par son incapacité à induire des réponses Th1 avec notamment sécrétions d'IL-12, d'IFN γ et induction des lymphocytes T cytotoxiques nécessaires pour lutter contre de nombreux pathogènes intracellulaires [44]. Il se heurte aussi à des problèmes de production car il est sensible à la congélation (conduit à une coagulation irréversible et à une perte d'activité), doit être préférentiellement conservé à +4° C et est difficilement lyophilisable [141]. Il n'est pas non plus biodégradable car il peut être détecté jusqu'à un an après injection. Toutefois, l'alun est un adjuvant efficace dans l'induction des réponses humorales et il est retrouvé dans des vaccins dirigés contre des pathogènes pour lesquels la protection est conférée par les anticorps neutralisants (chapitre II, tableau 1). Son utilisation à grande échelle le place comme l'adjuvant de référence pour la mise au point de nouvelles formulations plus efficaces [207].

2. MF59

Le MF59 est une émulsion huile dans eau composée de 4,3% d'huile de squalène, 1% de surfactant (Polysorbate 80 and Sorbitan triolate, 0,5% chacun), d'un tampon de citrate de sodium 10mM et d'eau [238]. Le MF59 possède un mécanisme d'action similaire à l'alun (figure 8) à l'exception près qu'il ne favorise pas la rétention de l'antigène sur site. En effet, il a été montré que la distribution d'un antigène chez la souris, du site d'injection vers les tissus, ne varie pas qu'il soit adjuvanté par le MF59 ou non [90]. *In vitro*, le MF59 stimule la production par les monocytes, macrophages et granulocytes des chimiokines CXCL8 (IL-8), CCL2, 3 et 4 (respectivement MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β). Cette sécrétion pourrait donc attirer monocytes, CD immatures, NK et LT sur le site d'injection. Cela a été clairement montré chez la souris pour les monocytes CD11b⁺ qui sont recrutés en 4 jours [225]. Le MF59 permet la différenciation en culture de monocytes en CD matures caractérisées par un phénotype CD86⁺ MHCII⁺ CD14⁻ et augmente leur capacité d'internalisation. De plus dans cette étude, cet adjuvant stimule l'expression de CCR7 responsable de la migration des CD des tissus périphériques vers les ganglions [304]. Dans des modèles murins de vaccination

contre la grippe, le MF59 déclenche préférentiellement la sécrétion des cytokines IL-5 et IL-6 et d'anticorps anti-hémagglutinine de type IgG1, marquant une nette orientation vers un profil Th2 et améliore les réponses humorales induites chez des souris âgées [142;347] (Figure 8).

Chez l'homme, le MF59 a été commercialisé en 1997 dans un vaccin contre la grippe pour les personnes âgées (Fluad™, Chiron-Novartis). Il reste principalement efficace pour

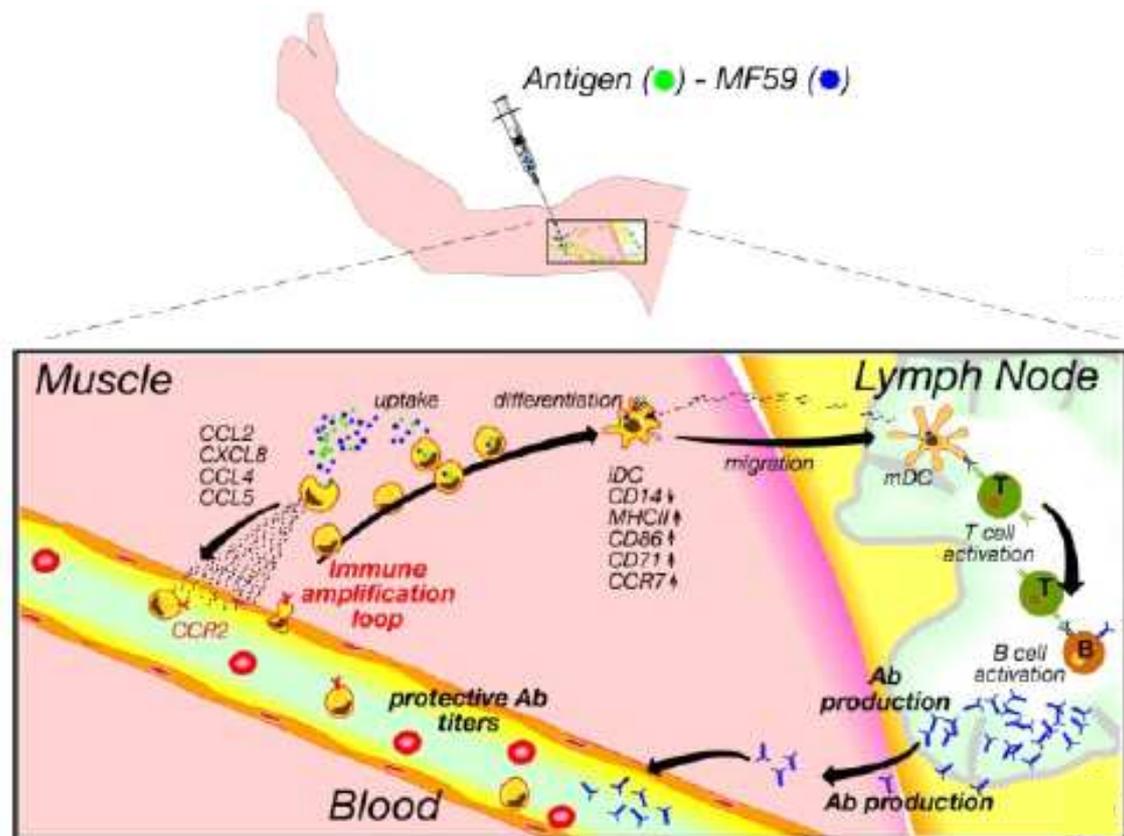


Figure 8 : Mécanisme d'action proposé du MF59 (d'après [304]). Le MF59 stimule la sécrétion des chimiokines CXCL8, CCL2 et 4 par les macrophages, monocytes et granulocytes ce qui augmente le recrutement d'autres cellules de l'immunité sur le site. Cette boucle stimulatrice active la différenciation des monocytes en CD (CD86⁺ MHCII⁺ CCR7⁺) qui migrent vers le ganglion et sont capables d'instruire les lymphocytes T et B en vue de la sécrétion d'anticorps spécifiques de l'antigène.

induire des anticorps neutralisants [262]. Le MF59 inclus dans Fluad™ a été généralement bien toléré par plus de 27 millions de personnes dans les 20 pays où il est enregistré [300].

3. Monophosphoryl lipide A (MPLA) et RC529

Le MPLA est une fraction bactérienne issue de la détoxification du lipopolysaccharide (LPS) contenu dans la paroi de la souche Re595 de *Salmonella minnesota* [270] [96]. Ce composé a été remarqué car il conserve les propriétés adjuvantes du LPS mais sa toxicité est équivalente à seulement 0.1% de ce dernier [52;271]. A l'image du LPS, le MPLA interagit avec les récepteurs TLR4 [143;334] puis active la voie TRIF dépendante alors que le LPS active en plus la voie MyD88 dépendante après liaison sur ce récepteur. Cette différence pourrait expliquer la faible toxicité du MPLA [209]. Une étude *in vitro* indique que le MLPA, contrairement au LPS, active la sécrétion par les monocytes humains d'ions superoxydes (O_2^-) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette production bloquerait les sécrétions de TNF α , responsables de la toxicité du LPS, en agissant sur le facteur de transcription NF κ B [288]. *In vitro*, le MPLA augmente les activités présentatrices des lymphocytes B et des macrophages mesurées par leur capacité à induire la prolifération des lymphocytes T [81]. Il augmente l'expression des marqueurs CD80, CD86, MHC II à la surface des CD dérivées de monocytes humains *in vitro* et celle de CD40L à la surface des LT [151]. Chez la souris, le MPLA dirige les réponses vers un profil mixte Th1/Th2 caractérisé par la sécrétion d'IgG1 et d'IgG2a et par une production des cytokines IFN γ , IL-4 et IL-5. De plus, cet adjuvant est capable d'initier la migration des CD vers les zones riches en cellules T et d'augmenter leur expression de CD86, préparant ainsi les cellules à l'interaction avec les LT naïfs [81].

La composition du MPLA est hétérogène et comprend plusieurs variants lipidiques. La recherche d'espèces moléculaires dérivées du groupement majeur du MPLA, l'hexa-acyle, a conduit à la découverte du composé RC529 (ou Rib.529) dont les activités sont très similaires au MPLA. De plus, il est moins pyrogène chez le lapin et est synthétisable, ce qui le place comme un candidat adjuvant à fort potentiel [96].

Le MPLA n'est pas commercialisé en tant que tel, il est adsorbé sur alun (aluminium hydroxyde ou phosphate) et forme le système d'adjuvantation de GSK, AS04. Cette formulation est incluse dans un vaccin contre l'hépatite B (FENDrix™, GSK, Rixensart,

Belgique) et permet d'atteindre un titre plus élevé d'anticorps spécifiques anti-HBsAg, et d'augmenter les taux de séroconversion avec une dose plus faible d'antigène que le vaccin adjuvanté uniquement avec alun. L'AS04 a récemment été utilisé pour adjuvanter un vaccin de type VLP (constitué de protéines L1 du virus du papillome humain) contre les infections par les génotypes 16 et 18 du virus (Cervarix™, GSK). Ce vaccin confère une protection via la production d'anticorps anti-L1 neutralisants avec une durée de vie étendue (au moins 48 mois pour les anticorps anti-L1 HPV-16 spécifiques) [109]. L'AS04 a été administré à plus de 90 000 personnes et n'a montré que des réactions locales transitoires légères à modérées, ce qui lui confère un profil de sécurité acceptable.

Quant au RC529, il est utilisé pour adjuvanter la protéine recombinante de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg) incluse dans un vaccin contre ce virus et a été commercialisé en décembre 2006 en Argentine (Supervax™, Dinavax Europe).

4. Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIV)

Les IRIV sont des structures sphériques, ne contenant ni nucléocapside, ni matériel génétique, qui s'auto-assemblent à partir des glycoprotéines (GP) de surface du virus influenza préalablement solubilisées [217]. De la phosphatidylcholine dérivée d'œuf et de la phosphatidylethanolamine synthétique sont ajoutées à la préparation des GP pour former la particule complète [226]. La fonctionnalité d'un IRIV est majoritairement apportée par la présence des GP de surface, l'hémagglutinine (HA, 2 sous types existent, HA1 et HA2) et la neuraminidase (NA). Les IRIV entrent dans les cellules dendritiques en se liant aux acides sialiques de ces cellules via la protéine HA1 et se retrouvent dans les endosomes [12]. A l'intérieur de la CD, la protéine HA2 permet la fusion membranaire avec l'endosome et libère le contenu de l'IRIV [342]. Le chargement de l'antigène vaccinal sur l'IRIV détermine la voie de présentation au CMH et permet donc de modifier la réponse induite [227]. Ainsi, après fusion membranaire dans la CPA, les antigènes de surface vaccinaux et HA / NA (ou uniquement HA et NA si aucun antigène vaccinal n'est ajouté), se retrouvent dans les

endosomes. Ils sont ensuite associés à une molécule du CMH de classe II et donc présentés aux LT auxiliaires CD4+. Les antigènes contenus dans l'IRIV se déversent dans le cytoplasme de la CPA après fusion et sont présentés sur les molécules CMH de classe I pour induire des réponses T cytotoxiques [46].

L'activation des CD par les IRIV, identifiée par l'augmentation des deux marqueurs de surface CD40 et CD80, n'est pas clairement mise en évidence. Deux études s'opposent dans des modèles qui sont toutefois difficilement comparables car les CD sont soit d'origine humaine, soit d'origine murine [12] [47]. On sait cependant que les IRIV activent la prolifération des LT CD4+ sécréteurs d'IFN γ , mais pas d'IL-4, dans des cocultures de LT CD4+ et de CD14+ humaines. De plus dans cette étude, l'expression du récepteur CXCR3, caractéristique des LT de type Th1, indique que les IRIV dirigent les réponses vers cette voie [301]. Egalement, les multiples copies antigéniques présentes à la surface des IRIV lient les récepteurs aux immunoglobulines présents à la surface des lymphocytes B ce qui stimule les sécrétions d'anticorps [102]. Cette reconnaissance directe permet aussi aux antigènes vaccinaux d'être présentés avec des molécules CMH de classe II à la surface des LB. En retour, la cellule reçoit les signaux d'activation des LT auxiliaires CD4+ spécifiques de l'antigène déclenchant son activation et sa prolifération (Figure 9).

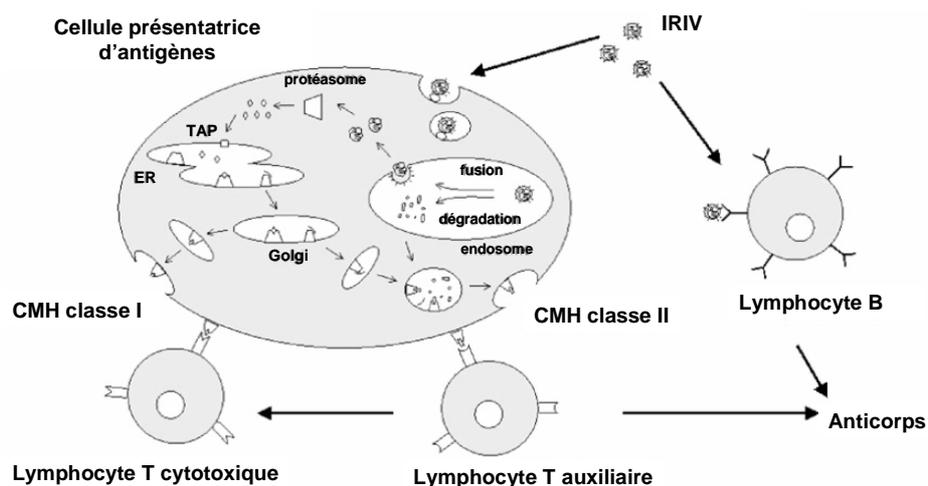


Figure 9 : Mécanisme d'action proposé des IRIV (adaptée de [378]). La voie de présentation de l'antigène vaccinal au CMH est influencée par son mode de liaison avec l'IRIV. Ainsi, les réponses T cytotoxiques et humorales peuvent être induites par utilisation des IRIV. Ces derniers activent aussi directement la production d'anticorps par les LB.

La majorité de la population a une pré-immunité au virus influenza pouvant nuire à l'induction des réponses immunes par les IRIV. Cependant, il a été montré que l'existence de cette pré-immunité n'affecte pas les activités cytotoxiques T induites par les IRIV, que ce soit après une injection ou plusieurs rappels [83]. De plus, elle serait même responsable d'une augmentation des réponses humorales [264], sans doute via l'existence d'une réponse mémoire à influenza et d'une amélioration de l'internalisation des particules couvertes d'anticorps anti-influenza [226].

Trois vaccins utilisent les IRIV, l'un est dirigé contre le virus de l'hépatite A (Epaxal®, Berna/Crucell) et les deux autres contre le virus influenza (Inflexal® V, Berna/Crucell et Invivac®, Solvay). Plusieurs dizaines de millions de doses ont été administrées démontrant l'efficacité et la sûreté de ce type d'adjuvants [226]. Les réponses induites permettent une vaccination efficace chez les personnes âgées et l'immunité conférée par Epaxal pourrait persister sur une période d'au moins 20 ans [227].

5. Sous-unité B de la toxine cholérique (CTB)

La CTB est l'une des deux sous-unités de la toxine cholérique. Elle est responsable de l'attachement aux cellules épithéliales intestinales par interaction avec un lipide membranaire, le ganglioside GM-1. La seconde sous-unité (A) est porteuse de l'activité catalytique responsable de l'effet toxique. La CTB n'a pas d'activité activatrice ou de maturation sur les CD mais elle augmente les capacités de présentation d'un peptide soluble du lysozyme du blanc d'œuf de poule (HEL) par les macrophages péritonéaux murins en culture [210] et induit la sécrétion d'IFN γ par les muqueuses nasales et vaginales [38;94]. Peu d'informations existent sur le mécanisme d'action propre de CTB, mais son effet adjuvant après administration intra-nasale ou parentérale est connu [352]. On sait cependant que le couplage d'un antigène du soi à la CTB induit la tolérance envers cet antigène offrant des perspectives pour le traitement des maladies auto-immunes (e. g. diabète de type 1 où la CTB est couplée à l'insuline) [98]. Cette protéine bactérienne est incluse à une préparation de *Vibrio cholera* tués dans un vaccin oral contre le cholera (Dukoral®, Crucell) pour

augmenter les réponses immunes au niveau des muqueuses. La protection conférée par ce vaccin est élevée chez l'homme (85% à 6 mois) mais n'est maintenue que sur 36 à 48 mois après injection en fonction de l'âge du vacciné et la souche considérée [162]. Elle est caractérisée par une forte sécrétion d'anticorps anti-toxine dans le sérum et d'IgA dans les intestins [331].

F. Les adjuvants en développement clinique

Dans cette partie, il est dressé une liste non exhaustive des adjuvants en cours d'essais cliniques. Pour les différents adjuvants qui seront évoqués, quelques exemples d'essais incluant ces adjuvants en cours ou récemment complétés seront présentés, avec, si possible, une attention plus particulière pour les essais les plus avancés dans le développement clinique.

1. Adjuvants à base d'aluminium

L'alun, du fait de son large emploi depuis de nombreuses années, se place comme un adjuvant attractif car facilement commercialisable, il se retrouve donc en tant qu'adjuvant dans de nombreux essais cliniques. Des combinaisons à base d'alun sont en cours d'essais de phases I et II pour la mise au point de vaccins pré pandémies basés sur la souche aviaire influenza H5N1. Le succès de la vaccination se mesure principalement par titration des anticorps anti-HA (test d'inhibition de l'hémagglutination) après injection de l'antigène H5 [237] ou de la souche virale complète inactivée par formaldéhyde [346]. Une combinaison est en développement de phase II dans un vaccin contenant une protéine de surface du *Plasmodium* (AMA-1) pour protéger de l'infection par ce parasite [152;235].

2. Emulsions

Les adjuvants en émulsions résultent de la dispersion d'une phase aqueuse dans une phase huileuse (eau dans huile, E/H) ou l'inverse (huile dans eau, H/E). Ils agissent par

réétention de l'antigène sur le site d'injection et / ou par diverses stimulations du système immunitaire mais sont parfois trop toxiques pour l'homme. Les représentants les plus connus sont :

- l'adjuvant complet/incomplet de Freund (CFA/IFA) ou les Montanides (ISA51™ et ISA720™, SEPPIC) pour les E/H,
- et le MF59® (Chiron maintenant Novartis), l'AS03 (GSK Bio) ou l'AF03 (Sanofi-Pasteur) pour les H/E.

L'IFA n'est plus utilisé chez l'homme à cause de sa toxicité, essentiellement liée à la présence mineure de nodules locaux et à la suspicion d'un effet carcinogène chez la souris [10]. Les ISA51 et ISA720 ont des caractéristiques proches de l'IFA mais utilisent des huiles biodégradables. Ils sont actuellement testés en essais de phase I pour adjuvanter des protéines de surface du *Plasmodium*, respectivement, Pfs25 / Pvs25 et une protéine chimérique PfCP-2.9 (combinaison de AMA-1 et MSP-1), dans le but d'induire des anticorps spécifiques contre ces protéines et inhiber la transmission du parasite (essai ISA51) [147;381]. L'ISA51 est aussi en essai de phase I/II pour le développement d'un vaccin universel contre la grippe injecté par la voie intramusculaire (BiondVax Pharmaceuticals Ltd.). Les résultats de cet essai seront particulièrement intéressants à suivre car, pour certains auteurs, l'induction récurrente de réactions locales sévères semble entraver leur développement clinique dans des vaccins prophylactiques [162;381].

Les trois H/E cités précédemment sont tous constitués de squalène (intermédiaire essentiel dans le métabolisme du cholestérol et des stéroïdes humains) et d'un surfactant (différent d'un adjuvant à l'autre), stabilisateur de l'émulsion et approuvé par les autorités sanitaires européennes.

Le premier représentant des H/E est le MF59. Son potentiel adjuvant est évalué pour le développement d'un vaccin pré-pandémique H5N1 (virus complet inactivé) avec pour objectif d'induire des anticorps protecteurs contre la souche (test d'hémagglutination et de neutralisation) chez les personnes adultes et âgées. L'induction d'une protection croisée est aussi recherchée [21]. Le MF59 est aussi utilisé comme adjuvant d'une glycoprotéine de

surface du cytomégalo virus, gB, dans un essai de phase II chez des adolescentes pour réduire les taux d'infection par ce virus [236;300].

Les deux derniers adjuvants de type émulsions H/E, AS03 et AF03, ont été initialement développés pour adjuvanter un vaccin pré-pandémique contre la grippe H5N1 (souche A/Vietnam/1194/2004) [194;195], et leur mise sur le marché était donc, à priori, assujettie à l'émergence d'une pandémie H5N1. Toutefois, avec l'émergence du risque d'une pandémie de grippe A H1N1 durant la révision de ce mémoire, ces adjuvants sont actuellement en cours de développement et / ou d'enregistrement auprès des agences réglementaires. Nous les présenterons donc dans cette partie qui traite des adjuvants en développement clinique.

L'AS03 est développé par GSK Bio et il contient 5% de squalène, 5% de DL- α -tocopherol (vitamine E) et 2% de polysorbate 80 (tween 80). De son côté, l'AF03 développé par Sanofi Pasteur est composé de 5% de squalène stabilisé par deux surfactants non-ioniques. Ces deux adjuvants ont été évalués pour la première fois, à ma connaissance, pour adjuvanter un vaccin pandémique contre la grippe H5N1 (vaccins inactivés, virions fragmentés cultivés sur oeuf) dans un essai clinique sur individus sains (50/groupes) injectés deux fois à 21 jours d'intervalle par voie intramusculaire à des doses allant de 1,9 μ g à 30 μ g d'hémagglutinine, en fonction de l'étude [194;195]. Dans ces essais, les deux adjuvants ont permis une induction d'anticorps au-delà du seuil de séroprotection (1 :40) considéré comme protecteur. Les résultats obtenus dans ces études sont relativement similaires, bien que difficile à comparer strictement, et montrent l'efficacité de ces adjuvants aux doses les plus faibles testées (3,8 μ g avec l'AS03 [194] et 1,9 μ g avec l'AF03 [195]). Ce paramètre est d'une importance capitale dans un contexte pandémique où la demande mondiale en doses vaccinales serait amenée à s'accroître.

3. Ligands des Toll-Like Receptors

La découverte de ces récepteurs de l'immunité innée détectant les motifs structuraux des agents pathogènes a permis d'envisager la manipulation de ce système de récepteurs.

La diversité des récepteurs Toll a donné naissance à divers ligands synthétiques tels que les motifs CpG non méthylés, le résiquimod (agoniste TLR7/8), la flagelline (TLR5 agoniste) ou le poly I:C (TLR3 agoniste) [160]. Les CpG sont des oligonucléotides qui miment la présence d'un ADN pathogène et agissent en activant les TLR9. En réponse, les cellules produisent des cytokines pro inflammatoires (IL-6, TNF α , IL-1) et pro-Th1 (IL-12, IFN γ), et développent des activités T cytotoxiques. Le CpG 7909 (VaxImmune™) a récemment été évalué dans une phase I en combinaison avec la protéine AMA-1 du *Plasmodium* adsorbée sur alun et a permis d'augmenter les sécrétions d'anticorps anti-AMA1 responsables de l'inhibition de la croissance des parasites *in vitro* par rapport au vaccin sans CpG [229]. Ce CpG est également envisagé pour adjuvanter le vaccin contre l'hépatite B (Engerix B®, GSK) chez les patients qui ne répondent pas au vaccin commercial tels que les personnes infectées par le VIH [70]. Dans cette étude, des taux d'anticorps anti-HBs plus élevés sont ainsi obtenus de façon durable en présence du CpG par rapport à l'injection du vaccin seul. Le résiquimod est testé en phase I/II sous forme de gel appliqué au moment de la vaccination contre le VHB. Peu de données sont disponibles sur cet essai [63]. Enfin, une phase I est en cours pour évaluer l'induction d'anticorps anti-HA1 dans un vaccin contenant une protéine de fusion (VAX125) composée de la partie HA du virus influenza H1 et d'un ligand du TLR5, la flagelline, en tant qu'adjuvant [66].

4. IRIV

Les IRIV sont en cours d'évaluation pour le développement d'un vaccin préventif contre les infections à *Plasmodium*. Dans cette étude de phase I, l'adjuvant « PEV3A » est un mélange de deux IRIV contenant chacun un peptide synthétique dérivé des protéines CSP et AMA-1 et dont l'efficacité a été montrée au cours d'essais cliniques préliminaires [240]. L'adjuvantation confère ici une protection humorale maintenue pendant un an ou plus après la dernière immunisation, et qui est inhibitrice de la croissance parasitaire *in vitro* et protectrice dans un modèle d'épreuve parasitaire [338].

5. Les saponines

Les saponines sont des composés aux propriétés tensioactives extraits de plantes qui interagissent avec le cholestérol des membranes cellulaires. Par nature, les saponines ont des activités lytiques sur les cellules de l'hôte ce qui libère des signaux de danger. Quil-A est une saponine purifiée à partir de l'écorce d'un arbre sud américain, le *Quillaja saponaria* Molina. Sa composition est très hétérogène et le rend trop toxique pour l'homme [164;329]. Quil-A est associée à des phospholipides et du cholestérol pour former les ISCOM (Immuno Stimulating COMplexes) qui sont des structures particulières au sein desquelles l'antigène vaccinal est attaché par des liaisons hydrophobes. L'ISCOMATRIX® (CSL Limited) est un adjuvant de type ISCOM couramment utilisé dans les études cliniques car il est bien caractérisé, les composants y sont exclusivement synthétiques ou d'origine végétale connue. Les ISCOM possèdent à la fois des propriétés immunostimulantes et véhicules [84]. Leur nature particulière leur permet d'être facilement phagocytés par les DC grâce à une interaction avec le récepteur appelé DEC-205 [275]. Les ISCOM orientent la présentation des antigènes vers les deux voies de présentation du CMH permettant l'induction de réponses humorales et lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques [275]. L'ISCOMATRIX® est testé dans un essai de phase I pour adjuvanter un vaccin VLP octavalent composé de la protéine L1 du virus du papillome humain et formulé dans de l'alun. La tolérabilité, l'aspect sécuritaire et l'induction d'anticorps anti-L1 contre les différents génotypes inclus seront évalués [64]. La purification des Quil-A a mis en évidence une fraction, le QS21® (Antigenics), dont l'activité adjuvante est maximale et la toxicité réduite. Il est utilisé dans la composition des « Adjuvant Systems » de GSK (voir paragraphe 7. Les combinaisons d'adjuvants).

6. Les cytokines

Les cytokines sont des médiateurs moléculaires qui orientent la réponse immunitaire vers un profil Th1, Th2 ou un mélange des deux. Selon la cytokine choisie, il est possible

d'agir sur une étape spécifique du développement d'une réponse immunitaire ou sur plusieurs à la fois selon la nature pléiotrope de la cytokine. Ces caractéristiques permettent d'envisager leur utilisation pour adjuvanter des vaccins. Dans l'organisme, leur demi-vie est très courte mais elles peuvent être facilement co-exprimées avec l'antigène vaccinal dans un vaccin à ADN ou dans un vecteur viral pour prolonger leur expression et donc augmenter leur durée de vie [23]. Il est également facile de les produire sous forme de protéines recombinantes puis de les coupler à des agents qui les protègent de la dégradation *in vivo* (*i. e.* liposomes). En clinique, le GM-CSF sous forme de protéine recombinante a été inclus dans un essai de phase I pour adjuvanter un vaccin peptidique (épitopes T auxiliaires des protéines env et gag et épitopes CTL des protéines gag et nef du VIH) déjà combiné avec le RC529. A peine plus de 7% des vaccinés ont cependant développé des réponses IFN γ spécifiques détectables après restimulation des cellules mononuclées du sang avec des pools de peptides [317]. L'IL-2 est employée, sous une forme combinée à la fraction constante d'une IgG et exprimée par un vecteur ADN, dans un essai de phase I pour adjuvanter les protéines gag, pol, nef et env (multiclades) du VIH codées sur ce même vecteur. Le profil d'inocuité et l'immunogénicité de ce vaccin seront suivis dans l'essai mais peu d'informations sont actuellement disponibles [68]. L'emploi des cytokines est cependant délicat car leur action directe sur le système immunitaire peut conduire à des réponses non désirées comme dans cet essai où la prise d'IFN α juste avant l'administration d'un vaccin anti-grippal a réduit les titres d'IgG2 circulantes et d'IgA sécrétées dirigées contre une des trois souches du vaccin [188]. Principalement, les cytokines peuvent être responsables d'effets secondaires supportant l'idée selon laquelle leur emploi serait plus adapté dans des vaccins thérapeutiques où ces effets peuvent être, dans une certaine limite, plus acceptables en fonction du rapport bénéfice / risque énoncé précédemment. Ainsi, les cytokines sont plus largement employées dans des stratégies d'immunothérapies. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'IL-7 que la société Cythéris combine avec un panel varié de candidats vaccins en essais de phases cliniques I et II pour le traitement de maladies infectieuses (VHC, VIH) ou de cancers (mélanome).

7. Les combinaisons d'adjuvants

GSK Bio (Belgique) a mis au point diverses combinaisons d'adjuvants appelés les « Adjuvant Systems » (AS). L'AS04 (MPLA et Alun), puissant inducteur de réponses humorales, est testé en phase II dans un vaccin contenant une protéine de surface du virus d'Epstein-Barr (EBV), gp350, pour induire des anticorps neutralisants spécifiques (protection contre la mononucléose) [314]. Il est aussi évalué en phase III en tant qu'adjuvant de la glycoprotéine de surface gD2 du virus de l'herpes simplex-2 pour induire des anticorps anti-gD2 chez des femmes non infectées [109]. L'AS02 a été développé pour induire, en plus des réponses humorales, une forte réponse T caractérisée par la sécrétion d'IFN γ . Il contient du MPLA et du QS21 et a récemment terminé un essai de phase I associé avec la protéine AMA-1 de *Plasmodium* où, après deux injections, il a induit des anticorps anti-AMA-1 et a stimulé la prolifération des cellules mononuclées du sang des vaccinés et la sécrétion d'IFN γ dans le test de l'ELISpot par ces cellules [282]. Dans un autre essai de phase I, l'AS02 est utilisé comme adjuvant dans un vaccin constitué des protéines Nef, Tat et gp120 du VIH. Des anticorps anti-Nef, -Tat et -gp120 ont été détectés, capables de neutraliser une souche de laboratoire ainsi que des réponses T prolifératives spécifiques des antigènes [67;118]. L'AS02 est aussi évalué dans une phase II en association avec un fragment de la protéine MSP-1 de *Plasmodium falciparum*. Cependant, ce vaccin n'a pas fait diminuer le nombre d'enfants infectés à 6 mois dans le groupe vaccinés par rapport au groupe contrôle [239]. Enfin, l'AS01 est une combinaison de MPLA, QS21 et liposomes dont le but est de remédier aux faibles réponses LT CD8+ obtenues avec les autres AS [109]. GSK a développé un vaccin basé sur l'AS01 pour induire des anticorps neutralisants des sporozoïtes de *Plasmodium* ainsi qu'une réponse cellulaire hépatique pour détruire les cellules infectées. Ce vaccin, nommée RTS,S, est constitué de fragments de la protéine CSP du parasite fusionnés à la protéine de surface du VHB (HBsAg) et d'HBsAg seule. Ces protéines s'auto-assemblent après purification pour former le vaccin qui est adjuvanté avec différents AS, et notamment avec l'AS01 dans un essai de phase II/III qui évaluera le taux d'infections chez les personnes vaccinées par rapport aux non vaccinées sur 4 ans [65].

G. Adjuvants en développement préclinique

Parmi les adjuvants testés dans des études pré-cliniques, on retrouve ceux développés dans le cadre d'essais cliniques, que ce soit pour d'autres indications ou pour optimiser leur utilisation (e. g. les saponines [272], les « Adjuvant Systems » [215] ou les ligands de TLR4 [96]). On retrouve également des adjuvants dont les origines sont très diversifiées. A titre d'exemple, ils sont :

- soit des dérivés de végétaux : extraits de racines, d'écorces [272;328;382],
- soit synthétiques : TLR4 agoniste E6020 [160], TLR7/8 agoniste imidazoquinoline [150], polymères et nanoparticules [123],
- soit à base de lipides : liposome cationique DOTAP/DC-Chol/DDA [3;61],
- soit des dérivés bactériens : vecteurs bactériens vivants comme les vecteurs issus de *Lactobacillus acidophilus* [219] et *Salmonella typhimurium* [146], ou tués appelés des bactéries phantômes (bacterial ghost) [280],
- soit des dérivés de composants bactériens : toxines thermolabiles [69], extraits purifiés de lipopolysaccharides [269],
- soit des dérivés de cytokines ou molécules humaines : cytokines (IL-1, IL-12, GM-CSF, IFN), molécules de co-stimulations (CD40, CD28)[24] ou Heat Shock Proteins (HSP70, Gp96) [39].

En développement pré-clinique on trouve également des associations d'adjuvants, déjà commercialisées avec le système AS01 par exemple. Elles présentent l'avantage de cumuler, voire rendre synergique, les actions des adjuvants et orienter plus finement vers la réponse souhaitée en jouant sur les éléments de la combinaison. A titre d'exemple, nous pouvons citer les associations de liposomes/CpG-MPL [61] ou des associations de ligands TLR / ligands non TLR [129;179].

L'ensemble de ces études indique, en règle générale, que pour prétendre entrer en phase d'essai clinique, un nouvel adjuvant doit en premier lieu être criblé *in vitro* car le nombre grandissant de molécules aux propriétés adjuvantes suspectées ne permet pas

directement des tests systématiques chez l'animal. Le candidat adjuvant doit être apte à induire l'augmentation de marqueurs indicatifs de l'activation (par exemple augmentation de marqueurs tels que CD80, CD86, MHCII, CCR7) des cellules de l'immunité innée (par exemple les cellules dendritiques), préférentiellement vers un phénotype Th1 (par exemple induire la stimulation des sécrétions d'IFN γ et d'IL-12). Toutefois, il convient de garder à l'esprit que le développement *in vitro* ne peut, à l'heure actuelle, se substituer aux analyses *in vivo*. Il est parfaitement admis que la complexité du vivant n'est jamais prise en compte dans son intégralité dans les modèles *in vitro*, bien que des modèles de plus en plus complexes soient en cours de développement. A titre d'exemple, Gaucher et al. mettent en évidence l'existence d'une corrélation entre les résultats de trois essais cliniques et ceux d'un modèle *in vitro* innovant pour l'analyse de la réponse immune induite par la vaccination avec le vaccin YF17D contre la fièvre jaune [110]. Quoiqu'il en soit, les observations *in vitro* dirigent souvent l'évaluation *in vivo* chez le petit animal qui reste un passage obligatoire. Les effets observés *in vitro* doivent donc être corrélés à des fonctions *in vivo* en utilisant des modèles animaux pertinents, si techniquement disponibles. A cette condition, l'adjuvant pourra être comparé aux adjuvants déjà commercialisés et il lui faut alors montrer des qualités supérieures telles qu'une moindre réactogénicité, une augmentation de l'immunogénicité et / ou une capacité à adjuvanter des doses faibles d'antigènes. Il lui faut ensuite passer avec succès les tests de toxicité afin d'évaluer si le composé a des activités pyrogènes, modulatrices sur le système cardiaques ou encore mutagènes pour le vacciné et ses descendants. Enfin, l'analyse des propriétés pharmacocinétiques et de biodistribution qui identifie les demi-vies ou la persistance tissulaire est également une étape indispensable pour la poursuite du développement en phases cliniques [43]. Là encore, il faut rester vigilant et se souvenir que les systèmes murins ne sont que des modèles qui ne peuvent pronostiquer fidèlement le devenir chez l'homme [214].

La découverte de nouveaux adjuvants de vaccination est aujourd'hui un secteur de recherche à part entière qui doit prendre en compte les avancées les plus modernes en immunologie pour répondre aux attentes de la société, et l'émergence de nouveaux

pathogènes argumente plus que jamais en faveur de ces recherches [223]. Ainsi, la plupart des grands groupes pharmaceutiques fabricants de vaccins prennent part à ce développement généralement après l'acquisition de licences auprès de sociétés de plus petite taille (tableau 5).

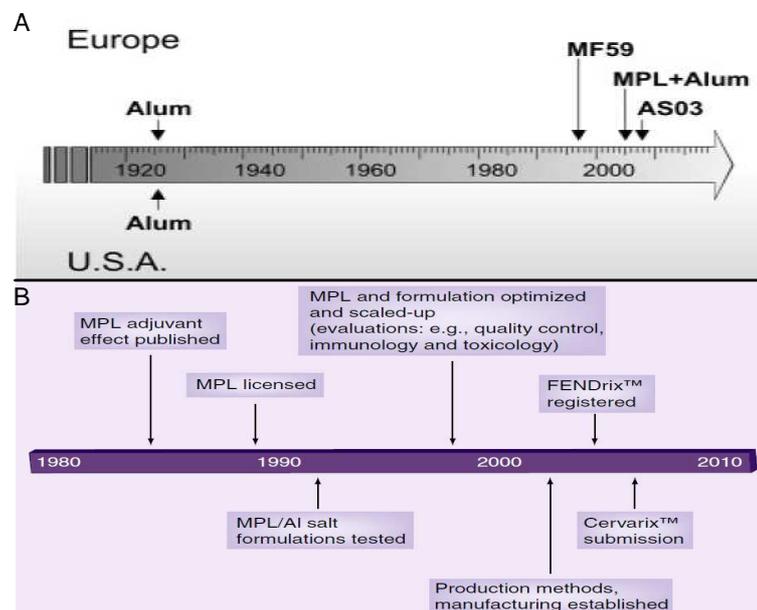
Tableau 5 : Aperçu de groupes pharmaceutiques et sociétés de biotechnologie qui développent des adjuvants (propriétaires ou obtenus par acquisition). L'utilisation de ces adjuvants dépasse le simple cadre de la vaccination préventive.

Société	Adjuvant	Acquisition
Antigenics	QS21	-
3M	TLR 7, 8 agonistes	-
Biogen Idec	Provax	-
Crucell	Liposomes	-
CSL	ISCOMATRIX	-
CytRx	TiterMax	-
Diverses	Alun	-
GSK	Adjuvant System	<i>Corixa</i>
Merck & Co	ISS TLR	<i>Dynavax</i>
	7, 8, 9 agonistes	<i>Idera</i>
Novartis	MF59	<i>Chiron</i>
	IC31	<i>Intercell</i>
	ISS	<i>Dynavax</i>
OM Pharma	OM-Triacyls	-
Pfizer	CpG	<i>Coley</i>
Sanofi Pasteur	E6020	<i>Eisai</i>
	IC31	<i>Intercell</i>
	ISS	<i>Dynavax</i>
Seppic	Montanide	-
Statens Serum Institute	QuilA	-
Vaxine Pty	Advax	-

A l'image des vaccins, le développement d'adjuvants de vaccination est largement conditionné par l'environnement réglementaire car, et ce particulièrement aux Etats-Unis, les autorités ont choisi de privilégier la sécurité à l'efficacité. Toutefois, diverses pistes d'études peuvent être proposées pour faciliter la mise sur le marché. En effet, il existe une grande diversité d'adjuvants, bien que peu de mécanismes d'action soient connus, rendant difficile leur acceptation par les autorités, notamment pour être utilisés dans des vaccins prophylactiques. Une meilleure compréhension des modes d'actions et / ou des preuves d'inocuité solides seront sans doute d'une grande importance pour de futures approbations. De même, l'acceptation par les autorités serait facilitée si l'indication ciblée correspondait à un besoin médical non satisfait ou dont les thérapies actuelles sont limitées (e. g. cancers). Enfin, les expériences passées (e. g. Cervarix, Fendrix) nous ont montré qu'il serait sans

doute plus raisonnable de cibler en premier lieu les marchés hors Etats-Unis où la position ne semble pas encore en faveur de l'acceptation d'adjuvants autre que les aluns. La figure 10, en montrant à la fois la faible proportion d'adjuvants mis sur le marché et le temps de développement d'un adjuvant commercial (AS04, GSK), reflète en partie les difficultés liées à la mise sur le marché d'un adjuvant. Notamment, un adjuvant n'est jamais mis sur le marché en tant que tel, mais uniquement en tant que composant d'une préparation vaccinale car les profils toxiques et d'efficacité en dépendent. C'est une des raisons qui explique pourquoi les évaluations (pré-cliniques, toxicologiques ...) doivent être réalisées au cas par cas pour chaque combinaison immunogène / adjuvant, expliquant aussi le délai de mise sur le marché d'adjuvants dans différents vaccins [162]. Devant ces difficultés, les autorités ont mis en place un certain nombre de lignes de conduite qui aident au développement pré-clinique et clinique des adjuvants (et des vaccins) et dont les fabricants devraient prendre connaissance pour améliorer l'entrée sur le marché des molécules (European Medicines Agency : www.emea.europa.eu/pdfs/human/vwp/13471604en.pdf, US Food and Drug Administration : www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/default.htm, International Conference on Harmonisation : www.ich.org).

Figure 10 : Chronologie du développement des adjuvants de vaccination. (A) : date de mise sur le marché des adjuvants utilisés chez l'homme. (B) : temps de développement d'un adjuvant, l'exemple de l'AS04 développé par GSK.



III) La réponse de phase aiguë (RPA)

Les recherches de l'équipe du Dr Lotteau, à l'origine de ces travaux de thèse, ont porté sur la modulation des réponses immunes en fonction de l'état de lipoprotéines. Au cours de ces recherches, l'équipe a montré que les lipoprotéines de basse densité (LDL) subissaient des phénomènes d'oxydation durant une condition pathologique : la réponse de phase aiguë. Nous allons voir au cours de ce chapitre comment l'oxydation des LDL favorise l'acquisition de propriétés diverses par ces structures, et notamment des propriétés adjuvantes.

A. Définition

La réponse de phase aiguë est une réaction non spécifique et transitoire à l'agression tissulaire, d'origine infectieuse ou non, qui se déclenche rapidement en réponse à l'activation des macrophages ou des monocytes du sang. Elle se développe en parallèle de la réponse immunitaire innée et fait intervenir des organes comme le foie et le cerveau. Si l'agression est d'origine infectieuse, la RPA a pour objectif principal de contribuer à l'émergence d'un environnement défavorable pour le pathogène. Dans tous les cas, elle aide l'organisme à retourner à son état homéostatique. La RPA est initiée par les sécrétions de cytokines pro-inflammatoires des cellules de l'immunité innée dont les principaux représentants sont l'interleukine-6 (IL-6) et les membres de la famille de l'interleukine-1 (IL-1) et du facteur nécrosant des tumeurs (TNF).

B. Changements métaboliques

Les cytokines sécrétées vont agir de concert pour permettre l'initiation de réponses destinées à éliminer le pathogène et / ou réparer les tissus endommagés. Ces cytokines sont considérées comme des molécules pyrogènes endogènes, c'est-à-dire capables d'élever la température corporelle. Pour cela, elles agissent sur l'hypothalamus qui va sécréter la

prostaglandine E2 dont l'action systémique conduit à réduire les pertes calorifiques tout en augmentant la production interne de chaleur. Cet accroissement thermique se fait par fermeture des pores de la peau (réduction des pertes) et utilisation des cellules musculaires et graisseuses pour puiser de l'énergie [206]. Cette élévation aura une action néfaste sur les bactéries et les virus qui prolifèrent préférentiellement à des températures égales ou inférieures à 37°C. De leur côté, les réponses immunitaires adaptatives seront plus efficaces à cette température. L'action spécifique des cytokines sur le système nerveux met en place un circuit de régulation négative (negative feed-back loop) qui empêche l'emballement de la réponse en déclenchant la libération de corticostéroïdes connus pour inhiber l'expression des gènes codant pour les cytokines [35].

Au niveau du foie, ces cytokines sont responsables de l'activation de la synthèse de nombreuses protéines par les hépatocytes. Elles sont appelées les Protéines de la Phase Aiguë (PPA) et ont, comme des anticorps, un rôle d'opsonisation et de fixation du complément en se fixant sur les PAMP. Contrairement aux anticorps, les PPA sont d'une spécificité moindre et peuvent donc identifier un large panel de structures exogènes et ne nécessitent que l'influence des cytokines pour être produites. Cette non spécificité peut se révéler défavorable pour l'organisme si la sécrétion se prolonge, ainsi les PPA peuvent alors être à l'origine de réponses inflammatoires chroniques dans l'organisme [265;281].

Enfin, les cytokines pro-inflammatoires produites ont une action de leucocytose, c'est-à-dire qu'elles favorisent la circulation et le recrutement des phagocytes sur le site lésé (neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes et lymphocytes). Pour cela, elles agissent sur les cellules souches de la moelle osseuse augmentant la production et la libération de leucocytes matures dans la circulation, et sont capables de mobiliser les pools de globules blancs faiblement adhérents et circulants qui se trouvent dans les vaisseaux sanguins (soit 2% à 3% du pool total de leucocytes) [2].

L'association des ces trois mécanismes, élévation de la température corporelle, sécrétion de protéines opsonisantes et leucocytose, permet une réponse rapide et large du système immunitaire pour contenir l'agression pendant la mise en place de la réponse

adaptative et tend à participer à la résolution des dommages tissulaires (figure 11). Il est intéressant de noter que le TNF agit positivement sur la migration des cellules dendritiques vers les ganglions drainants et les aide dans leur différenciation en cellules présentatrices d'antigènes. Cet aspect donne un rôle indirect de la RPA sur le développement de la réponse immunitaire adaptative [79].

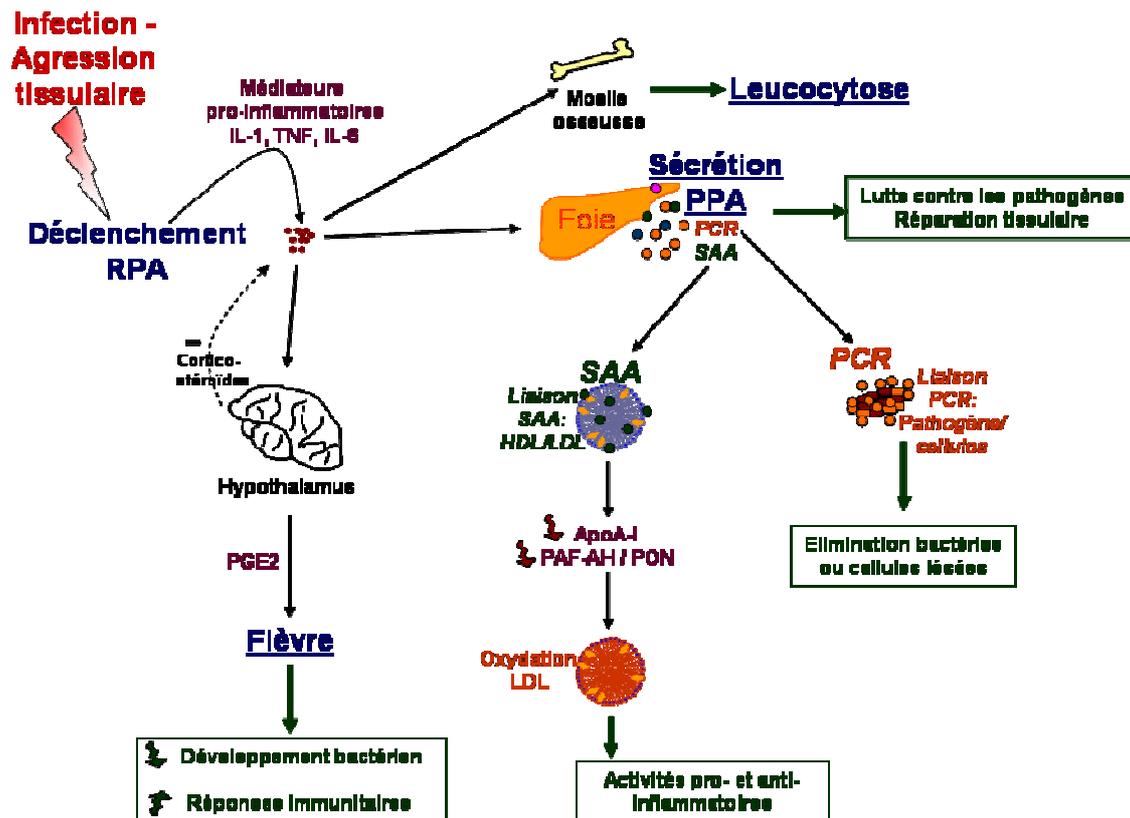


Figure 11: Principales étapes de la réponse de phase aiguë (RPA). La RPA se déclenche après une agression tissulaire d'origine infectieuse ou non. Les cytokines pro-inflammatoires déversées dans l'organisme vont agir sur trois organes : l'hypothalamus (activité pyrogène, régulation corticostéroïde), le foie (sécrétion de PPA) et la moelle osseuse (leucocytose). Le foie produit la protéine C réactive aux activités opsonisantes (élimination des pathogènes) et la protéine sérique amyloïde A qui lie les lipoprotéines HDL et LDL (dérégulation des mécanismes oxydatifs). PCR : protéine C réactive, SAA : protéine sérique amyloïde A, HDL : high density lipoprotein, LDL : low density lipoprotein, PGE2 : prostaglandine E2, ApoA-1 : apolipoprotéine A-1, PAF-AH : platelet activating factor acetylhydrolase, PON : paraoxonase.

C. Protéines majeures de la phase aiguë

Parmi les protéines synthétisées par les hépatocytes, deux vont voir leur concentration plasmatique augmenter plus de 1000 fois, la Protéine C Réactive (PCR) et la protéine Sérique Amyloïde A (SAA) [15;361].

1. La protéine C réactive

a. Caractéristiques

La PCR est une protéine de la famille des pentaxines ayant une demi-vie d'environ 4 à 6h *in vivo* qui se lie à des lipides complexes, les phosphocholines, via une interaction calcium dépendante. Cette protéine apparaît dans les heures qui suivent le déclenchement de la phase de réponse aiguë et atteint son maximum entre 24h et 48h. Grâce à sa courte demi-vie, elle disparaît rapidement de la circulation évitant ainsi son excès. La PCR a été historiquement l'un des premiers marqueurs largement utilisés dans le diagnostic et le suivi de certaines affections comme l'arthrite rhumatoïde ou les affections cardiaques [265;281]. Les phosphocholines liées par la PCR se trouvent principalement à la surface des bactéries, des champignons et de certains parasites mais également sur la surface des membranes biologiques qui sont riches en phosphatidylcholines et sphingomyélines. La PCR peut aussi se lier avec des composants nucléaires ne contenant pas de phosphocholines, tels que les histones et la chromatine, grâce à un mécanisme Ca^{2+} -dépendant et des interactions électrostatiques [88].

b. Fonctions

La PCR va entourer les pathogènes et certaines membranes biologiques entraînant leur opsonisation et l'activation du complément pour initier leur élimination par les cellules phagocytaires. Toutefois, pour ne pas être délétère pour l'hôte, la PCR ne reconnaît que les cellules endogènes endommagées, en apoptose ou nécrotique. Alors comment expliquer cette spécificité ? Les cellules en apoptose ou en nécrose réorganisent la composition

lipidique de la membrane et exposent à leur surface plus de phospholipides (*e. g.* phosphatidylsérine et lysophosphatidylcholine) [187]. Or il a été montré que la PCR ne lie les phosphocholines que si des lysolipides comme la lysophosphatidylcholine sont présents (signal de reconnaissance) [362]. Mais dans ce contexte, comment expliquer que la PCR reconnaît directement les phosphocholines des pathogènes et pas celles des cellules normales de l'hôte? De récentes études montrent que la PCR interagit en fait avec d'autres protéines de la phase aiguë avant de se fixer sur les pathogènes augmentant ainsi sa spécificité [233] et démontrant la complexité des activités de cette molécule.

2. La protéine sérique amyloïde A

La seconde protéine majeure de la réponse de phase aiguë est la SAA. Cette protéine fait partie de la famille des apolipoprotéines et on la retrouve enchâssée directement dans la monocouche lipidique des lipoprotéines. Elle a un tropisme principal pour les lipoprotéines de haute densité (HDL) et va entrer en compétition avec une protéine présente sur les HDL à l'état homéostatique, l'apolipoprotéine A 1 (ApoA-1). La SAA pourra alors représenter jusqu'à 87% du contenu total en apolipoprotéine des HDL. En condition normale, l'ApoA-1 maintient l'activité des enzymes associées aux HDL. Le remplacement des ApoA-1 par les SAA va donc inactiver l'activité des enzymes liées aux HDL. Toutefois, une étude récente montre qu'en réalité, les cytokines IL-6, TNF α et IL-1 β agiraient au niveau transcriptionnel pour réduire l'expression génétique de l'ApoA-1 selon un mécanisme PPAR dépendant, remettant en cause le concept du « simple » échange physique à la surface des HDL [133]. Quelque soit le mécanisme, le métabolisme des lipides et les activités des HDL seront perturbés par la réponse de phase aiguë (voir prochains paragraphes).

D. Les lipoprotéines pendant la réponse de phase aiguë

Les protéines de la réponse de phase aiguë produites par les hépatocytes ont une action directe qui se développe rapidement après agression de l'hôte. Elles sont déversées

en plus ou moins grande quantité dans la circulation où elles délivrent leurs effets en se fixant sur les pathogènes et les lipoprotéines.

1. Description des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des structures amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent une partie hydrophile et une partie hydrophobe, dont le rôle principal est le transport des lipides. En effet, les lipides sont hydrophobes et ne peuvent donc pas circuler librement dans la circulation sanguine dont la composition est aqueuse. Pour être transportés à travers l'organisme, ces lipides sont associés à des lipides complexes : les phospholipides. La particularité des phospholipides est d'avoir à la fois une surface de contact pour se lier au lipide à transporter (*queue hydrophobe ou apolaire*) et une surface de contact leur permettant d'évoluer dans la circulation (*tête hydrophile ou polaire*). Le complexe lipides/phospholipides est stabilisé grâce à l'incorporation d'apolipoprotéines enchâssées dans la monocouche externe des phospholipides. La molécule ainsi formée est appelée une lipoprotéine, constituée d'un cœur hydrophobe riche en lipides de type triglycérides, esters de cholestérol ou cholestérol libre et d'une monocouche externe contenant des protéines et des phospholipides. Les lipoprotéines sont classées selon leur densité, déterminée par le contenu lipidique et protéique qu'elles transportent. Il existe cinq structures principales qui vont des chylomicrons (riches en lipides, pauvres en protéines, de plus basse densité et de plus grand diamètre) jusqu'aux lipoprotéines de haute densité (HDL, riches en protéines et d'un diamètre minimal). Entre les deux, il y a les VLDL, IDL et LDL pour, respectivement, Very Low, Intermediate et Low Density Lipoproteins (figure 12). Les lipoprotéines sont responsables de la prise en charge des lipides dans l'organisme depuis leur arrivée dans l'intestin jusqu'à leur élimination par le foie et possèdent en outre des activités antimicrobiennes [232;351].

2. Oxydation des lipoprotéines

Les lipoprotéines ont un rôle majeur dans le métabolisme des lipides assurant leur transport et leur devenir. Durant la phase de réponse aiguë, les modifications métaboliques du foie associées à la production de protéines liant les lipoprotéines vont entraîner des changements de la composition et du rôle de ces particules. L'oxydation est l'une de ces modifications.

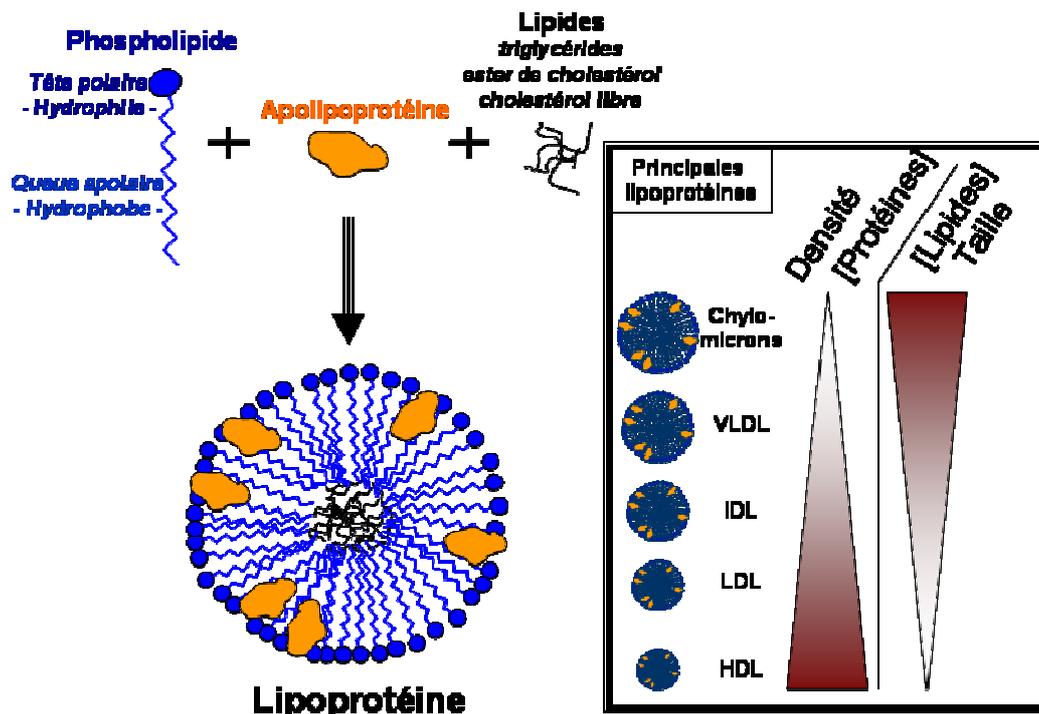


Figure 12: Caractéristiques structurales et biochimiques des lipoprotéines. Les lipoprotéines sont constituées d'un cœur hydrophobe riche en lipides et d'une couche externe de phospholipides amphiphiles. La structure est stabilisée par des apolipoprotéines enchâssées dans la membrane. Les lipoprotéines sont classées en fonction de leur contenu en protéines et en lipides qui influence leur densité et leur taille.

a. Mécanisme

Les réactions physiologiques de l'organisme produisent des agents oxydants capables de bouleverser la structure, et donc la fonction, des lipoprotéines les impliquant par exemple dans le développement de pathologies cardiovasculaires [131]. L'organisme a mis

en place une stratégie de défense composée de molécules anti-oxydantes incluant vitamines (e. g. acide ascorbique, vitamine E), enzymes (e. g. superoxide dismutase, catalase) et autres molécules (e. g. acide urique) [174]. Dans le cas des lipoprotéines, il a été montré que les LDL sont protégés de l'oxydation par les HDL et par eux-mêmes. En effet, HDL et LDL portent deux enzymes, la PAF-AH (Platelet Activating Factor AcetylHydrolase) et la PON (ParaOxoNase), qui ont la capacité de retarder ou d'inhiber les processus d'oxydation des LDL en conditions physiologiques. La PAF-AH est responsable de l'hydrolyse des phospholipides oxydés qui sont générés durant l'oxydation des LDL. Les produits obtenus, représentant des substances toxiques susceptibles d'inhiber les activités de la PAF-AH, sont ensuite éliminés par les HDL [319]. De son côté, la PON retire les espèces oxygénées qui se forment sur le LDL [184].

Durant la réponse de phase aiguë, la protéine sérique amyloïde A est présente en quantité élevée dans la circulation plasmiq ue et se lie aux lipoprotéines circulantes. Cette liaison perturbe la structure des HDL et LDL et entraîne l'inhibition des PAF-AH et PON [350]. La conséquence immédiate de cette inhibition est la perte de la protection contre l'oxydation des LDL qui deviennent ce que l'on nomme des LDL oxydés (oxLDL).

b. Importance biologique

Les oxLDL ont été intensivement étudiés pour leur rôle pro-inflammatoire et leur implication dans la genèse de l'athérosclérose [379]. En effet, sous l'influence de conditions inflammatoires ou durant la RPA, les phosphatidylcholines de surface des LDL sont oxydées puis hydrolysées en lysophosphatidylcholine et en acides gras oxydés, sous l'action de phospholipases (voir paragraphe E). Les acides gras oxydés modifient la structure de la protéine de surface des LDL, l'ApoB. Au lieu de lier les récepteurs aux LDL pour entrer en contact avec ses tissus cibles, l'ApoB lie alors les récepteurs scavenger des LDL. En parallèle, l'état d'alerte sous lequel se trouve l'organisme entraîne la transformation des monocytes en macrophages au niveau des endothéliums. Ces derniers expriment les récepteurs scavenger et reconnaissent donc les oxLDL. Ils deviennent ainsi phagocytes des

oxLDL circulants. Cette phagocytose accrue transforme les macrophages en cellules spumeuses, riches en lipides, et forme des stries graisseuses sur l'endothélium. Les premiers évènements qui marquent le début de l'athérosclérose sont ainsi déclenchés [309].

Les oxLDL sont également connus pour être des molécules anti-inflammatoires. Il a été montré que les acides gras des oxLDL sont des éléments qui préviennent le développement de la réponse d'inflammation, notamment en agissant sur des éléments du complexe PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) [72]. Cette balance issue de la composition des oxLDL permettrait la régulation fine du développement de l'inflammation en envoyant des signaux d'activation et de régulation négative au système immunitaire. D'autres études viennent appuyer ces observations et montrent le potentiel anti-inflammatoire des oxLDL [103;168].

E. La lysophosphatidylcholine (LPC)

La lysophosphatidylcholine est un produit de l'oxydation des LDL qui fait suite notamment au développement de la réponse de phase aiguë. Nous allons nous intéresser aux caractéristiques de la LPC produite.

1. Structure

La lysophosphatidylcholine est produite à partir de la phosphatidylcholine (PC, également appelée lécithine) qui est retrouvée à la surface de la plupart des membranes biologiques sous forme de phospholipides amphipathiques. La PC est un membre de la famille des lipides complexes et plus précisément des glycérophospholipides, constituée d'un acide phosphatidique auquel est greffé une choline. L'acide phosphatidique est une structure faite de glycérol ($C_3H_8O_3$) à laquelle est estérifiée deux chaînes d'acides gras (R1- et R2-CO) et un acide phosphorique (H_3PO_4). La plupart du temps, l'acide gras en position sn-1 est saturé, celui en position sn-2 est insaturé. La choline est un alcool basique ($CH_2CH_2N(CH_3)_3$) qui complète la tête polaire de la molécule. Au pH physiologique de 7.4, la

molécule est ionisée comme indiqué sur la figure 13. L'activité de diverses enzymes sur l'acide gras en position sn-1 d'un glycérophospholipide donne naissance à une structure de type lyso-2-phospholipide et, dans le cas de la PC, à la lysophosphatidylcholine.

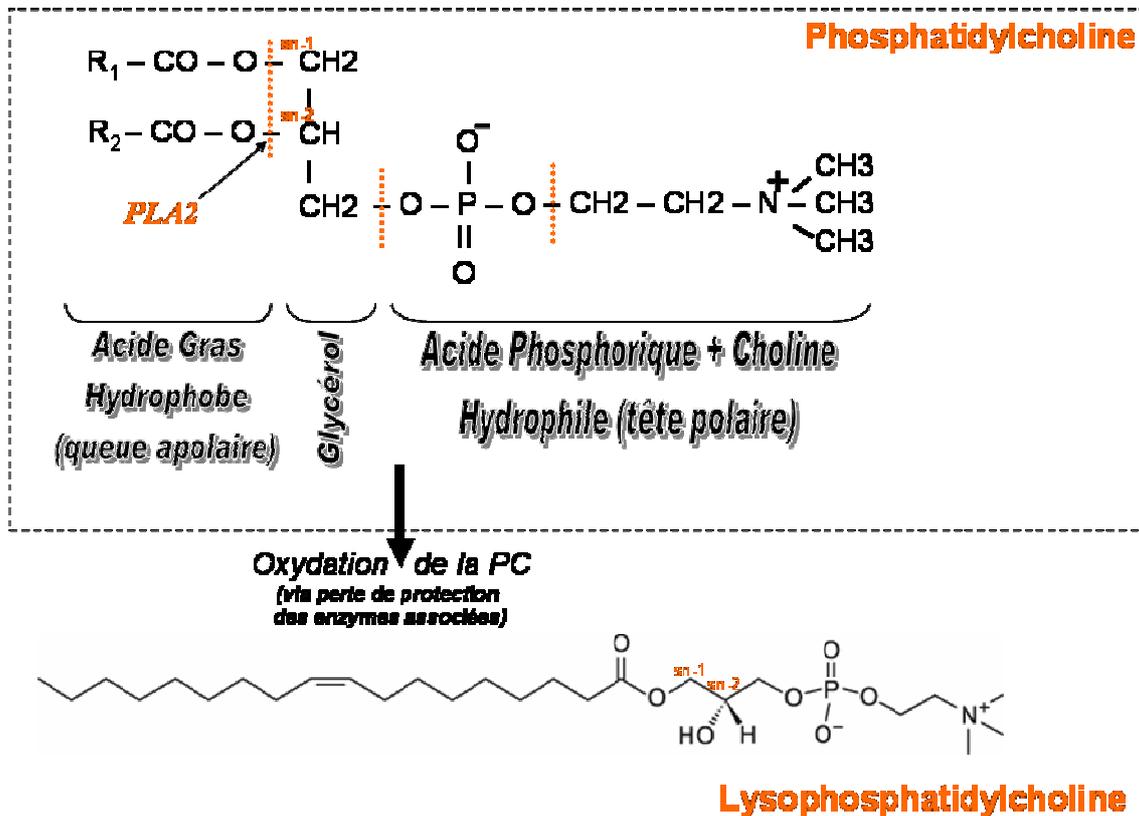


Figure 13: Structure de la phosphatidylcholine (PC) et formation de la lysophosphatidylcholine (LPC) durant la réponse de phase aiguë. La PC est un membre de la famille des glycérophosphates, constituée d'un squelette glycéro-phosphate sur lequel est estérifié deux acides gras (R1 et R2) et une tête choline. La plupart du temps, R1 (position sn-1) est saturé et R2 (position sn-2) est insaturé. Au pH physiologique (7.4) la molécule est ionisée comme indiqué. Sous l'action de la PLA2, la PC se transforme en un acide gras + un lyso-2-phosphatidylcholine ou LPC. PLA2 : phospholipase A2.

2. Synthèse et localisation

En condition physiologique, la LPC est principalement présente dans la circulation sanguine (5 à 20% du contenu total en phospholipides). Dans ce compartiment, l'enzyme LCAT (lecithin cholesterol acetyltransferase) catalyse la trans-estérification de la PC et du

cholestérol libre ce qui génère la majeure partie de la LPC saturée. La LPC insaturée est directement produite par le foie, elle se dirige ensuite vers la circulation où on la retrouve majoritairement associée à l'albumine et aux lipoprotéines [76]. Durant la réponse de phase aiguë, l'hydrolyse des PC oxydés de la surface des LDL se fait sous l'influence d'une enzyme associée aux LDL, la phospholipase A2 (PLA2), celle-ci n'étant pas capable d'agir sur les PC non oxydés. Cette spécificité proviendrait du fait que durant l'oxydation des LDL, la chaîne d'acides gras sn-2 des PC oxydés est fragmentée en plusieurs groupements insaturés, facilitant l'action hydrolytique de l'enzyme. Il a ainsi été montré que l'hydrolyse est possible sur des acides gras de taille réduite estérifiés en position sn-2 mais qu'elle devient inefficace sur une structure avec douze atomes de carbone, protégeant donc les PC non oxydés de l'hydrolyse [322]. Les sécrétions de PLA2 soluble sont fortement augmentées durant la RPA. L'enzyme augmente ainsi la conversion des PC en LPC (Figure 13). Ces mécanismes se produisent notamment suite à la perte de protection des enzymes PAF-AH et PON sous laquelle se trouvait le LDL.

Pendant la RPA, la LPC devient alors le composant majoritaire des oxLDL générés et représente 40% de leur contenu en phospholipides [321]. Nous verrons que cette augmentation conséquente de la quantité de LPC au sein des lipoprotéines oxydées joue un rôle important dans les actions de la RPA.

3. Nomenclature

Il est important de noter que le terme LPC qualifie en réalité une famille de molécules présentant des caractéristiques communes et une singularité. Ces molécules portent toute une tête choline, un acide phosphatidique et un glycérol. En revanche l'acide gras, qui est estérifié en position sn-1 sur le glycérol, peut prendre une variété de configurations qui diffèrent les unes des autres par : 1/ le nombre d'atomes de carbone présent dans sa chaîne, 2/ le nombre de doubles liaisons entre deux atomes de carbone. Une ou plusieurs doubles liaisons confèrent un état insaturé. Ainsi, la terminologie correcte de la LPC, ou

devrait-on dire « des » LPC, se présente ainsi : LPC C X :Y, où X représente le nombre de carbones et Y le nombre de doubles liaisons. De plus, un mélange de LPC va être plus ou moins riche en molécules saturées, et on définit un « index de saturation » en faisant le rapport du nombre de saturations (S) sur le nombre d'insaturations (I) pour connaître l'état général du mélange (S/I index).

A l'état naturel, de multiples espèces de LPC sont présentes dans les membranes biologiques. Ainsi la LPC d'œuf de poule ou de graines de soja, disponibles commercialement (Sigma, Avanti Polar Lipids, Lipoid), sont en fait des mélanges de LPC contenant :

- pour l'œuf de poule : 69% de LPC C16:0, 24,6% de C18:0, 3,4% de C18:1, 1,4% de C16:1, 0,3% de C14 :0 et de C18:2 et 1% d'autres espèces avec un index S/I=18,4,
- pour les graines de soja : 26,1% de C16:0, 7,3% de C18:0, 8,5% de C18:1, 50,1% de C18:2, 5,1% de C18:3 et 2,9% d'autres espèces avec un index S/I=1,9.

4. Les fonctions de la lysophosphatidylcholine

Un certain nombre de fonctions de la LPC sont connues bien que cette molécule soit encore aujourd'hui un « lysolipide énigmatique » [213]. La LPC agit directement ou par l'intermédiaire du produit de son métabolisme, l'acide lysophosphatidique, sur des cibles biologiques très diverses qui l'impliquent dans le développement de maladies cardiovasculaires, de cancers et de l'apoptose neuronale Fas dépendante [114] [330]. Cette diversité d'activités physiologiques s'explique par le fait que la LPC agit via un récepteur couplé aux protéines G, or cette famille de récepteurs transmembranaires est largement distribuée sur l'ensemble des cellules. Il a été montré de façon claire par des études d'inhibition ciblée sur récepteurs que la LPC agit indirectement sur le récepteur G2A [107]. Les activités de la LPC peuvent être divergentes car des actions à la fois pro- et anti-inflammatoires ont été montrées.

Les activités pro-inflammatoires *in vitro* reportées de la LPC incluent entre autres une activité chimiotactique sur les lymphocytes T humains [211] et sur les phagocytes [187], une

activité maturante sur des cellules dendritiques humaines en culture [253] et une activité stimulante sur la production des cytokines MCP-1 par des cellules HUVEC (mécanisme protéin kinase C dépendant) [333], et des cytokines IL-6 et IL-8 par des cellules de l'artère coronaire [7]. L'attraction des phagocytes est utilisée *in vivo* en condition homéostatique pour l'élimination des cellules en apoptose. Etant donné que la LPC est détectée sur le site des lésions athérosclérotiques, les sécrétions de cytokines reportées *in vitro* semblent responsables de l'induction et du maintien d'un contexte inflammatoire sur ce site. De plus, il a été montré que la LPC active le recrutement des lymphocytes T CD4+ dans les lésions d'athérosclérose, selon un mécanisme NF- κ B dépendant, par augmentation de l'expression du récepteur CXCR4, jouant ainsi un rôle prépondérant dans le développement de l'athérosclérose [134]. Enfin, dans une étude ayant pour objectif d'évaluer l'impact inflammatoire de la LPC C16 :0 dans les lésions psoriasiques, l'injection sous-cutanée de cette LPC chez des individus sains a révélé qu'elle provoque un afflux de leucocytes au site d'injection et une inflammation locale caractérisée par un oedème et un érythème [287]. L'ensemble de ces études est en faveur du caractère pro-inflammatoire de la LPC *in vivo*.

A côté de cela, la LPC a su montrer des activités anti-inflammatoires dans trois études séparées. La LPC atténue l'inflammation ce qui lui permet de combattre la mortalité induite après l'induction d'un choc septique dans un modèle murin. Ici, la LPC interfère en augmentant l'activité anti-microbienne des neutrophiles par action sur leur stock de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et réduit les taux d'IL-1 β et de TNF α circulants [383]. Dans une deuxième étude, la LPC réduit les traumatismes et défaillances multiples des organes qui font suite à un choc septique, démontrant à nouveau une activité sur la réduction de l'inflammation [230]. Les mécanismes ne sont pas complètement élucidés, mais la LPC pourrait agir au niveau intracellulaire en augmentant les sécrétions de facteurs protecteurs des endothéliums (e. g. nitric oxide synthase NOS [385]), plutôt que par séquestration physique de l'activateur du choc septique. Cette hypothèse est renforcée par une étude montrant que la LPC inhibe la sécrétion d'une protéine tardive, HMGB1 (high-mobility group

box 1) dont les activités pro-inflammatoires sont impliquées dans le choc septique induit par endotoxines [59].

Il est intéressant de noter que dans la plupart de ces modèles, la LPC biologiquement active est toujours constituée d'un nombre élevé de carbone (>16) sur sa chaîne grasse [7;59;211;230;287;383]. Cette observation suggère que l'état structural de la LPC a une importance décisive sur sa fonction comme nous en reparlerons dans notre Discussion.

5. Démonstration de l'activité adjuvante

Ce sont les études de l'équipe du Dr Lotteau qui ont permis d'identifier l'activité adjuvante de la LPC d'œuf de poule. Tout d'abord, ce sont les LDL oxydés qui ont montré leur potentiel adjuvant. Les premières études ont été réalisées *in vitro* sur cellules dendritiques dérivées de monocytes de sang humain (MoDC, monocyte derived dendritic cell) cultivées six jours en présence de GM-CSF et d'IL-4 [71]. Les oxLDL se sont montrés capables d'augmenter l'expression des marqueurs de maturation CD86, CD80, CD40, HLA-DR à la surface des cellules, de réduire leur activité de phagocyte et d'augmenter leur production d'IL-12 et leur fonction stimulatrice des lymphocytes T. Ces fonctions ne s'exercent que si la stimulation a lieu durant la phase terminale de différenciation des monocytes en CD immatures. Cette étude a démontré que la présence des oxLDL pouvait être un signal de stimulation du système immunitaire contribuant à la liaison entre les réponses innées et adaptatives en jouant sur l'activation des CD. Dans une autre étude, la lysophosphatidylcholine, en tant que constituant majoritaire des oxLDL, s'est révélée être l'élément responsable de ces effets et une nouvelle preuve de l'implication du récepteur G2A a été également apportée [72]. Enfin, il a été observé une inhibition forte de l'effet de la LPC par les lipides retrouvés dans le plasma en condition physiologique, ce qui expliquerait son manque de réactivité en condition homéostatique [72].

La démonstration du pouvoir modulateur de la LPC d'œuf de poule sur le phénotype et sur la fonction des CD a ouvert la voie vers l'utilisation de ce lysophospholipide comme adjuvant de vaccination. En effet, l'équipe du Dr Lotteau a montré que cette LPC était

capable d'induire le développement de réponses humorales et cellulaires contre des antigènes modèles, l'ovalbumine (OVA) et le lysozyme d'œuf de poule, après injection sous-cutanée dans le coussinet plantaire de la souris [253]. Dans ces expériences, la LPC a induit la prolifération de lymphocytes T spécifiques dans les ganglions drainants des coussinets plantaires, a augmenté les réponses effectrices LT CD8+ dans un modèle d'hyper-sensibilité de contact et a généré une réponse T cytotoxique spécifique. La LPC s'est aussi révélée être un adjuvant des réponses humorales capable d'induire la sécrétion d'anticorps spécifiques de l'antigène. Enfin, dans un modèle d'injection de cellules tumorales exprimant OVA, la LPC améliore le taux de survie à 30 jours en utilisation préventive, et retarde la croissance de la tumeur dans un modèle thérapeutique sans toutefois conduire à sa suppression. Ces résultats identifient la LPC d'œuf de poule comme un adjuvant naturel des réponses immunes cellulaires et humorales et suggèrent, plus généralement, l'utilisation de lipides endogènes dans des stratégies vaccinales et d'immunothérapies. Ce travail a servi de base pour l'initiation de mes travaux de thèse.

IV) Modèles d'étude

A. Le virus de l'hépatite C (VHC)

1. Epidémiologie et structure du virus

Dans le monde, on estime à 200 millions le nombre de personnes infectées par le virus de l'hépatite C, soit environ 3% de la population mondiale [375]. On compte 160 millions de porteurs chroniques et 3 à 4 millions de nouveaux cas chaque année. Neuf fois sur 10, l'infection est asymptomatique et on estime que moins de 30% des personnes infectées sont diagnostiquées. L'infection par le VHC est responsable de 27% des cas de cirrhoses et de 25% des cas de carcinomes hépatocellulaires toutes étiologies confondues [256]. Aucun vaccin n'est disponible, et le traitement standard à base d'interféron alpha pégylé combiné à la ribavirine n'est efficace que dans la moitié des cas environ et il n'est offert qu'à un tiers des patients notamment en raison de son coût. L'efficacité de ce traitement est génotype dépendant et il présente d'importants effets secondaires (troubles neuropsychologiques comme la dépression, symptômes grippaux, désordres auto-immuns, anémie, effets tératogènes) conduisant 10 à 14% des patients à arrêter le traitement [1].

La transmission du virus est essentiellement parentérale résultant majoritairement du contact direct avec des produits sanguins contaminés. Prédominant dans les pays en voie de développement, le risque d'infection par transfusion sanguine est quasi nul dans les pays développés depuis la mise en place de contrôles systématiques des échantillons sanguins depuis 1992. Dans ces derniers, la principale voie de transmission est l'utilisation de seringues usagées (*i. e.* toxicomanie intraveineuse ou plus rarement les infections nosocomiales).

Seuls l'homme et le chimpanzé sont des hôtes naturels du virus. Après contamination et durant 6 mois, l'individu se trouve dans la phase aiguë de l'infection où un pic d'ARN viral sérique est détectable entre 8 et 12 semaines. Soixante à 80% des personnes évoluent ensuite vers la chronicité alors que les autres éliminent spontanément le virus. Les cibles

cellulaires privilégiées du virus sont les hépatocytes où jusqu'à 10% d'entre-eux pourront être infectés. Parmi les porteurs chroniques, 5% à 20% vont développer une cirrhose sur une période de 20 à 25 ans qui est favorisée par certains facteurs externes comme l'âge ou la consommation d'alcool. Enfin, chaque année, 3% des patients atteints d'une cirrhose développent un carcinome hépato-cellulaire [337].

Le virus de l'hépatite C, mis en évidence en 1989, est un virus enveloppé à ARN positif simple brin (~9600 nucléotides) de la famille des *Flaviviridae*, seul représentant du genre des *hépacivirus*. L'ARN code pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés transcrite à partir d'un seul cadre de lecture ouvert. La protéine est découpée de manière co- et post-traductionnelle par des protéases cellulaires et virales pour générer 10 protéines (3 structurales et 7 non structurales) impliquées dans l'assemblage, la réplication et la propagation de la particule virale (figure 14) [250]. Il existe des protéines additionnelles, les protéines F (Frameshift) ou ARFP (Alternative Reading Frame Proteins), transcrites dans un cadre de lecture décalé dont les activités restent imprécises [41]. Chez un patient infecté, il y a en moyenne 10^{10} à 10^{12} particules virales générées par jour. Ce nombre, associé aux erreurs commises par la polymérase virale ARN-dépendante (pas d'activité de relecture), explique le taux et la vitesse de mutations du virus. De ce fait, il y a 6 principaux génotypes viraux (1 à 6), plus de 50 sous-types et le virus existe sous la forme de quasi-espèce chez chaque patient infecté, augmentant considérablement la diversité de la population infectieuse et ainsi la difficulté à éliminer ce virus [276].

2. Corrélats de la protection contre le VHC

a. Réponses humorales

L'évaluation du rôle de la réponse humorale dans la résolution ou la protection contre le VHC a pris une nouvelle dimension depuis la mise en place en 2003 de pseudo-particules virales exprimant les glycoprotéines d'enveloppes du VHC (HCVpp) [25]. Ces particules peuvent notamment entrer dans des cellules hépatiques primaires humaines en culture et permettent l'étude des activités neutralisantes des anticorps spécifiques des protéines

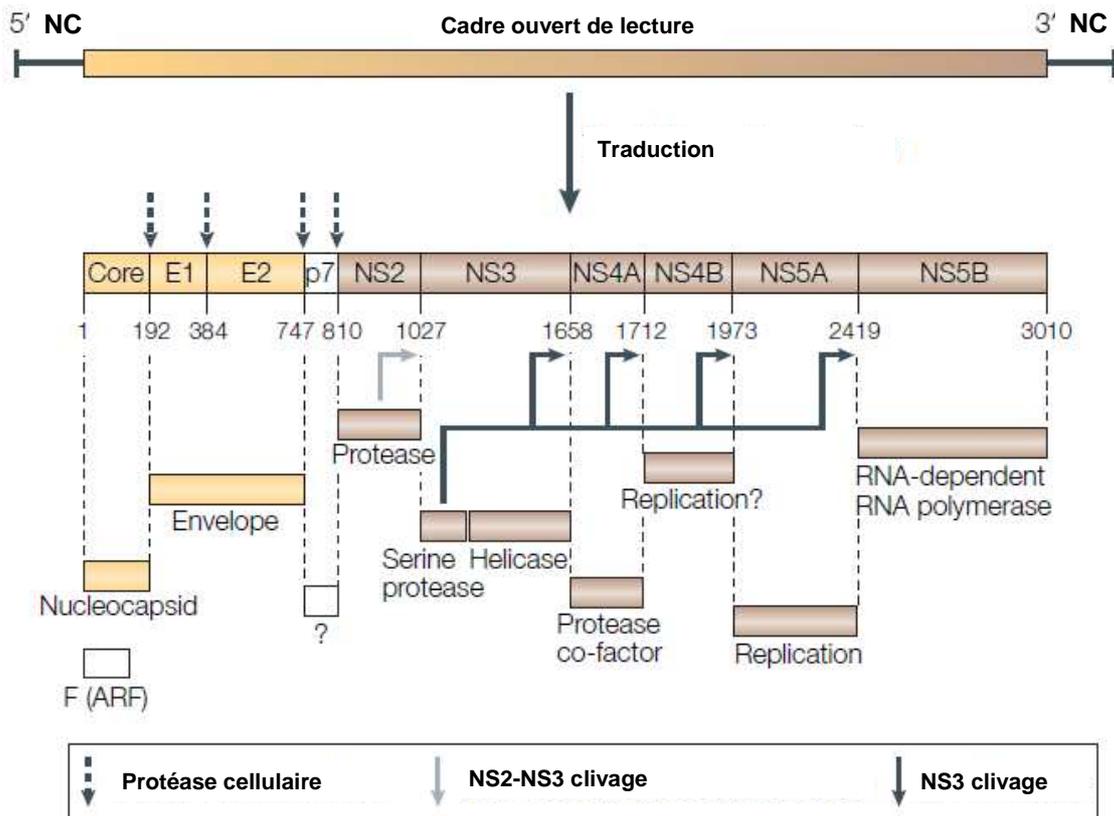


Figure 14 : Représentation schématique du génome du VHC et de la traduction de ses protéines (adapté de [276]). L'ARN simple brin (+) de 9,6 kb est traduit en une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés. Pendant et après la traduction, des protéases cellulaires (flèches en pointillées) et virales (NS2 et NS3, flèches pleines grises et bleues) clivent la polyprotéine en dix protéines aux activités variées indiquées sous chacune d'elle. Des protéines alternatives, F (ARFP), issues de la transcription dans un cadre de lecture décalé sont également produites par le virus. On distingue en jaune les protéines structurales, en marron les protéines non structurales et en blanc les protéines aux activités imprécises. NC : non codantes, ARF : alternative reading frame

d'enveloppe contre différents génotypes et l'étude des récepteurs d'entrée du virus. En 2005, la mise en place d'un système de production *in vitro* de particules virales infectieuses (HCVcc) capables d'infecter des hépatocytes humains en culture cellulaire ainsi que le chimpanzé, a été une nouvelle avancée majeure [364]. Ce modèle a l'avantage d'avoir la structure native du VHC car il est issu d'un isolat viral naturel. En revanche, il n'est représentatif que d'un seul génotype viral. Ce système est particulièrement intéressant pour étudier le cycle cellulaire complet du virus et de nouvelles stratégies anti-virales.

Grâce à ces systèmes d'étude, il a été montré que des patients infectés qui résolvent spontanément l'infection développent précocement des titres élevés d'anticorps neutralisants (AcN) à spectre large dirigés contre les protéines structurales E1 et E2 [257]. Une autre étude montre que la présence d'AcN est inversement proportionnelle à la réplication virale chez les patients qui contrôlent leur infection, prouvant l'existence d'une réponse humorale efficace lors de l'infection naturelle [190]. Ces données encourageantes expliquent les efforts mis en place pour développer un vaccin préventif et thérapeutique induisant des AcN contre les protéines d'enveloppe du virus [145].

Cependant, dans une grande majorité des patients, l'infection au VHC est persistante en présence d'une réponse humorale ciblant différents épitopes des protéines d'enveloppe, suggérant que la réponse humorale seule ne permettrait pas la résolution à l'infection. Il semblerait, entre autre, qu'en retardant l'apparition des Ig après l'infection, le virus limite en partie l'efficacité de la réponse humorale [201]. Dans ce sens, il a été montré chez un porteur chronique suivi durant 30 années, que les AcN dirigés contre les protéines d'enveloppe apparaissent toujours avec un délai par rapport aux mutants d'échappements expliquant leur inefficacité [363]. Il semble que le virus ait de son côté des caractéristiques qui lui permettent de contourner les défenses humorales. Il se lie par exemple aux lipoprotéines de haute densité. Cette interaction masquerait les épitopes du virus empêchant d'une part les anticorps de le reconnaître, et faciliterait d'autre part son entrée dans les hépatocytes en profitant du passage des HDL par l'intermédiaire du récepteur SR-B1 et des récepteurs aux lipoprotéines [86]. Une autre étude rapporte qu'il existerait, chez le porteur chronique humain, des anticorps non neutralisants dirigés contre un épitope de la protéine E2 du virus capables d'inhiber les activités neutralisantes des anticorps circulants dirigés contre un second épitope de la protéine [386].

En conclusion, différents anticorps dirigés contre les protéines structurales (et non structurales [384]) du VHC sont détectés pendant l'infection virale bien que leur rôle dans l'évolution de l'hépatite C reste mal connu. Les récentes avancées dans les modèles

d'études devraient nous fournir des informations importantes sur le rôle de la réponse humorale dans l'évolution de l'infection.

b. Réponses cellulaires

Il est admis de façon relativement consensuelle que le contrôle et la résolution de l'infection par le VHC implique une réponse immunitaire cellulaire T CD4+ et CD8+ forte, durable et dirigée contre plusieurs épitopes notamment contenus dans les protéines non structurales [306]. En effet, chez les patients qui vont résoudre au stade de la phase aiguë de l'infection, il est détecté une réponse Th1 forte caractérisée par la sécrétion de grandes quantités d'IFN γ dans le foie et la présence précoce de lymphocytes T CD4+ auxiliaires et CD8+ cytotoxiques à la fois dans le sang et au niveau du foie. De plus, la présence de T CD4+ reconnaissant un grand nombre d'épitopes restreints CMH II semble être particulièrement importante. En effet, une étude récente a montré que la baisse du taux de T CD4+ dans le sang d'un patient qui contrôle son infection est corrélée avec la remontée de la charge virale, même en présence de T CD8+ sécréteurs d'IFN γ périphériques [374]. Dans cette étude, la mise en place de réponses Th1 dirigées contre les protéines non structurales 3 et 4 est associée au contrôle de la réplication virale. Enfin chez les résolveurs, les réponses T CD8+ sont dirigées contre plusieurs épitopes CMH I et capables de développer des réponses fortes.

A l'opposé, il est admis que la perte des réponses T CD4+ prolifératives au cours de la phase aiguë est prédictive de la persistance virale chez les patients. Cette absence de réponse auxiliaire serait une explication à l'origine de l'efficacité limitée des réponses T CD8+ chez les porteurs chroniques. De plus, de nombreux mécanismes favoriseraient la persistance virale via l'inhibition des réponses immunes efficaces pour la résolution, et notamment les T CD4+ et CD8+ ont de nombreux défauts et les réponses ont globalement un profil Th2. Ainsi par exemple, il est observé que les T CD8+ sécrètent de l'IL-10, que la fréquence des T CD4+ régulateurs est plus élevée que chez les résolveurs et que les réponses sont dirigées vers un nombre restreint d'épitopes CMH I [306]. En effet, le nombre

d'épitopes ciblés est réduit de façon qualitative (l'intensité des réponses est réduite) et quantitative (dirigé contre moins de protéines) chez les porteurs chroniques comparé aux répondeurs spontanés [91]. Il a aussi été rapporté que les T CD8+ du foie des porteurs chroniques exprimeraient fortement deux marqueurs « suppresseurs » des réponses T, PD-1 (programmed cell death-1) et CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4). Le blocage de ces deux récepteurs permet de restaurer la fonctionnalité pro-Th1 des T CD8+ (sécrétion d'IFN γ et de TNF α) [231]. L'anergie des cellules T est aussi proposée comme un mécanisme de persistance virale chez les porteurs chroniques. Il a été montré que ces derniers ont des taux supérieurs de T régulateurs (Treg, phénotype CD4+CD25+) comparé aux résolveurs et que ces Treg créent un environnement défavorable pour les réponses cellulaires par la production d'IL-10 et de TGF- β aux activités régulatrices inhibitrices [49]. Enfin, et en amont des réponses adaptatives, des dysfonctionnements de la réponse innée pourraient induire une altération des réponses T CD4+ et CD8+ chez les porteurs chroniques dès le début de l'infection. Par exemple, bien qu'encore controversée, l'efficacité des fonctions allostimulatrices des CD en culture de porteurs chroniques serait altérée par rapport à celle d'individus sains expliquant l'efficacité limitée de la réponse innée [91].

En résumé, la perte des réponses T CD4+ durant la phase d'infection aiguë semble associée à l'évolution vers la chronicité et limite sans doute le développement d'une réponse T CD8+ efficace (figure 15). De plus, les réponses qui se développent chez les porteurs chroniques apparaissent défectueuses, aidant la persistance virale.

c. La protéine non structurale 3 (NS3)

La protéine NS3 possède à la fois une activité sérine protéase et une activité ARN hélicase. Il a été montré que la résolution de l'infection est souvent associée à l'induction de réponses périphériques T CD4+ et CD8+ fortes et maintenues, dirigées contre NS3 [313]. Ainsi, une étude sur 10 patients ayant résolu spontanément leur infection montre qu'ils développent tous des réponses fortes et multispécifiques T CD4+ contre des peptides de NS3 en périphérie, et 6 d'entre-eux présentent aussi des réponses T CD8+ spécifiques

[373]. La protéine non structurale 3 est donc une cible privilégiée dans les études vaccinales et est incluse dans de nombreux candidats vaccinaux en essais préclinique et clinique [325]. Parmi les candidats les plus avancés en essais cliniques, on peut citer à titre d'exemple un

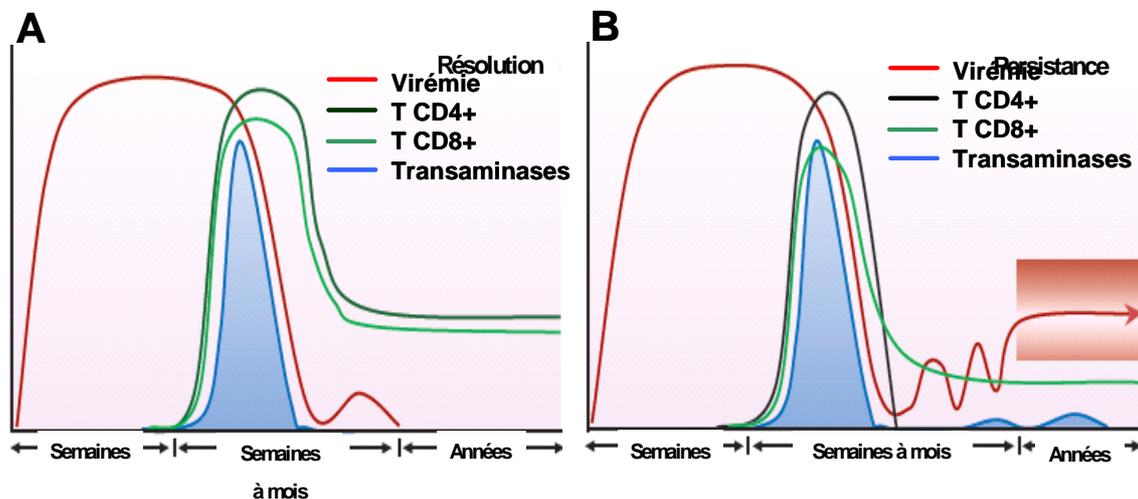


Figure 15 : Représentation schématique des réponses immunes adaptatives au cours de l'infection par le VHC (d'après [42]). Les évolutions de la virémie (courbe rouge), des réponses T CD4+ (courbe noire), des réponses T CD8+ (courbe verte) et des transaminases du sérum (marqueur des dommages hépatiques, courbe pleine bleue) sont indiquées de façon schématique pour des patients évoluant vers la résolution (A) et vers la persistance virale (B) en fonction du temps. La zone rouge indique la variabilité de la charge virale détectable entre individus.

vaccin à ADN recombinant (code pour les protéines NS3-NS4, phase I/II, ChronVac-C®, Tripep-Inovio), une levure recombinante (exprime les protéines NS3 et Core, phase II, GI-5005, Globelmmune) et un vaccin poxvirus (code pour les protéines NS3-NS4 et NS5B, souche MVA, phase I, TG4040, Transgene). Dans nos travaux de thèse, nous avons utilisé la protéine NS3 en tant qu'antigène viral modèle pour l'induction de réponses humorales (les anticorps anti-NS3 présents durant l'infection naturelle n'ont pas de rôle physiologique mais sont indicateurs de l'infection) et cellulaires.

B. Le virus de l'hépatite B (VHB)

1. Epidémiologie et structure du virus

Les infections par le virus de l'hépatite B touchent environ 2 milliards d'individus à travers le monde. Parmi eux, plus de 350 millions de personnes sont infectées chroniquement et le taux de mortalité est estimé à 1 million d'individus par an. On recense chaque année 4,5 millions de nouvelles contaminations [377]. Chez l'adulte 15% des patients infectés vont devenir porteurs chroniques, au contraire des jeunes sujets infectés par transmission materno-fœtale et en période infantile (jusqu'à 2 ans) qui évolueront vers la chronicité dans 90% des cas. Dans la population infectée chroniquement, 20% à 40% des personnes développeront une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire sur une période de 30 à 50 ans. On attribue 53% des cancers du foie toutes étiologies confondues et 5% à 10% des cas de transplantation hépatique aux conséquences de l'infection par le VHB [95]. La vaccination préventive, basée sur trois injections de la protéine recombinante de surface du virus (HBsAg) adsorbé sur alun (e. g. vaccins Engerix B®, GSK, vaccin Genhevac B®, Merck, ...), est assez efficace bien que l'on rapporte 5% à 10% de sujets dont le taux d'anticorps ne dépasse pas le seuil considéré comme protecteur (*i. e.* 10UI/L) [189]. Pour les porteurs chroniques, il existe un traitement à base d'IFN α pégylé qui est efficace dans 30% à 40% des cas si l'on estime l'efficacité par la séroconversion à HBe (voir plus loin) et la détection de l'ADN viral sérique à un taux inférieur à 20000 copies/mL six mois après traitement. Cependant, cette intervention est totalement curative dans seulement 3-4% des cas un an après traitement et les effets secondaires limitent généralement son utilisation [252]. Il existe à côté de cela un traitement non curatif à base d'analogues de nucléosides (lamuvidine, telbivudine, entecavir, adefovir) qui inhibent la réplication du virus, cependant le virus réapparaît souvent dès l'arrêt du traitement expliquant la prise médicamenteuse à vie. En effet, même sous traitement, le virus persiste par l'intermédiaire de son ADNccc (ADN circulaire et clos de façon covalente présent dans le noyau des cellules infectées) car les analogues de nucléosides n'ont aucun effet sur lui. De plus, ce traitement conduit à la

sélection de mutants de résistance (70% de mutants d'échappement à 5 ans avec la lamuvidine par exemple) [95].

Le virus se transmet par contacts avec des fluides corporels, majoritairement le sang, et plus modérément par la salive, les sécrétions séminales ou vaginales. Dans les régions faiblement endémiques (pays développés), la transmission est en grande partie liée à l'utilisation de seringues usagées, de matériel médicaux souillés ou se fait par contacts intrafamiliaux. Le mode de transmission majeur dans les zones fortement endémiques (pays en voie de développement) est le passage mère-enfant (vertical).

Le virus de l'hépatite B, découvert en 1966, est un virus enveloppé de la famille des *hepadnaviridae* contenant un ADN partiellement double brin de 3200 nucléotides. Il a un tropisme pour les cellules du foie et est capable d'infecter jusqu'à 95% des hépatocytes d'un individu. Le génome possède 4 gènes principaux codés par l'intermédiaire de différents cadres de lecture ouverts chevauchants (figure 16). Ces gènes codent pour une polymérase, une protéine de capsid (HBcAg), un antigène e contenant une partie de la capsid (HBeAg), une protéine de surface (HBsAg) dont 3 formes existent (small (S), medium (S+preS2) et large (S+preS2+preS1)) et une protéine aux propriétés oncogènes (HBxAg). Contrairement au VHC, le taux de mutation est faible (1 mutation pour 100,000 bases / an contre 1 pour 1000 pour le VHC) et il existe 8 génotypes qui divergent au plus de 8% les uns des autres [276].

2. Corrélats de la protection contre le VHB

a. Réponses humorales

Chez les patients qui éliminent spontanément le virus durant la phase aiguë (s'étend sur les 6 mois suivant l'infection), l'un des premiers marqueurs décelables est la présence des anticorps anti-HBc de type IgM. Ils apparaissent environ 5 semaines après contamination mais n'ont pas d'activités neutralisantes connues [54]. Quatre à 5 mois après, les anticorps anti-HBe et les anticorps neutralisants anti-HBs sont détectables et sont le signe de l'élimination virale et de la résolution du patient et protègent donc de la réinfection.

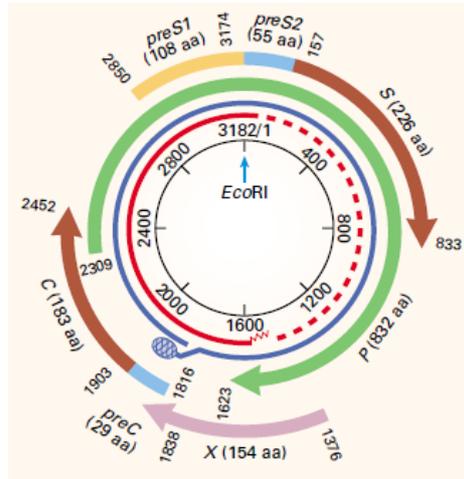


Figure 16 : Représentation schématique du génome du VHB et de ses protéines (d'après [192]). L'ADN viral est partiellement double brin (cercles rouge et bleu) et contient environ 3,2 kb. Il code pour 4 protéines (flèches externes épaisses) à partir de cadres de lecture chevauchants : la polymérase (P), la protéine X (X), la protéine de capsid (preC + C) et la protéine d'enveloppe (preS1 + preS2 + S). La taille en acides aminés de chaque protéine et leur position sur le génome sont indiquées entre parenthèses et sur les flèches externes, respectivement.

Au contraire, les porteurs chroniques développent tardivement des anticorps anti-HBc et anti-HBe, et aucun anticorps anti-HBs [54]. Au niveau expérimental, ces résultats sont corroborés par la démonstration du pouvoir neutralisant des anticorps anti-HBs responsables du contrôle de l'infection chez le chimpanzé [169]. La vaccination préventive cherche donc à induire une réponse humorale neutralisante car elle confère la protection contre l'infection.

b. Réponses cellulaires

Chez les patients en phase aiguë qui élimineront le virus, les réponses cellulaires spécifiques du VHB sont détectées dans le sang au moment où la concentration en ADN viral est à son maximum (environ 5 semaines après l'infection) et persistent après l'élimination du virus. Les réponses sont de type Th1 caractérisées par la présence de lymphocytes T CD4+ sécréteurs d'IFN γ majoritairement dirigés contre des épitopes de la capsid (HBcAg). En effet, ces réponses T précèdent la séroconversion HBe, signe de la chute de la virémie [34], et leur transfert adoptif chez des patients infectés chroniquement

permet la résolution de la maladie [186]. Les réponses T CD8+ spécifiques, dont le maintien est assuré par les T CD4+, sont dirigées contre les protéines de la capsid, de l'enveloppe et de la polymérase et induisent la sécrétion des cytokines aux activités anti-virales (IFN γ et TNF α). Les T CD8+ semblent être séquestrés dans le foie [318] et sont indispensables pour résoudre l'infection de phase aiguë. En effet, leur déplétion entraîne la persistance virale chez le chimpanzé [336]. Enfin, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ agissent de façon séquentielle par une activité non ciblée au niveau hépatique (*i. e.* action locale des cytokines) puis ciblée (*i. e.* lyse cellulaire spécifique), permettant de limiter les effets cytolytiques [54].

Les réponses cellulaires T CD4+ et CD8+ décrites précédemment chez les répondeurs spontanés sont diminuées voire absentes chez les patients qui progressent vers la chronicité [34]. De plus, il semble que la coordination des réponses T soit d'une importance majeure dans la résolution. En effet, une étude montre que l'évolution vers la chronicité chez un patient co-infecté VHC-VHB, est caractérisée par une absence en périphérie de réponse T CD4+, et ce, même en présence d'une réponse T CD8+ fonctionnelle détectée par ELISpot mais dirigée contre un répertoire d'épitopes non dominants [345]. La présence virale semble également influencer l'évolution vers la chronicité car il est montré que le maintien des activités protectrices des LT CD8+ (*i. e.* activités de prolifération et fonctions effectrices) est possible avec un niveau de réplication virale faible ($<10^7$ UI/mL) [371]. Bien que controversées, certaines études reportent un plus grand nombre de lymphocytes T régulateurs circulants et une augmentation de l'expression du marqueur PD-1 à la surface des LT CD8+ spécifiques du VHB dans le sang chez les porteurs chroniques [248]. Ces expressions sont inversement corrélées avec les activités effectrices des LT CD8+ [54].

c. La protéine de surface (HBsAg)

Durant l'infection naturelle, les anticorps anti-HBs sont produits tôt mais ne sont pas détectables car ils lient les antigènes de surface produits en excès pendant la réplication

virale précoce. Ces anticorps sont neutralisants et suffisants pour induire la protection chez les individus, c'est pour cela qu'HBsAg est incluse dans les vaccins préventifs depuis 1982 et permet de conférer une immunité à vie. Cette protéine est également la cible de réponses cellulaires chez certains patients en phase aiguë et deux épitopes cibles de réponses T CD8+ semblent avoir été identifiés dans HBsAg (Env 183-191 et Env 335-343) [34]. Cette protéine sera utilisée en tant qu'antigène modèle dans nos expérimentations pour caractériser la capacité de nos adjuvants LPC à induire des réponses humorales spécifiques.

C. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

1. Epidémiologie et structure du virus

Le virus de l'immunodéficience humaine est l'un des trois pathogènes les plus meurtriers (avec *Plasmodium falciparum* et *Mycobacterium tuberculosis*), tuant près de 2 millions de personnes par an dont près de 15% sont des enfants. En 2007, 33 millions de personnes vivaient infectées par le VIH et 2,7 millions de nouveaux cas ont été recensés (WHO, 2007). Deux tiers des personnes contaminées vivent dans les pays de l'Afrique subsaharienne. Le virus conduit au développement d'une maladie, le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise), qui affaiblit considérablement les défenses immunitaires de l'hôte et entraîne une susceptibilité exacerbée aux maladies opportunistes. Préférentiellement, le VIH infecte les lymphocytes T effecteurs et mémoires par l'intermédiaire des récepteurs CD4 et CCR5 [125]. Il se passe 5 à 10 ans avant que le patient n'évolue vers le SIDA s'il n'est pas traité, 15 ans et plus s'il suit un traitement. Bien que découvert en 1983, il n'existe toujours pas de vaccin contre ce virus. Le traitement actuel repose sur l'utilisation de différents anti-rétroviraux (ART, antiretroviral treatment) utilisés en combinaisons qui ont permis depuis 1996 de prolonger avec succès la durée de vie des patients. Cependant, ce traitement est coûteux, n'est pas curatif, et doit donc être maintenu à vie pour éviter toute résurgence virale et semble être à l'origine de complications

médicales telles que des maladies cardiaques et du diabète [278]. Les anti-rétroviraux inhibent les enzymes du virus (transcriptase inverse, protéase, intégrase) et / ou l'empêchent d'infecter ses cibles cellulaires en bloquant l'attachement du virus sur les récepteurs ou la fusion des membranes virales et cellulaires [316]. La transmission horizontale du VIH se fait par le sang, les liquides séminaux – vaginaux, le lait maternel, et la transmission verticale a lieu pendant la grossesse ou à la naissance. Les seuls moyens efficaces de prévention restent l'utilisation systématique de préservatifs, le contrôle des produits sanguins et l'utilisation de matériels médicaux et de seringues stériles.

Le VIH est un rétrovirus enveloppé du genre des *lentivirus* ayant 2 exemplaires d'un ARN simple brin. Ce génome code pour 9 gènes (gag, pol, env, vif, vpr, tat, rev, vpu, nef, vpx) et produit 19 protéines dont des glycoprotéines de surface (gp41, gp120), des protéines de structure (e. g. p17, p24, p6, p7 ...) ou des enzymes (transcriptase inverse, intégrase, protéase) [62]. L'une des principales difficultés pour éliminer ce virus réside dans sa grande variabilité génétique. Elle est en grande partie due aux erreurs commises par la polymérase qui ne possède pas d'activité de relecture et par la sélection de mutants consécutive aux traitements anti-rétroviraux. On compte 2 types de virus (VIH-1 et 2), 3 sous types (M, N et O), de nombreuses sous-classes (ou clades) et des quasi-espèces dans chaque individu infecté. Le taux de mortalité des patients infectés avec la souche VIH-1 est plus élevé que celui des patients infectés avec la souche VIH-2 [296]. Enfin, 2% à 5% des patients infectés avec le VIH-1 contrôlent naturellement la réplication virale sur une période d'au moins 10 ans après l'infection, on parle de non progressseurs à long terme. Il a été montré que ces personnes ont préférentiellement un génotype HLA-B*57 ou HLA-B*27 [138].

2. Corrélats de protection

a. Réponse humorale

Lors de l'infection naturelle par le VIH, les patients produisent des anticorps dirigés contre les protéines de l'enveloppe (gp41, gp120) mais ils sont non fonctionnels, capables de fixer les protéines virales mais n'inhibant pas l'infection. Cependant, une faible proportion

de ces anticorps a des activités neutralisantes et ces AcN sont sur-représentés chez les non progresseurs à long terme [259]. De plus, il a été montré que le transfert passif d'anticorps neutralisants anti-gp41 et anti-gp120 protège des macaques d'une épreuve par voie vaginale démontrant l'utilité de ces anticorps dans la protection contre l'infection [208]. Pourtant à l'heure actuelle, aucun essai vaccinal n'a permis d'induire des AcN [22]. Les raisons de cet échec sont multiples et trois exemples sont présentés ici. Tout d'abord, les glycoprotéines d'enveloppe forment des structures trimériques capables de masquer les épitopes aux anticorps. De plus, les régions exposées aux anticorps sont généralement constituées de domaines hyper variables qui empêchent l'hôte de développer une réponse humorale efficace. Enfin, l'attachement du virus sur les T CD4+ se fait par la gp120. Cette interaction entraîne un remodelage de la structure de la gp41 qui fixe alors un co-récepteur de liaison, CCR5. Il est donc difficile de mettre au point un anticorps inhibiteur de l'interaction gp41-CCR5 car il devrait agir dans un intervalle de temps court après la liaison de la gp120 sur le récepteur CD4 et avant la fusion membranaire avec la cible cellulaire.

De son côté, le virus est aussi responsable de l'induction de défauts dans la mise en place des réponses humorales [220]. Par l'intermédiaire de la protéine nef, le virus inhibe la sécrétion d'IgA par les lymphocytes B qui sont responsables de la protection humorale au niveau des muqueuses, sites d'entrée privilégiés du virus. Durant l'infection chronique, le VIH est aussi capable de réduire la durée de vie des cellules productrices d'anticorps et est responsable de l'épuisement des LB. Ces derniers sont peu prolifératifs, ont des récepteurs d'adressage aux ganglions altérés et expriment des récepteurs inhibiteurs (e. g. PD-1, CTLA-4 ...).

Il semble donc que les réponses humorales dirigées contre les protéines d'enveloppe, et notamment contre la gp120, aient un rôle prépondérant pour la protection contre l'infection [392]. De nombreuses préparations vaccinales font ainsi appel à la protéine d'enveloppe gp120 pour l'induction d'anticorps neutralisants [245] bien que les essais conduits aient été décevants. Cette protéine a été utilisée comme antigène modèle dans nos expérimentations dans le but de caractériser l'induction de réponses humorales spécifiques.

b. Réponse cellulaire

Il est généralement admis qu'en plus d'une réponse humorale aux activités cross-neutralisantes, la protection contre l'infection passe par l'induction d'une réponse CD4+ auxiliaire et d'une réponse cytotoxique T large et polyfonctionnelle ; présentes à la fois en périphérie et au niveau des muqueuses [139].

Le VIH infecte préférentiellement les T CD4+ des épithéliums des muqueuses et est capable de rapidement dépléter ce pool de T (4 à 10 jours) créant une brèche dans cette barrière protectrice. Ceci entraîne une activation globale des T CD4+ de l'organisme par entrée d'antigènes bactériens et augmente ainsi le nombre de cellules cibles pour le virus et donc sa progression [136]. Ainsi, la prévention de la perte des T CD4+ des muqueuses apparaît nécessaire pour la résolution de l'infection. A côté de cela, il a été montré qu'une réduction de la virémie durant la phase aiguë d'infection pouvait être associée avec l'apparition de CTL spécifiques du virus mettant en avant le rôle des T CD8+ fonctionnels. L'importance de ces T CD8+ a aussi été montrée par des expériences chez le singe rhésus où le contrôle de l'infection est perdu lors de la déplétion de ces cellules [297]. Enfin, le haut degré de mutation induit par le virus entraîne des changements fréquents des épitopes reconnus par les cellules T. Ainsi, il apparaît nécessaire que les réponses T CD4+ et CD8+ soient dirigées contre un spectre large d'épitopes afin de minimiser les mutants d'échappements [22].

Il a été mis en évidence que les réponses T CD8+ dirigées contre les épitopes des protéines du gène gag corrélaient avec une baisse de la virémie chez les patients infectés, naïfs de traitement [166] et que le contrôle de la réplication virale chez des patients infectés par le VIH-2 fait intervenir des lymphocytes T CD4+ producteurs d'IL-2 et d'IFN γ , capables de proliférer après stimulation gag *in vitro* [93]. Le ciblage des protéines du gène gag semble donc être privilégié bien que les autres gènes soient également des cibles prometteuses [136]. De leur côté, les réponses T CD8+ des patients non progresseurs sont polyfonctionnelles produisant de l'IFN γ , de l'IL-2, du MIP- 1 β , du TNF et exprimant CD107 (marqueur de l'activité de dégranulation des LT CD8+) [36]. Enfin, à l'image de ce qui peut

être détecté chez des porteurs chroniques du VHC et du VHB, les non progresseurs présenteraient des taux d'expression faibles de PD-1L à la surface des cellules dendritiques comparés à ceux des patients évoluant vers le SIDA ou déjà en phase de SIDA qui surexpriment ce marqueur et chez qui ces cellules peuvent donc être altérées [367]. De plus, chez les patients qui évoluent vers le SIDA, l'expression augmentée de PD-1 à la surface des LT CD4+ et CD8+ corrèle positivement avec la charge virale dans le plasma pouvant fournir une explication à la difficulté du contrôle du virus chez les patients chroniques.

En résumé, et avec la difficulté de développer un vaccin induisant des anticorps neutralisants contre les protéines d'enveloppe de diverses souches du VIH, les efforts semblent également se diriger vers l'induction de réponses cellulaires, et plus particulièrement T CD8+ qui apparaissent impliquées dans la protection contre la progression du virus chez l'homme.

Résultats

I) Objectifs des travaux de thèse

Le développement de vaccins sous-unitaires prend aujourd'hui le pas sur les autres types de vaccins mais comme nous l'avons indiqué dans la première partie du mémoire, leur plus faible immunogénicité implique la mise au point de nouveaux adjuvants de vaccination.

L'équipe du Dr Lotteau a montré que la lysophosphatidylcholine contenue dans les lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées formées pendant la réponse de phase aiguë présentent des caractéristiques adjuvantes *in vitro* mais également *in vivo* chez la souris, permettant d'induire des réponses humorales, cellulaires et anti-tumorales contre des antigènes modèles [72] [253]. Cependant la LPC utilisée dans ces études est issue d'œuf de poule et représente un mélange hétérogène d'espèces moléculaires de LPC à la composition variable d'un lot à un autre et non définie entièrement. Ces raisons limitent le développement futur de ce composé au niveau clinique.

Utilisant ces résultats comme base de travail, mes travaux de thèse ont consisté à :

1/ identifier une ou des espèces moléculaires de LPC contenues dans la LPC d'œuf de poule présentant des activités adjuvantes *in vitro*,

2/ étudier l'aptitude de ces molécules criblées *in vitro* à induire chez la souris des réponses humorales et cellulaires contre des immunogènes viraux d'intérêt vaccinal dérivés du virus de l'hépatite C, du virus de l'hépatite B, du virus de l'immunodéficience humaine et du virus du papillome humain.

L'ensemble de ces données devait nous permettre de savoir si une espèce de LPC parfaitement caractérisée avait un intérêt pour être proposée comme adjuvant de vaccination et pour être développée en clinique.

II) Résultats principaux : Identification d'espèces moléculaires de lysophosphatidylcholine présentant des activités adjuvantes *in vitro* et *in vivo*

A. Caractérisation *in vitro*

1. Objectifs

L'objectif de cette première partie de thèse a consisté à identifier une ou des espèces moléculaires de lysophosphatidylcholine (LPC) conférant son pouvoir adjuvant *in vitro* à la LPC d'œuf de poule. Comme nous le présentons dans l'Article 1 (voir fin du chapitre), la LPC d'œuf de poule et la LPC de graines de soja (inactive *in vitro* sur le modèle de maturation de MoDC, Article 1, figure 1) sont des mélanges hétérogènes composés d'espèces moléculaires de lysophosphatidylcholine avec des index de saturation (18,4 pour la LPC d'œuf et 1,9 pour la LPC de soja) qui semblent indiquer que la présence d'insaturation est défavorable pour l'effet adjuvant. Ces informations nous ont guidés pour choisir les cinq espèces de LPC évaluées *in vitro* et nous avons sélectionné :

- la LPC C12 :0 : espèce saturée possédant la plus petite chaîne carbonée qui est protégée par le brevet couvrant l'utilisation des LPC comme adjuvants de vaccination (PCT/FR03/00741),

- la LPC C14 :0 : espèce saturée présente dans la LPC d'œuf de poule, bien que très faiblement représentée (0,3%),

- la LPC C16:0 : espèce saturée majoritaire dans la LPC d'œuf de poule (69%),

- la LPC C18:0 : espèce saturée fortement représentée dans la LPC d'œuf de poule (24,6%),

- la LPC C18 :1 : bien qu'insaturée cette espèce représente 3,4% de la LPC d'œuf de poule.

De plus, ces 5 espèces étaient disponibles commercialement sous forme synthétique.

2. Méthodes

La caractérisation du pouvoir adjuvant a été basée sur la capacité des LPC à permettre la différenciation de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains (MoDC), de monocytes en CD matures, sur une période de 6 jours en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Il s'agit d'un modèle consensuel pour identifier des composés adjuvants actifs, et dans mes travaux de thèse, nous avons suivi la modulation du phénotype, de la fonction et des sécrétions de cytokines et de chimiokines induites par les CD. L'équipe du Dr Lotteau a montré que les CD matures sont obtenues lorsque la LPC d'œuf de poule est ajoutée au 5^e jour de différenciation en cultures dépourvues de lipoprotéines, ces dernières inhibant l'activité de la LPC [72].

Dans ce modèle, le profil de maturation des CD a d'abord été évalué par l'analyse de l'expression de marqueurs de surface au 6^e jour. La différenciation correcte des monocytes en CD se distingue par la perte d'expression du CD14 (marqueur des monocytes) et l'apparition du marqueur CD1a (caractéristique des cellules présentatrices d'antigènes). Le degré de maturité de la CD est évalué par l'expression des marqueurs de maturation HLA-DR (CMH II) et CD83, et par l'expression des molécules de co-stimulation CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD40 et d'une molécule d'adhésion aux endothéliums et d'attache aux lymphocytes T durant la synapse immunologique, CD54 (ICAM 1). Dans un second temps, les surnageants de culture des CD ont été prélevés au 6^e jour afin de caractériser le profil de la réponse immune induite par les LPC grâce à l'analyse d'un panel varié de cytokines et chimiokines produites par les CD. Ainsi, des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α et IL-12p40) et anti-inflammatoire (IL-10) ont été dosées par ELISA. Les chimiokines MIP-1 β , MCP-1, IL-8 et IP-10 ont été dosées dans ces surnageants par une technique de cytométrie utilisant des billes de capture pour doser de multiples analytes (cytometric bead array test, CBA). Enfin, les CD matures sont connues pour activer la sécrétion de cytokines par des lymphocytes T (LT) allogéniques naïfs permettant d'apprécier le profil de la réponse immune

induite. Les CD récoltées au 6^e jour ont donc été mises en co-culture pendant 5 jours avec les LT allogéniques naïfs dans un test de réaction mixte leucocytaire (MLR) et les surnageants des cultures ont été analysés pour la présence d'une cytokine Th1 (IFN γ) et de cytokines pro-Th2 (IL-13 et IL-5) par CBA.

L'ensemble des données issues de ces tests *in vitro*, qui reflètent le pouvoir adjuvant des molécules testées sur les CD humaines, nous a permis de sélectionner des candidats présentant un potentiel adjuvant *in vivo*.

3. Résultats

La majeure partie de nos résultats *in vitro* est détaillée dans l'Article 1. En résumé, les études nous ont permis d'identifier deux espèces, la LPC C16:0 et la LPC C18:0, qui augmentent de façon nette l'expression de marqueurs de maturation (HLA-DR) et de co-stimulation (CD86, CD40) à la surface des CD (Article 1, figure 2). Nous avons ensuite cherché à déterminer la dose optimale pour la stimulation *in vitro* des MoDC (résultat non présenté dans l'Article 1). L'équipe du Dr Lotteau a montré que la LPC d'œuf de poule agit de façon optimale à 40 μ M pour différencier les monocytes humains en CD matures [72]. Nous avons voulu savoir si les LPC C16 :0 et C18 :0 identifiées ont également une activité maximale à 40 μ M ou déterminer, le cas échéant, la dose optimale avec ce test. Nous avons donc choisi de suivre l'expression de deux marqueurs classiquement augmentés à la surface des CD matures (*i. e.* CD86 et CD40) par cytométrie en flux dans une étude de dose-réponse allant de 20 μ M à 60 μ M. Nos contrôles négatifs incluent le PBS (tampon de reprise des LPC) et une espèce négative (LPC C18 :1) testée de 30 μ M à 50 μ M. La figure 1 montre que l'expression des marqueurs est augmentée à la surface des MoDC incubées en présence de 30, 40, 50 et 60 μ M de LPC C16 :0 ou C18 :0 par rapport aux cellules incubées avec le PBS. A 20 μ M l'expression des marqueurs est similaire entre le PBS et les LPC. Comme attendu, l'expression du CD86 et du CD40 par les MoDC incubées avec la LPC C18 :1 n'est pas non plus modifiée aux doses testées. Enfin, c'est à 40 μ M que l'augmentation de l'expression des deux marqueurs est la plus marquée pour les deux LPC

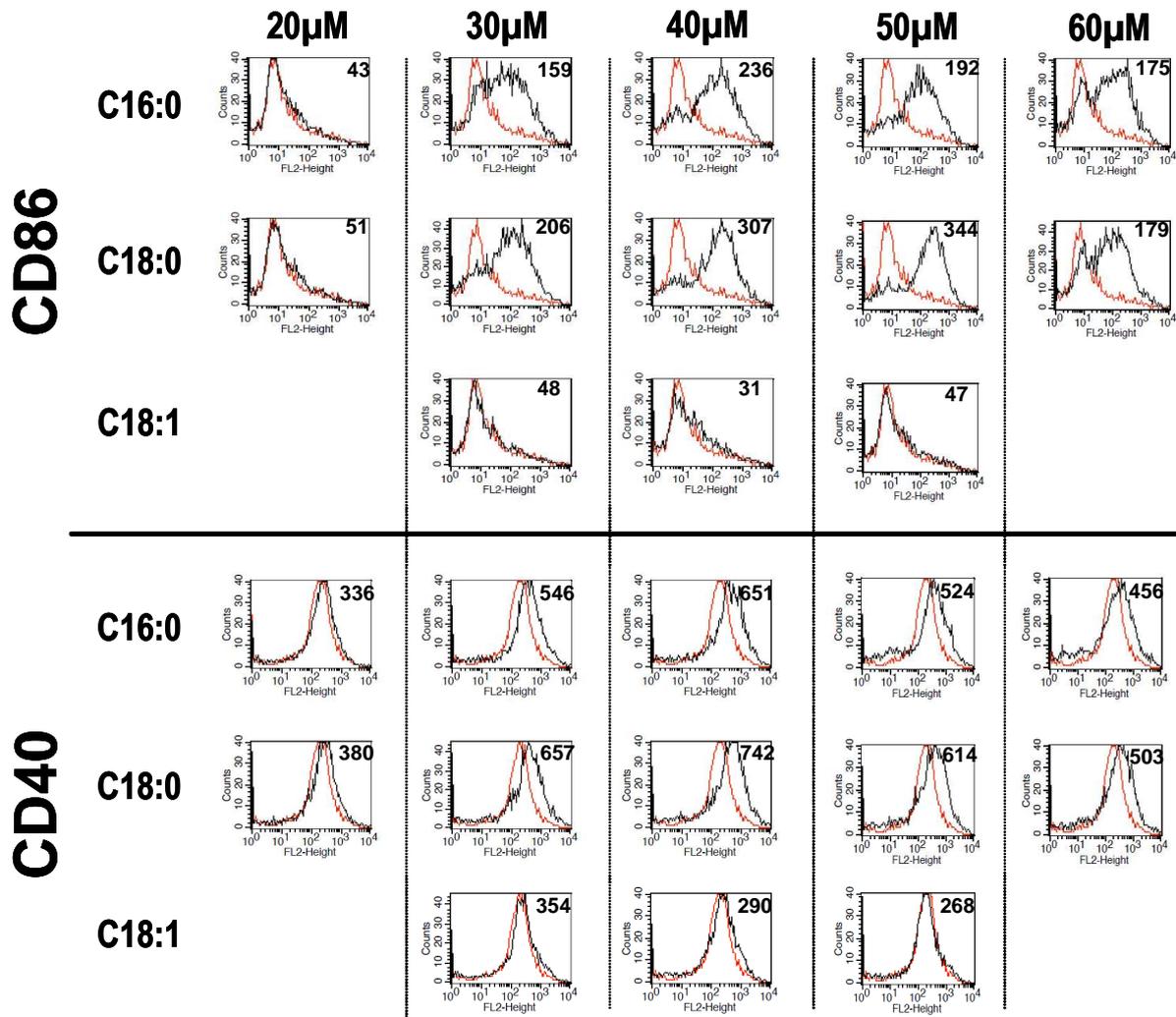


Figure 1 : Détermination de la dose optimale des LPC C16 :0 et C18 :0 pour induire *in vitro* la maturation de cellules dendritiques. L'expression des marqueurs de co-stimulation CD86 et CD40 à la surface de MoDC stimulées durant 24h, avec du PBS (tracé rouge) ou avec les LPC C16 :0, C18 :0 et C18 :1 (tracé noir), a été analysée par cytométrie de flux. Les LPC ont été testées à des doses allant de 20 à 60 μM (C16 :0 et C18 :0) ou de 30 à 50 μM (C18 :1). Les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence des LPC (tracés noirs) sont indiquées sur chaque graphique.

(voir les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence indiquées sur la figure 1). En résumé, ces résultats nous permettent de dire que l'activation des CD par les LPC C16 :0 et C18 :0 se fait préférentiellement dans une gamme de concentrations allant de 30 à 60 μM et de façon optimale à 40 μM , concentration qui a été utilisée par la suite.

Nous avons ensuite montré que les LPC C16 :0 et C18 :0 stimulent la sécrétion de chimiokines pro-Th1 (MCP-1, MIP-1 β , IL-8 et IP-10, Article 1, figure 3) dans les surnageants de culture, et ce, de manière toujours plus efficace que le mélange naturel d'œuf de poule dont elles sont issues (bien que les différences ne soient pas statistiquement significatives). En revanche, nous avons observé que les sécrétions de cytokines des CD évaluées par ELISA (TNF- α , IL-6, IL-10 et IL-12p40) ne sont pas significativement augmentées par les LPC alors qu'elles le sont avec par le contrôle positif (LPS, tableau 1). Finalement, l'aptitude

Tableau 1 : Valeurs moyennes des sécrétions de cytokines par les MoDC en présence de LPC. Les surnageants de culture des MoDC, stimulées durant les dernières 24h de différenciation par les molécules indiquées, ont été récoltés et la sécrétion de cytokines a été mesurée par ELISA. Les valeurs indiquent la moyenne et l'écart-type des sécrétions obtenues à partir de 3 donneurs testés séparément.

Conditions	Secretion Cytokines (pg/mL) (moyenne \pm e. c.)			
	TNF- α	IL-6	IL-10	IL-12p40
Contrôle Negatif (PBS)	128.04 \pm 34.32	257.06 \pm 147.98	76.52 \pm 22.11	24.18 \pm 11.20
Contrôle Positif (LPS)	3919 \pm 2887	3751 \pm 1331	384 \pm 106	11330 \pm 3550
LPC oeuf	162.71 \pm 35.45	255.11 \pm 87.70	72.89 \pm 30.35	47.07 \pm 21.14
LPC C16:0	148.99 \pm 22.35	273.54 \pm 143.98	73.26 \pm 19.35	43.44 \pm 20.56
LPC C18:0	176.71 \pm 48.22	287.79 \pm 135.63	71.38 \pm 21.88	51.59 \pm 37.83
LPC C18:1	128.13 \pm 28.99	276.34 \pm 140.16	78.50 \pm 24.95	22.82 \pm 6.57

des CD matures à stimuler la sécrétion de cytokines par des lymphocytes T allogéniques dans le test MLR (Article 1, figure 4) indique que la LPC C16:0 peut induire la différenciation de LT naïfs en LT Th1 caractérisés par des sécrétions d'IFN γ supérieures aux sécrétions d'IL-13 et d'IL-5 et proches de l'activité d'une faible dose de LPS (10 ng/mL) utilisée comme contrôle positif. La LPC C18:0 apparaît moins efficace pour induire l'activation des LT dans ce test, mais globalement les résultats du test MLR sont en corrélation avec le profil de sécrétions des chimiokines.

Dans leur ensemble, ces résultats montrent que les deux espèces moléculaires de LPC C16 :0 et C18 :0 ont des activités adjuvantes *in vitro* sur cellules humaines induisant des réponses Th1 et ont donc été choisies pour être évaluées *in vivo*.

B. Caractérisation *in vivo*

1. Objectifs et méthodes

Le but de cette partie du travail a été de confirmer chez l'animal le potentiel adjuvant des espèces de LPC C16 :0 et C18 :0 mis en évidence *in vitro*. Pour cela, nous avons tout d'abord cherché à caractériser le profil des cytokines induites par les LPC après injection des espèces individuelles chez l'animal. Nous avons également cherché à confirmer que les molécules de LPC C16 :0 et C18 :0 sont capables d'adjuvanter des protéines virales en induisant des réponses immunes spécifiques de ces protéines.

a. Profil des cytokines induites par les LPC

Dans un premier temps, nous avons voulu connaître le profil de la réponse immunitaire induite chez la souris après injection directe des espèces de LPC. Pour cela, nous avons choisi d'étudier les sécrétions de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , TNF α , IL-12p40), Th1 (IFN γ) et pro-Th2 (IL-5) après une injection intraveineuse (i. v.). Nous avons utilisé comme contrôles positifs trois activateurs puissants de l'immunité innée que sont le LPS, le CpG et le Poly I:C et qui activent, respectivement, les récepteurs TLR4, 9, et 3. Nous savons qu'ils induisent la sécrétion d'au moins 5 des cytokines testées après une injection i. v. [222;289]. Il n'y a pas de données pour l'induction d'IL-5 par ces produits dans ce modèle, mais nous avons choisi de conserver cette cytokine car nous pensons qu'elle est un bon indicateur du profil Th2. Diverses informations nous ont permis de définir pour ces trois contrôles positifs deux doses actives (10 et 25 μ g par souris) sans effet toxique majeur [243;332]. Enfin, nous avons déterminé trois temps de récolte des sera (2h, 4h et 12h après l'injection) estimant couvrir l'ensemble des sécrétions car, en effet, les cytokines TNF α , l'IL-6,

l'IL-1 β sont produites précocement (entre 1,5 et 4h) alors que l'IL-12p40 et l'IFN γ apparaissent plus tardivement (entre 8 et 24h) après l'injection des contrôles positifs utilisés [181;222].

b. Effet adjuvant de réponses immunes humorales

Dans un deuxième temps, les capacités adjuvantes des deux composés ont été évaluées dans des tests d'induction de réponses humorales contre deux antigènes viraux chez les souris BALB/c.

La lignée murine BALB/c a été choisie car il s'agit de la lignée de référence pour l'étude des réponses humorales et car elle permet, contrairement aux C57BL/6 [214], l'analyse des sous-types d'immunoglobulines (Ig), IgG2a et IgG1, indicateurs du profil de la réponse induite, respectivement pro-Th1 et pro-Th2. Pour toutes les injections d'immunogènes, la voie sous-cutanée (s. c.) a été privilégiée pour se rapprocher de ce qui pourrait être réalisé en clinique chez l'homme. A l'origine, l'équipe du Dr Lotteau a montré l'activité adjuvante de la LPC d'œuf de poule sur l'induction de réponses humorales contre l'antigène modèle HEL (lysozyme du blanc d'œuf de poule), dans un protocole où elle était injectée à raison de 500 nmoles par souris. Nous nous sommes donc appuyés sur ce résultat et avons débuté nos expérimentations avec cette dose. Etant donné qu'un atout important d'un adjuvant est d'être efficace à une dose minimale, nous avons initié des protocoles en testant des doses décroissantes, de 500 à 75 nmoles et si les résultats le justifiaient, de 75 à 12,5 nmoles.

Le premier antigène viral étudié a été la protéine non structurale 3, domaine hélicase (NS3 hel), qui est la cible de réponses cellulaires qui corrélient en partie avec la résolution de l'infection chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C. Au cours de l'infection, les patients développent aussi des anticorps contre cette protéine qui sont donc des marqueurs d'infection (Introduction, chapitre IV). Nous avons tout d'abord étudié la capacité des LPC à induire des réponses humorales spécifiques de NS3 puis nous nous sommes intéressés au versant cellulaire de cette réponse (Résultats, chapitre III) C.1.a). En s'appuyant sur des

protocoles standards d'induction de réponses humorales et sur des expérimentations réalisées précédemment au laboratoire, il a été montré qu'après 3 injections de NS3 hel associée à la LPC C16 :0 ou C18 :0, des taux élevés d'anticorps spécifiques anti-NS3 hel sont induits (résultat non présenté). Dans cette étude de définition du schéma d'immunisation, la meilleure condition a été obtenue en associant la NS3 hel avec 250 nmoles de la LPC C18 :0. Cette dose et cette espèce de LPC ont donc été utilisées pour la mise en place du protocole d'immunisation avec le deuxième immunogène.

Le second antigène viral est la protéine de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg). Les réponses humorales dirigées contre l'HBsAg sont associées à la protection contre l'infection par le virus et participent à la résolution de l'infection aiguë. Cette protéine est donc un immunogène pertinent pour évaluer l'induction d'anticorps anti-HBsAg par des adjuvants. Une grande diversité de protocoles existe dans la littérature pour l'analyse des réponses humorales contre l'HBsAg chez la souris [165;196;204]. Dans notre laboratoire nous avons déterminé qu'après 2 injections de l'HBsAg nous obtenions une induction d'anticorps significative lorsque la protéine est associée à la LPC C18 :0 (250 nmoles) par rapport à l'injection de l'immunogène seul.

2. Résultats

a. Profil des cytokines induites par les LPC

Les résultats de l'analyse des cytokines induites après l'administration des adjuvants indiquent que l'injection i. v. de la LPC C16 :0 et de la LPC C18 :0 chez les souris déclenche une sécrétion rapide d'IL-6 ($\leq 2h$) et plus tardive d'IL-5 (entre 4 à 12h) dans les sera analysés par une technologie d'analyse multiplexe (Article 1, figure 5). Cette cinétique apparaît différente de celles observées avec les contrôles positifs (LPS, CpG, Poly I:C) et suggère que les LPC induisent un état inflammatoire transitoire et modéré. Ce premier résultat est en faveur d'une activité adjuvante des LPC criblés *in vitro* et nous a permis d'envisager l'étude de leur capacité à induire des réponses immunes chez la souris.

b. Effet adjuvant de réponses immunes humorales

Dans le but de caractériser le potentiel adjuvant vis-à-vis de réponses humorales des LPC C16 :0 et C18 :0, nous avons réalisé des protocoles d'immunisation de souris BALB/c à l'aide de deux protéines modèles, la NS3 du VHC et l'HBsAg du VHB.

La protéine NS3 hélicase du virus de l'hépatite C. Les études ont d'abord été menées avec la LPC C16 :0 à des doses allant de 500 à 75 nmoles et ont montré que la LPC induit la sécrétion d'Ig spécifiques (Article 1, figure 7A). Ces productions sont significativement supérieures à celles induites par la protéine seule ($p < 0,05$) aux doses de 75 et 500 nmoles pour des dilutions sériques de 1/1000 à 1/25000, et sont similaires à celles obtenues avec l'adjuvant de référence alun. Aux doses 150 et 250 nmoles les sécrétions ne sont pas statistiquement significatives mais cela semble lié à une plus grande variabilité chez les souris de ces groupes (résultat non présenté). Nous avons ensuite évalué l'activité adjuvante de la LPC C16 :0 à des doses inférieures allant de 75 à 12,5 nmoles (Article 1, figure 7B). A ces doses, la LPC C16 :0 permet la production d'anticorps anti-NS3 hel à un niveau similaire ou inférieur à celle obtenue avec l'alun, qui est statistiquement supérieure comparée à la protéine NS3 hel seule ($p < 0,05$), et ce, jusqu'à la plus faible dose de 12,5 nmoles. Ces résultats sont donc encourageants de part la faible dose présentant encore un effet adjuvant et en raison de résultats proches de ceux avec l'alun.

Nous avons ensuite évalué l'association de la LPC C18 :0 avec la protéine NS3 hel et avons montré qu'aux doses de 500 à 75 nmoles, elle induisait une sécrétion significative d'Ig spécifiques dirigées contre la protéine NS3 hel (Article 1, figure 7C). Nous observons que l'effet adjuvant est statistiquement significatif aux doses les plus faibles testées (75 et 150 nmoles), et ce, jusqu'à la dilution 1/25000 pour 75 nmoles ($p < 0,05$). L'activité adjuvante de l'alun reste statistiquement supérieure aux autres conditions. Etant donné que le potentiel adjuvant est toujours visible aux faibles doses, nous avons continué notre étude à des doses allant de 75 à 12,5 nmoles (Article 1, figure 7D). Toutes les doses, jusqu'à une dilution sérique de 1/25000, ont un effet adjuvant significatif comparé à l'administration de la NS3 hel

seule ($p < 0,05$). De plus, la LPC C18 :0 est aussi efficace que l'alun. Nous avons également mis en évidence une différence statistique entre les sécrétions obtenues dans le groupe des souris injectées avec la dose de 50 nmoles par rapport à la dose de 12,5 nmoles, suggérant que la dose minimale efficace de LPC C18 :0 soit de 50 nmoles.

Nous nous sommes ensuite intéressés au profil de la réponse humorale induite. La figure 2 correspond à des données non présentées dans l'Article 1 et indique les productions

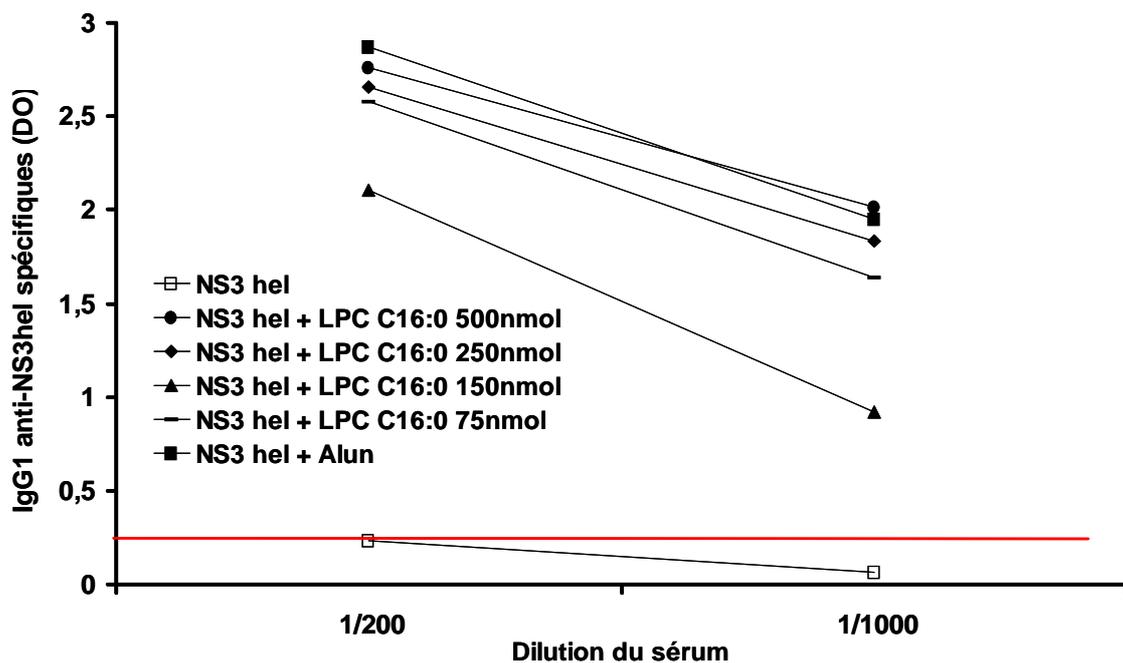


Figure 2 : Evaluation de l'effet adjuvant de la LPC C16 :0 sur les réponses humorales spécifiques contre la protéine NS3 hel. Des BALB/c (6 souris/groupe) ont été immunisées 3 fois à 3 semaines d'intervalle avec 1 μ g de NS3 hel en combinaison avec la LPC C16 :0 (500 à 75 nmoles). La présence d'Ig de types IgG1 et IgG2a anti-NS3 hel dans le sérum des souris, dilué au 1/200 et au 1/1000, est analysée 3 semaines après la dernière injection par ELISA (protocole en Annexe technique). Les médianes des groupes sont indiquées en valeur d'absorbance (DO) à 490 nm pour chaque condition testée. Seuil de positivité : 0,23.

des sous-types d'Ig des sera des animaux de l'expérience de l'Article 1, figure 6A (NS3 hel + LPC C16 :0 de 500 à 75 nmoles ou alun). Quel que soit le groupe testé (LPC ou alun), nous avons détecté une sécrétion d'IgG1 (figure 2) alors qu'aucune sécrétion d'IgG2a n'est détectable (seuil à 0,2 ; résultat non présenté). Nous avons obtenu des résultats similaires

en présence de la LPC C18 :0 (résultat non présenté). Ces informations indiquent clairement qu'en présence de LPC C16 :0, de LPC C18 :0 et d'alun, les Ig produites sont des IgG1 et qu'aucune IgG2a n'est détectée, indiquant une orientation préférentielle vers des réponses de type Th2.

La protéine HBsAg du virus de l'hépatite B. Nous avons ensuite évalué l'effet adjuvant des LPC C16 :0 et C18 :0 sur un second antigène viral d'intérêt vaccinal. L'adjuvantation de la protéine HBsAg par la LPC C16 :0 a d'abord été testée de 500 à 75 nmoles. La figure 3 présente les sécrétions obtenues dans les sera des animaux dilués au 1/3200, seule dilution à laquelle l'HBsAg n'induit pas à elle seule une sécrétion d'Ig

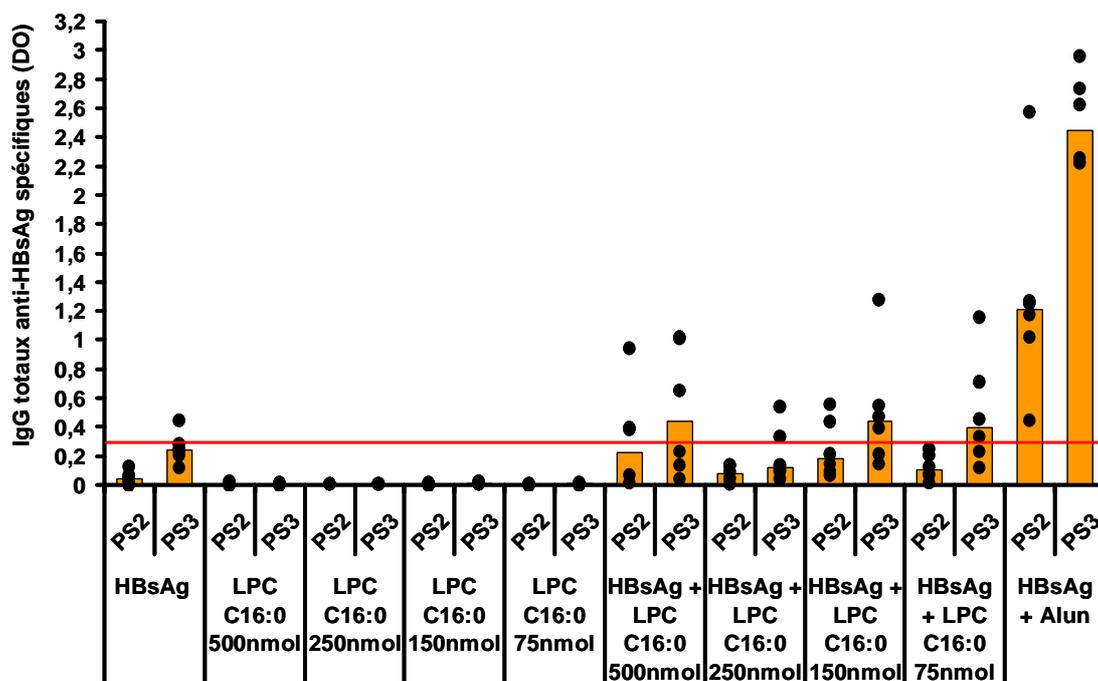


Figure 3 : Evaluation de l'effet adjuvant de la LPC C16 :0 sur les réponses humorales spécifiques contre l'HBsAg. Des BALB/c (6 souris/groupe) ont été immunisées 2 fois à 2 semaines d'intervalle avec 0.5 µg d'HBsAg en combinaison avec la LPC C16 :0 (500 à 75 nmoles). La présence d'Ig totales anti-HBsAg dans le sérum des souris est analysée 2 (PS2) et 6 (PS3) semaines après la dernière injection par ELISA (protocole en Annexe technique). Les médianes des groupes (barres oranges) et les valeurs individuelles de chaque souris (points noirs) sont indiquées en DO à 490 nm pour chaque condition testée. Seuil de positivité : 0,29.

supérieure au seuil de positivité. Cette figure montre que dans notre modèle, la LPC C16 :0 ne permet pas une induction d'anticorps supérieure à celle obtenue avec la protéine seule ($p > 0,05$), alors que l'alun le permet. La LPC C16 :0 ne présente donc pas d'effet adjuvant des réponses humorales spécifiques de l'HBsAg dans notre modèle d'étude.

Nous nous sommes ensuite intéressés au potentiel adjuvant de la LPC C18 :0 avec l'HBsAg aux doses de 500 à 75 nmoles (Article 1, figure 6). La LPC C18 :0 présente un effet adjuvant des réponses humorales spécifiques de cet immunogène mais seule la dose la plus faible de 75 nmoles est capable d'induire une sécrétion d'anticorps anti-HBsAg statistiquement supérieure à l'injection de la protéine seule ($p < 0,05$). Nous avons également observé que l'effet adjuvant diminue rapidement et passe sous le seuil de positivité juste après la deuxième dilution (1/1000) pour la LPC C18 :0. De son côté, l'adjuvantation par l'alun permet une induction d'anticorps supérieure à celles dans les autres conditions testées. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la LPC C18 :0 est capable d'adjuvanter l'HBsAg bien que l'efficacité de l'adjuvantation semble limitée avec cet antigène. Quel que soit le groupe testé (LPC ou alun), nous avons détecté une sécrétion d'IgG1 alors qu'aucune sécrétion d'IgG2a n'est détectable (seuil à 0,2 ; résultat non présenté) indiquant le profil Th2 de la réponse. Il est important de noter que, quelle que soit l'expérience considérée, les LPC C16 :0 et C18 :0 (toutes doses confondues) injectées seules aux souris n'induisent aucune réponse à l'origine d'un bruit de fond dans nos tests ELISA anti-NS3 hel et anti-HBsAg.

Pour résumer, nous avons observé que les LPC C16 :0 et C18 :0 peuvent adjuvanter la protéine NS3 hel du VHC avec une efficacité similaire ou légèrement inférieure à celle observée avec l'adjuvant de référence en clinique chez l'homme, l'alun. L'effet adjuvant est détectable pour les deux LPC jusqu'à une dose de 12,5 nmoles et la LPC C18 :0 semble atteindre son efficacité maximale à 50 nmoles. Nous n'avons pas identifié la dose minimale efficace pour la LPC C16 :0 combinée à la NS3 hel et il serait donc intéressant d'analyser son effet adjuvant à des doses inférieures à 12,5 nmoles. La LPC C18 :0 a augmenté les sécrétions d'anticorps dirigés contre la protéine HBsAg à une dose de 75 nmoles, bien que l'activité adjuvante soit en général moins marquée que lors de l'adjuvantation de la NS3 hel,

possiblement dû à la nature particulière d'HBsAg. Ces résultats suggèrent donc que l'activité des adjuvants LPC soit dépendante de l'immunogène comme cela sera discuté plus loin. Dans tous les cas et comme cela est observé avec l'alun, les sécrétions induites par les LPC sont de type IgG1, indiquant une orientation préférentielle vers un profil Th2.

Article 1 : Identification d'espèces moléculaires de lysophosphatidylcholine présentant des activités adjuvantes *in vitro* et *in vivo*

(soumis au journal Clinical and Vaccine Immunology)

**SINGLE LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE COMPONENTS EXHIBIT
ADJUVANT FEATURES *IN VITRO* AND *IN VIVO***

**Guillaume Bach^{1,2,3,4}, Laure Perrin-Cocon^{2,3,4}, Estelle Gerossier¹, Aurélie
Guironnet-Paquet^{2,3,4,5}, Vincent Lotteau^{2,3,4,5}, Geneviève Inchauspé¹ and Anne
Fournillier^{1,*}**

¹ TRANSGENE S.A., Centre d'Infectiologie, Domilyon building, 321 avenue Jean
Jaurès, 69007 Lyon, France

² Université de Lyon, France

³ INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, 69007, France

⁴ Université Lyon1, IFR128, France

⁵ Hospices civils de Lyon, Hôpital de la Croix Rousse, Laboratoire de virologie,
France

* Corresponding author. Tel.: +33 437 650 656; fax: +33 437 650 659. Email
address: fournillier@transgene.fr (A. Fournillier)

RUNNING TITLE:

**SINGLE LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE COMPONENTS EXHIBIT ADJUVANT
FEATURES**

Abstract:

Improving vaccine immunogenicity by developing new adjuvant formulations is a long lasting goal of vaccinologists. It has been previously shown that a natural mix of lysophosphatidylcholine (LPC) from chicken eggs promote mature DC generation *in vitro* and prime Ag-specific immune responses in mice. Here, we dissected the adjuvant potential of five individual LPC components found in the chicken egg mix. *In vitro* analyses of the impact of the individual components on maturation of human DC were performed by means of phenotypic analysis, chemokine secretion analysis and ability of mature DC to stimulate T lymphocytes. Two components were identified, C16:0-LPC and C18:0-LPC, as capable to upregulate expression of CD86, HLA-DR, CD40 on *in vitro* cultured monocyte-derived DC from healthy donors. Both induced the release of high (MIP-1 β , MCP-1) to moderate (IL-8, IP-10) concentrations of chemokines. In addition, C16:0-LPC engaged naïve T cells to produce IFN γ . This suggests that C16:0- and C18:0-LPC have the capacity to promote, at least *in vitro*, a Th1-oriented response. The intravenous injection of C16:0-LPC or C18:0-LPC into mice resulted in detectable secretions of IL-6 and IL-5 in sera. Both LPC components were tested for their capacity to adjuvant two selected immunogens: the hepatitis B surface antigen (HBsAg) and the hepatitis C NS3 helicase. Secretion of specific IgG1 was observed with either or both C16:0-LPC and C18:0-LPC depending on the immunogen tested, and with an efficiency comparable to alum. These data identify the C16:0- and C18:0-LPC as the active components of the LPC natural mix. Although discrepancies exist between *in vitro* and *in vivo* analysis, animal studies suggest that these components can trigger significant and specific humoral-mediated immunity.

Development of attenuated live vaccines, although often very effective, can be problematic due to safety concerns. Other approaches, based on whole killed organisms, or more recently their subunit counterparts, meet the safety profiles required by regulatory authorities (23) but they generally need the addition of an adjuvant and/or a delivery system to improve their immunogenicity (1). Aluminum-containing adjuvants (referred as “Alum”), identified more than eighty years ago (9), are the only adjuvant authorized by the FDA. However, aluminum compounds can have side effects following injection (12), they cannot be frozen and preparations may not be always reproducible (11). The field of adjuvant research is remarkably active and has led to several licenses granted for novel compounds in recent decades. This includes an oil-in-water emulsion, MF59, incorporated in the influenza vaccine FludTM (Novartis), MonoPhosphoryl Lipid A (GSK-Bio) included in a HBV vaccine (FendrixTM) and an HPV vaccine (Cervarix[®]), and the cholera toxin B subunit in a whole-cell cholera vaccine (Dukoral[®], Crucell). In addition, immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIVs) have been used as adjuvants in vaccines against hepatitis A (Epaxal[®], Berna Biotech) and influenza (Inflexal[®] V, Berna Biotech and Invivac[®], Solvay). These three products are all marketed in Europe. Finally, an aminoalkyl glucosaminide phosphate adjuvant related to lipid A, RC529, is licensed in Argentina by Dinavax Europe for HBV vaccination (SupervaxTM). These novel adjuvants, as well as Alum, are potent inducers of humoral responses and suit vaccines requiring a Th2 type immune response, but their ability to elicit cellular immune responses is limited. Therefore, new adjuvants, which can be easily produced and are able to stimulate strong Th1 immune responses, while maintaining an acceptable safety profile, are needed (19).

The acute phase response (APR) is a non-specific physiological alarm of the body to infection or trauma inducing dramatic changes in the composition of plasma proteins and lipid metabolism leading to increased oxidation of low-density lipoproteins (oxLDL) (2, 3, 20). OxLDL have been first studied for their implication in atherogenesis (24) but recent work has revealed that oxLDL favor the differentiation of phenotypically and functionally mature DC from human monocytes (17). By sensing the biochemical composition of lipoprotein particles, the innate immune system can identify various endogenous modified lipids that can be signals modulating the immune response (4). A major constituent of oxLDL is lysophosphatidylcholine (LPC), produced by oxidation and fragmentation of the polyunsaturated sn-2 fatty acyl residues of phosphatidylcholine (PC), followed by hydrolysis of shortened fatty acyl residues by lipoprotein-associated enzymes. LPC can also be generated by hydrolysis of PC by secretory phospholipases A₂ (21). Coutant et al. showed that LPC was an active molecule within oxLDL that promoted DC maturation from differentiating monocytes acting, at least partially, through G protein-coupled receptors (5). Together, these data have identified LPC as a regulator for efficient induction of phenotypic and functional DC maturation, and thus raised the possibility that LPC could be used as a vaccine adjuvant. Indeed, LPC can initiate both humoral and cellular responses against ovalbumin or egg lysozyme model antigens when injected subcutaneously in mice (16). One major concern to further evaluate the value of LPC as an adjuvant, is that the LPC used in these studies was a natural product extracted from chicken eggs. It contains several LPC molecular components differing from each other by the fatty acid chain esterified in the sn-1 position. This fatty acyl residue is characterized by the length of the carbohydrate chain and the number of unsaturated bonds.

Since the composition of egg-LPC may vary from batch to batch, we investigated whether single molecular components of LPC, with a defined fatty acyl residue, could retain adjuvant properties. In this study, we compared the adjuvant properties of several LPC molecules contained in egg-derived LPC mix and found two single LPC components that displayed the capacity to promote DC maturation *in vitro*. Using two model immunogens derived from hepatitis B and C viruses, we show the capacity of the two LPC components to trigger specific humoral responses albeit, under our experimental conditions, no induction of specific T cell responses against the model antigens could be observed.

Materials and Methods

Materials. L-Alpha-lysophosphatidylcholines (LPC) from chicken egg or soy bean and synthetic LPC components, with a defined fatty acid esterified at the sn-1 position (lauric acid C12:0; myristic acid C14:0; palmitic acid C16:0; stearic acid C18:0; oleic acid C18:1), were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). They were used after dissolution in sterile PBS. Alum was obtained from Pierce (Rockford, IL, USA) and was mixed at equal volumes with the antigen for thirty minutes at room temperature in accordance to the manufacturer instructions. Lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/ml, *Escherichia coli*) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). LPS (*Escherichia coli*), poly I:C and CpG-ODN1826 used in the inflammatory response experiment were provided as lyophilized products by Cayla-Invivogen (Toulouse, France). They were hydrated in endotoxin-free water and stored according to the manufacturer instructions. Hepatitis B recombinant HBsAg *adr* antigen was obtained from HyTest (Turku, Finland). Hepatitis C recombinant NS3 (aa 1192-1457, genotype 1b) was produced in-house in *Escherichia coli*, and because of its ease of production, the NS3 helicase domain was more specifically selected. Both were >95% pure and had an endotoxin level below 150 units per 20 µg protein as measured by a Limulus Amebocyte Lysate-test (Cape Cod, MA, US for HBsAg, and Lonza, Basel, Switzerland for NS3 helicase).

Purification of monocytes and lymphocytes. Monocytes and lymphocytes were isolated from whole blood collected from healthy donors (Etablissement Français du Sang, Lyon, France) as described (5). Briefly, separation of mononuclear cells from human peripheral blood lymphocytes (PBL) was performed by successive centrifugations on Ficoll-Hypaque and a 50% Percoll solution (both from GE

healthcare, Little Chalfont, UK). Monocytes were further purified by immunomagnetic depletion (Dynal Biotech, Oslo, Norway) using a cocktail of mAbs: anti-CD3 (OKT3 clone, ATCC, Manassas, VA, USA), anti-CD19 (4G7 hybridoma provided by Dr Ron Levy), anti-CD16 (3G8), anti-CD56 (NKH1), and anti-glycophorine A (11E4B7.6) (all from Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Using a similar magnetic bead-depletion method, T lymphocytes were purified from fresh or frozen PBL with the same mAbs mixture except that anti-CD3 was replaced by anti-CD14 (RMO52, Beckman Coulter). Flow cytometric analysis showed that purified monocytes contained more than 90% CD14+ cells and purified T lymphocytes more than 95% CD3+ cells.

Generation and treatment of monocyte-derived dendritic cells (MoDC).

Isolated monocytes were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% lipoprotein deficient serum (LPDS) from fetal calf (Sigma-Aldrich) plus 2 mM Glutamine, 10 mM HEPES, 40 ng/ml Gentamicin (all from Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Monocytes plated in 12-well plates were supplemented with 250 U/ml human recombinant IL-4 and 40 ng/ml of human recombinant Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor from Abcys (Paris, France) and incubated for 6 days at 37°C. MoDC were stimulated for 24 hours in the presence of 40 µM LPC or 10 ng/ml LPS as positive control, at day 5, during 24h. PBS-treated cells were used as negative control. Cells were harvested at day 6 and supernatants were kept frozen.

Phenotype. Cultured cells were assessed by flow cytometry with a FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) to ensure the correct lineage differentiation over time and to analyse the maturation state of DC. Day 6 MoDCs were phenotyped using FITC-conjugated anti-CD14, -HLA-DR, -CD80, -

CD54, and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD1a, -CD86, -CD83, -CD40 (all from Beckman Coulter).

Mixed Leukocyte Reaction (MLR). Day 6 MoDC were collected, washed and cultured in 200 μ L RPMI 1640 supplemented with 2 mM glutamine, 10 mM hepes, 40 ng/ml gentamycin and 10 % FCS, in flat bottomed 96-well plates with 2×10^5 allogeneic purified T lymphocytes per well at 1:10 DC:T cells ratio. Following a culture of 5 days at 37°C, supernatants were harvested and assessed for the presence of IFN γ , IL-5 and IL-13.

Cytokines and chemokines assays. The concentration of cytokines or chemokines was determined in supernatants of MoDC harvested at day 6 or MLR supernatants. Cytokines were measured by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) kits purchased from Perbio (Helsingbörg, Sweden) for IL-6, IL-10, TNF- α and from Biosource (Camarillo, CA, USA) for IL-12p40. Chemokines MIP-1 β , MCP-1, IP-10 and IL-8 and MLR cytokines IFN γ , IL13 and IL-5 were assessed by Cytometric Bead Array technology (CBA, BD Biosciences).

Mice. C57BL/6N (8 weeks of age) or BALB/c (6-7 weeks of age) female mice from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) were housed at the PBES (Plateau de Biologie Experimental de la Souris, Lyon, France) or within AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Lyon, France). Mice were in appropriate animal care facilities, handled following international guidelines required for experiments with animals and protocols were approved by an animal ethics committee.

Inflammatory response. To determine the inflammatory profile induced by LPC components, C57BL/6N mice under isoflurane anesthesia were injected intravenously (retroorbital) either with 500 nmol of C16:0-LPC or C18:0-LPC, or with Toll-like receptor activators, 10 µg to 25 µg of LPS, poly I:C or CpG-ODN1826, as positive controls. Final volume was adjusted to 100 µL with PBS and PBS-injected mice were the negative controls. Two mice per group were injected at time 0 and sacrificed 2h, 4h or 12h after the injection. Blood samples were harvested by retroorbital puncture, kept at 4°C for 4 to 30h, centrifuged and sera were collected and conserved at -20°C until analysis.

Immunization schedules. Mice received either two subcutaneous (s. c., tail base) injections of 0.5 µg HBsAg *adr* two weeks apart, or three s. c. injections of 1 µg NS3 helicase three weeks apart. Both were adjuvanted with LPC or Alum to evaluate the *in vivo* adjuvant potential of LPC. Mice were bled by retroorbital puncture before the first immunization and 8 weeks after the first HBsAg injection or 9 weeks after the first NS3 helicase injection. Samples were kept at 4°C before collection of sera by centrifugation and conserved at -20°C until ELISA analysis.

Determination of the inflammatory profile by multiplex assay. A mouse Milliplex Map kit (Millipore, Billerica, MA) was used to detect cytokines in mice sera according to the manufacturer instructions. Standards, quality controls and samples were mixed to antibody coated beads (specific for IL-6, IL-1β, TNFα, IL12p40, IFNγ or IL-5) on a 96-well filter plate. Following 2h incubation under mild agitation, plates were washed and biotinylated antibodies were added for an additional hour. After a

further 30 min incubation in the presence of streptavidin-phycoerythrin conjugates, wells were washed before reading on a Bio-Plex 100 system (Bio-Rad, Hercules, CA). Data were analyzed using the Bio-Plex Manager 4.0 software (Bio-Rad). Positive threshold was defined for each time point and for each cytokine as two times the mean secretion of the two PBS-injected mice.

Detection of antibodies by in-house ELISA. Ninety-six well plates were coated overnight at 4°C with a sodium azide buffer containing HBsAg or NS3 helicase at 1 µg/ml. Wells were washed 3 times with PBS / 0.1% Tween 20 before the addition of a 3% Bovine Serum Albumin solution (Sigma-Aldrich) for saturation. Dilutions of sera, negative and positive controls were incubated for 1h at 37°C. Polyclonal goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) coupled antibody (Dako, Glostrup, Denmark) was added for 1h at 37°C. The HRP substrate OPD (Sigma-Aldrich) was incubated and the coloured reaction was stopped by addition of 0.8 M HCl. Optical density was measured at 490 nm on a Thermo Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and values obtained for each mouse before immunization were subtracted from that obtained following immunization. Values are considered positive when they are three times superior to the mean of pre-immunization sera diluted at 1/200. Statistical analyses were conducted using a Mann-Whitney test on individual mice values.

Results

Modulation of MoDC phenotypic markers of maturation by C16:0- and C18:0-LPC components. It has been described that the natural mix of LPC from chicken eggs induced phenotypic and functional maturation of monocyte-derived DC (MoDC) cultured in lipoprotein deficient serum (LPDS) (5). The capacity of various LPC molecular components to promote DC maturation was investigated. Immature DC were differentiated from human monocytes with GM-CSF and IL-4 for 5 days and LPC was then added for the last 24h of culture. The effect of LPC on MoDC can vary according to its composition in fatty acids. Indeed, LPC extracted from soy bean did not induce DC maturation in contrast to LPC extracted from egg (FIG. 1). Egg-LPC is richer in saturated fatty acids. It is composed of 69% C16:0-LPC, 25% C18:0-LPC, 3% C18:1-LPC and 3% of diverse molecular components including C14:0-, C16:1- and C18:2-LPC with a saturation / insaturation ratio (S/U) of 18.4. In contrast, soy bean-LPC contains 26% C16:0-LPC, 7% C18:0-LPC, 9% C18:1-LPC, 50% C18:2-LPC, 5% of C18:3-LPC and 3% of diverse molecular components with a S/U ratio of 0.52. These data suggest that DC maturation is induced by saturated LPC. This was tested using the largest range of synthetic LPC commercially available as single defined components: C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 and C18:1-LPC. Differentiated MoDC were CD14⁻ and CD1a⁺. The maturation of DC was followed by the expression of several surface markers (HLA-DR, CD-80, CD-54, CD-86, CD-83 and CD-40). As expected, control immature DC (PBS-treated) had no expression of CD-86 and CD-83; low to intermediate expression of CD-80 and HLA-DR and moderate expression of CD-54 and CD-40 (FIG. 1 and 2A-C, thick lines). Cells treated with LPS, a microbial agent known to efficiently induce DC maturation and used here as positive control, up-regulated HLA-DR, CD-80, CD-54, CD-86, CD-83 and CD-40

(FIG. 2C, thin lines). Cells incubated with the C12:0-, C14:0-, C18:1-LPC displayed a surface expression profile similar to that of PBS treated-negative control cells (data not shown). In contrast, HLA-DR, CD-86 and CD-40 surface expression was upregulated when the cells were incubated with the natural egg-LPC mix, C16:0- or C18:0-LPC at an optimal concentration of 40 μ M (FIG. 1, 2A and B, respectively). CD-54 expression was increased with LPS but not with C16:0-, C18:0-LPC where even a slight decrease was found. Overall, these results showed that two single LPC components, C16:0- and C18:0-LPC, were able to induce phenotypically mature DC.

Cytokine and chemokine secretions driven by single LPC components. We next analyzed whether C16:0- and C18:0-LPC could induce the release of cytokines or chemokines by treated MoDC. Culture supernatants collected from day 6 MoDC were assessed for the presence of representative cytokines and chemokines associated with Th1 or Th2 immune responses: TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-12 by ELISA and MIP-1 β , MCP-1, IL-8 and IP-10 by CBA. No significant modification of TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-12 secretions from cells treated with C16:0-, C18:0-, C18:1- or egg-LPC was observed (data not shown). In contrast, we observed notable changes in the production of chemokines in the supernatants of LPC-treated cells (FIG. 3). Mean values normalized to the control (arbitrarily set to 1) showed a 127 and 564 fold increase in the production of MIP-1 β by C16:0- and C18:0-LPC treated cells respectively. A moderate increase of 21 fold was observed after treatment with egg-LPC and only a 9 fold increase with C18:1-LPC (FIG. 3A). MCP-1 secretion was similarly enhanced with an increase of 105 and 351 fold in cultures containing C16:0- and C18:0-LPC respectively, as compared with a 12 fold increase in the presence of egg-LPC and only a 9 fold increase with C18:1-LPC (FIG. 3B). For these two

chemokines, C18:0-LPC was a more potent inducer than C16:0-LPC. C16:0- and C18:0-LPC stimulations led to an increase of, respectively, 6 and 7 fold in IL-8, and of 3 and 2 fold in IP-10 (FIG. 3C, D). Egg-LPC showed a weaker capacity to induce IL-8 secretions with a 5 fold increase and no ability to increase IP-10. IL-8 and IP-10 were not induced by C18:1-LPC treatment of DC. Altogether, these data show that the two single LPC components, C16:0- and C18:0-LPC, strongly upregulated the production of key Th1 chemokines after a brief 24h incubation with MoDC. These secretions were always stronger than those obtained with the egg-LPC mix.

Activation induced by single LPC components in Mixed Leukocyte Reactions (MLR). The capacity to stimulate allogeneic T cells is another characteristic of mature DC. We therefore investigated whether LPC-treated cells showed differences with respect to functional properties *in vitro* using an MLR test. Allogeneic T cells were mixed at a 1:10 DC:T cells ratio and cultured for 5 days. At the end of the co-culture, supernatants were harvested and a fluorescent bead array assay (CBA) performed to detect the presence of Th1- (IFN γ) and Th2-related (IL-13 and IL-5) cytokines. The analysis of several donors indicated that C16:0-LPC treated DC shifted T cells toward a Th1 profile as we observed more IFN γ and less IL-13 and IL-5 in culture supernatants (FIG. 4) with C16:0-LPC treated DC. The C16:0-LPC treated DC induced a Th1 response similar to that induced by DC stimulated with a low dose of LPS (10 ng/ml). C18:0- and egg-LPC treated DC were less efficient to induce T cell activation. DC treated with the unsaturated C18:1-LPC were unable to induce T cell activation in MLR experiments. These data suggested that the functionality of MoDC was biased toward a Th1 profile when stimulated by C16:0- or,

to a lesser extent, by C18:0-LPC component, in correlation with chemokines secretion data.

Inflammatory profile induced by single LPC components *in vivo*. C16:0- and C18:0-LPC components showed to be potential adjuvants *in vitro* with human DC and lymphocytes. Since it is not possible to examine their adjuvant properties *in vivo* in humans, we evaluated the LPC capacity to induce cytokine secretion *in vivo* following intravenous injection in mice. The *in vivo* cytokine profile directly induced by an adjuvant can provide a first information on the immunological environment susceptible to be put in place by the adjuvant, and likely to influence the orientation of subsequent adaptive immune responses. IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-5 and IFN γ were directly measured in sera of mice following a single intravenous injection under anesthetic of either C16:0-LPC, C18:0-LPC or positive control TLR activators (*i. e.* LPS, CpG-ODN1826 and poly I:C). All controls were injected at two doses, 10 μ g and 25 μ g.

LPC components were found to induce the secretion of IL-6 and IL-5. Injection of C16:0-LPC triggered the secretion of IL-6 that was detected in the blood as early as after 2h, peaked at 4h (777 and 8249 pg/ml, for each mouse respectively) and was still detectable at 12h after the injection (FIG. 5A). C18:0-LPC induced a weaker secretion of IL-6 that peaked at 2h (770 and 521 pg/ml, for each mouse respectively), slightly decreased at 4h and was still detectable at 12h after injection. As expected, the injections with LPS (TLR4 ligand) and polyI:C (TLR3 ligand) induced strong secretions of IL-6 as early as 2h post-injection (above 40,000 pg/ml and 12,000 pg/ml, respectively). In contrast, IL-6 secretion induced by CpG (TLR9 ligand) was closer in intensity to that induced by LPC components. Both LPC components were

found to induce IL-5 secretion at similar levels (47 and 112 pg/ml for C16:0-LPC and 106 and 155 pg/ml for C18:0-LPC at 12h, for each mouse respectively) although later than IL-6 (with a peak at 12h) (FIG. 5B). This secretion was higher than that observed after injection of TLR activators LPS, polyI:C or CpG, which was not significantly above the positive threshold. By contrast, TLR activators induced secretions of TNF- α , IL-1 β (only LPS), IL12p40, and IFN γ (data not shown).

In conclusion, single LPC components were both found to induce significant IL-6 and to a lower extent IL5 secretions following direct intravenous injection in mice. These preliminary *in vivo* data point to ability of the two LPC components to rather induce a Th2-oriented response, contrasting with *in vitro* data that pointed towards a Th1 orientation.

Capacity of single LPC components to induce humoral responses.

HBsAg from Hepatitis B Virus (HBV). Humoral responses elicited by the two identified LPC components specific of the surface antigen of the hepatitis B virus (HBsAg) were evaluated, as protection in this model is tightly mediated by antibodies. The schedule of immunization of BALB/c mice consisted in two injections of 0.5 μ g of HBsAg adjuvanted with the LPC (decreasing doses from 500 to 75 nmol) at two weeks interval, and antibodies were measured 6 weeks after the 2nd injection (FIG. 6). The standard Alum adjuvant was used for bench marking. No induction of specific antibodies could be observed when the C16:0-LPC was used (data not shown). In contrast, the C18:0-LPC enhanced the production of HBsAg-specific IgG compared with the injection of HBsAg alone. This increase was statistically significant for the lowest dose of LPC 75 nmol (FIG. 6). Mice receiving Alum plus HBsAg demonstrated a significant increase of the HBsAg-specific IgG at 1/1000 and 1/5000 dilutions

compared with other conditions evaluated. Similarly to Alum, the secreted Ig were IgG1, while IgG2a was never detected under the conditions tested. Thus, antibody profiles induced in mice, in line with the above analysis of cytokine profiles in sera, point to the capacity of the LPC components to orientate immune responses towards a Th2 profile.

NS3 helicase from Hepatitis C Virus (HCV). The HCV NS3 protein is the target of a robust and broadly detectable antibody response during natural infection. BALB/c mice were injected 3 times at 3 weeks interval with 1 μ g of recombinant NS3 combined with decreasing doses of C16:0- or C18:0-LPC, and humoral responses were analyzed by ELISA three weeks after the last immunization. A clear induction of NS3-specific antibodies was observed with different doses of C16:0-LPC (75 and 500 nmol) as compared with the NS3 protein injected alone (FIG. 7A). C16:0-LPC was as efficient as Alum ($p < 0.05$) at both doses. Lower doses (from 75 to 12.5 nmol) were also tested, and FIG. 7B shows that the adjuvant capacity of C16:0-LPC was similar or lower to that of Alum depending on the dilution evaluated. Even the lowest 12.5 nmol dose tested showed a significant adjuvant potential as compared with NS3 protein alone.

Similar to C16:0-LPC and as shown in FIG. 7C, the C18:0-LPC enhanced NS3-specific antibody production as compared with mice injected with the protein alone at all doses tested. This effect was statistically significant for the two lowest doses tested (75 and 150 nmol) and for all sera dilutions tested for the 75 nmol dose ($p < 0.05$). The humoral response induced was in the range of, although lower than, that achieved following immunization with Alum. C18:0-LPC adjuvant properties were further analyzed with lower doses: 75 to 12.5 nmol (FIG. 7D). Similar significant

adjuvant effect was observed at all doses as compared with protein alone, although a significantly higher response was observed at 50 nmol as compared with 12.5 nmol ($p < 0.05$). This suggests that the optimal adjuvant capacity of C18:0-LPC is reached at 50 nmol. In addition, the humoral responses against the HCV NS3 induced by C16:0- and C18:0-LPC components were maintained beyond the 1/5000 dilution.

The characterization of Ig subtypes revealed that, similarly to HBsAg immunizations, the injection of NS3 adjuvanted with C16:0- and C18:0-LPC lead to the production of IgG1 only (data not shown).

Discussion

The present study focused on the preclinical evaluation of a novel lipid-based adjuvant, the lysophosphatidylcholine (LPC). Natural egg-derived mix of LPC have been shown to promote mature DC generation *in vitro* and initiate adaptive immune responses in mice (5, 16). The objective of this study was to determine which single molecular LPC component within the natural egg mix is responsible for the described adjuvant properties of this potential novel adjuvant. We show that two single LPC components, C16:0- and C18:0-LPC, exhibit adjuvant features. These two molecules supported *in vitro* maturation of differentiating monocytes into functional DC resulting in the release of Th1 chemokines. Following direct intravenous injection of the two LPC components in mice, transient secretion of IL-6 and IL-5 was reported. In addition, immunization of mice with the C18:0-LPC resulted in significant induction of antibodies specific of two model antigens tested (HBsAg and HCV NS3), while that of C16:0-LPC was a good inductor of antibodies only when mixed with HCV NS3. In both cases, the secretions of IgG1 suggested a biased response towards a Th2 profile.

We first showed that a soy bean-LPC mix, mainly composed of unsaturated LPC components, was unable to promote DC maturation in contrast to an egg-LPC mix containing mostly saturated molecules. This result suggested that DC maturation was induced by saturated LPC. When analysing saturated single LPC components, ranging from the C12:0- to C18:0-LPC, as well as the unsaturated C18:1-LPC component, we observed that C16:0- and C18:0-LPC were the only single LPC components giving rise to phenotypic and functional mature MoDC *in vitro*. This finding suggests a relationship between the adjuvant potential of the LPC and both its carbon chain length and its saturation state. Since the C16:0- and C18:0-LPC are the

most representative components of total LPC *in vivo* (22), this reinforces the previously proposed concept that a burst of LPC during the APR is an endogenous signal favouring induction of immune responses.

Cell surface markers of differentiation and maturation were analyzed by flow cytometry. C16:0- and C18:0-LPC induced up-regulation of HLA-DR, CD86 and CD40 surface expression. The others LPC components, and especially C18:1-LPC, did not affect the immature phenotype of MoDC. It is of note that, in contrast to what we observed with LPS, LPC molecules (egg-LPC or single component C16:0- or C18:0-LPC) induced a slight decrease in CD54 expression at the surface of MoDC. CD54, or Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), is involved in the recruitment of immune cells at the site of inflammation. In addition, the expression of ICAM-1 at the surface of DC is involved in the interaction between DC and T cells (6), and an immunostimulant molecule, such as the LPS which upregulates CD54, may favour inflammation and DC functions. Whether or not the observed down-regulation of CD54 by the C16:0- and C18:0-LPC components impairs the adjuvant potential of these two molecules, in particular their capacity to induce T-cell mediated immunity, remains to be demonstrated.

Analysis of cytokines and chemokines in the culture supernatant of MoDC treated with LPC showed that C16:0- or C18:0-LPC could trigger the secretion of Th1 chemokines MIP-1 β , MCP-1, IL-8 and IP-10, while not influencing secretion of IL-12p40, IL-6, TNF α or IL-10. Induction of chemokines is of great interest since these molecules are responsible for the recruitment of monocytes, neutrophils, and macrophages (25). An initial burst of chemoattractant factors is essential for an efficient induction of the immune response (10). Thus, the observed chemokine secretions suggest that our LPC candidates have the potential to trigger an

inflammatory response. Interestingly, chemokine secretions were stronger with the individual C16:0- or C18:0-LPC than those obtained with the same dose of egg-LPC, probably because egg-LPC contains inactive or even inhibitory compounds mixed with the active LPC. This highlights the importance of working with isolated and precisely defined structures of LPC. In this context, it was decided to focus on the C16:0- and C18:0-LPC molecules to further pursue our analysis *in vivo*.

Analysis of cytokine induction was also done in an *in vivo* context following direct injection of the LPC components in mice and in comparison with various immunomodulators. Induction of an inflammatory response was documented, in particular the early secretion of IL-6 and to a lesser extent IL-5. This preliminary analysis did suggest that, in contrast to *in vitro* observations, the LPC components may orientate the host response towards a Th2 profile.

The adjuvant effect of LPC was analyzed in immunization procedures using two antigens displaying very different structures: a particulate structure in the case of HBsAg (13) and a structure composed of three isolated domains in the case of HCV NS3 helicase (15). It was found that C16:0-LPC compares favourably with Alum to promote NS3-specific antibodies when used in dose reduction studies starting from 500 nmol. We observed that the lowest dose of 12.5 nmol could still compete with Alum. C18:0-LPC, although a little less efficient, was capable of eliciting humoral responses against NS3 in the range of those observed with Alum. Overall, both LPC components have shown adjuvant properties at very low doses, down to 12.5 nmol injected, which is an important feature for the selection of a safe adjuvant for human vaccination. Although C18:0-LPC could adjuvant both antigens and induced humoral responses, the effect on HBsAg was not comparable to that seen with HCV NS3.

These differences could be related to the nature of the Ag tested, as HBsAg has a structure that confers an unusually high intrinsic immunogenicity to this viral antigen.

Interestingly, a previous study has shown that the subcutaneous injection of C16:0-LPC in the range of 200 to 800 nmol triggered a transient inflammatory response without severe adverse events in human volunteers (18). In this context, the weak adjuvant dose attained is of particular interest because LPC can reach concentrations as high as 150 nmol / ml in the serum of healthy individuals (22). It is tempting to speculate that low doses of LPC could retain inflammatory and adjuvant features and be used safely in the clinics. Additionally, and since LPC is a lipid, C16:0- and C18:0-LPC may be prone to be incorporated into the lipid layer of large vesicles. For example, a LPC component could be inserted into a liposome or a virosome (14) in order to bring or complement adjuvant features of these structures.

The capacity of the LPC components to induce cell-mediated specific immune responses was very difficult to document. Although *in vitro* analysis using human cells suggested that LPC have the potential to trigger a Th1-oriented response, yet, results obtained *in vivo* did rather point to induction of Th2-biased responses. BALB/c mice were used and they are indeed a reference for induction of humoral responses. Nonetheless, we did use other lines of mice with a C57BL/6 genetic background (*i. e.*: H-2 class I knockout HLA-A2.1 or HLA-B7.2 transgenic mice (7)) in order to document induction of cell-mediated responses using a panel of assays (*e. g.*: ELISpot IFN γ , intracellular IFN γ staining or *in vitro* CTL assays (7)). Failure to detect such responses was surprising as they did contrast with the *in vitro* data. To a certain extent, they also contrast with our observations reported by Perrin-Cocon et al. using the LPC from chicken eggs (16). Major differences exist between these studies that may have contributed to the divergent results observed, in particular the fact that

different antigens, different mice strains and different routes and immunization schedules were used. We did apply here routes of immunization and schedules expected to be used in the clinics. The difficulty to reconcile *in vitro* and *in vivo* data does point to the limitation of currently used alternative models to evaluate adjuvants and vaccines. It accentuates the need to develop further, more complex, analytical systems such as used by Gaucher D et al. (8), and based on reconstituted human cell environment expected to be met during the vaccination process.

In conclusion, we succeeded in identifying two single synthetic LPC components, C16:0- and C18:0-LPC, originating from a natural mix of LPC from chicken eggs that harbor adjuvant properties. Further characterization is needed to confirm their interest as potential adjuvant candidates for clinical development, but the fact that these components are precisely defined chemical entities and synthetically available is undoubtedly an interesting feature.

References

1. Aguilar JC, Rodriguez EG. 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*
2. Baumann H, Gauldie J. 1994. The acute phase response. *Immunol Today* 15:74-80
3. Cabana VG, Siegel JN, Sabesin SM. 1989. Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *J Lipid Res* 30:39-49
4. Coutant F, Agaogue S, Perrin-Cocon L, Andre P, Lotteau V. 2004. Sensing environmental lipids by dendritic cell modulates its function. *J Immunol* 172:54-60
5. Coutant F, Perrin-Cocon L, Agaogue S, Delair T, Andre P, Lotteau V. 2002. Mature dendritic cell generation promoted by lysophosphatidylcholine. *J Immunol* 169:1688-95
6. Dustin ML, Springer TA. 1991. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* 9:27-66
7. Fournillier A, Gerossier E, Evlashev A, Schmitt D, Simon B, Chatel L, Martin P, Silvestre N, Balloul JM, Barry R, Inchauspe G. 2007. An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine* 25:7339-53
8. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, Moser JM, Mehta RS, Drake DR 3rd, Castro E, Akondy R, Rinfret A, Yassine-Diab B, Said EA, Chouikh Y, Cameron MJ, Clum R, Kelvin D, Somogyi R, Greller LD, Balderas RS, Wilkinson P, Pantaleo G, Tartaglia J, Haddad EK, Sekaly RP. 2008. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* 205:3119-31
9. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. 1926. Immunological Notes XVII.-XXIV. *J Pathol Bacteriol* 29:31-40
10. Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. 2005. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:561-80
11. Gupta RK. 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv*

12. Lindblad EB. 2004. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. *Vaccine* 22:3658-68
13. Miyanohara A, Toh-e A, Nozaki C, Hamada F, Ohtomo N, Matsubara K. 1983. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1-5
14. Moser C, Metcalfe IC, Viret JF. 2003. Virosomal adjuvanted antigen delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 2:189-96
15. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39:5-19
16. Perrin-Cocon L, Agaogue S, Coutant F, Saint-Mezard P, Guironnet-Paquet A, Nicolas JF, Andre P, Lotteau V. 2006. Lysophosphatidylcholine is a natural adjuvant that initiates cellular immune responses. *Vaccine* 24:1254-63
17. Perrin-Cocon L, Coutant F, Agaogue S, Deforges S, Andre P, Lotteau V. 2001. Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte. *J Immunol* 167:3785-91
18. Ryborg AK, Deleuran B, Sogaard H, Kragballe K. 2000. Intracutaneous injection of lysophosphatidylcholine induces skin inflammation and accumulation of leukocytes. *Acta Derm Venereol* 80:242-6
19. Schijns V. 2006. Unraveling "the immunologist's dirty little secret". In *Immunopotentiators in Modern Vaccines*, ed. OD Schijns V., Elsevier
20. Steinberg D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272:20963-6
21. Steinbrecher UP, Pritchard PH. 1989. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res* 30:305-15
22. Subbaiah PV, Chen CH, Bagdade JD, Albers JJ. 1985. Substrate specificity of plasma lysolecithin acyltransferase and the molecular species of lecithin formed by the reaction. *J Biol Chem* 260:5308-14

23. Ulmer JB, Valley U, Rappuoli R. 2006. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat Biotechnol* 24:1377-83
24. Witztum JL, Steinberg D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88:1785-92
25. Zlotnik A, Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-7

Figures Legends

FIG. 1: Effect of the composition in fatty acid of LPC on DC maturation. The phenotype of day 6 MoDC stimulated 24 hours with PBS (Control, thick line), Egg-LPC (thin line) or soy bean-LPC (dashed line) was analyzed by flow cytometry. Results are representative of one experiment out of three.

FIG. 2: Mature DC generation induced by LPC single components. The phenotype of day 6 MoDC stimulated 24 hours with LPC components (A-B) or LPS (C) was analyzed by flow cytometry. The expression of surface markers on treated cells (thin line) is compared to control cells receiving only PBS (thick line). Results are representative of one experiment out of ten.

FIG. 3: Secreted chemokines by MoDC upon various LPC stimulations. The supernatants of MoDC treated or not with a LPC component at day 5 for 24h were collected and the chemokine concentrations measured using the CBA technology. Raw data were normalized to the control (PBS) set arbitrarily to 1. Each donor is individually plotted; the mean of the donors is indicated by the thick horizontal line. (A) MIP-1 β : macrophage inflammatory protein 1 β , (B) MCP-1 : monocyte chemotactic protein 1, (C) IL-8 : interleukin 8, (D) IP-10 : γ -interferon inducible protein 10.

FIG. 4: Allogeneic T cell stimulation by LPC-treated cells. MoDC, treated or not

with a LPC component for 24h, were co-cultured with allogeneic T cells at a ratio of 1:10 for 5 days. Cells supernatants were assessed for the presence of IFN γ , IL-13 and IL-5 by CBA assays. Cytokine detection was performed in triplicate and mean plus standard deviation (SD) are represented. Results are representative of three separate experiments from different donors.

FIG. 5: Inflammatory profile induced by C16:0- and C18:0-LPC. Sera from C57BL/6 mice injected intravenously under anesthetic with either C16:0-LPC (500 nmol), C18:0-LPC (500 nmol), CpG-ODN1826 (10 μ g and 25 μ g), LPS (10 μ g and 25 μ g) or poly I:C (10 μ g and 25 μ g) were assayed for presence of cytokines using a Milliplex Map kit. Two mice (M) were included per time point, and sera were collected at 2h (M1, M2), 4h (M3, M4) or 12h (M5, M6). (A) IL-6: the positive threshold, defined as two times the mean of secretion for PBS-injected mice was 45 pg/ml at 2h, 45 pg/ml at 4h, 0 pg/ml at 12h. (B) IL-5: positive threshold: 61 pg/ml at 2h, 78 pg/ml at 4h, 39 pg/ml at 12h.

FIG. 6: Anti-HBsAg humoral response induced in BALB/c mice following immunization with HBsAg combined with C18:0-LPC. Groups of 6 mice were immunized 2 times at 2 weeks interval with 0.5 μ g of HBsAg combined with C18:0-LPC using decreasing doses, from 500 to 75 nmol, and humoral responses were analyzed by ELISA 6 weeks after the last immunization. O.D. median values (490 nm) of each mentioned group at various serum dilutions are represented. The positive threshold was defined as three times the mean of pre-immune sera diluted at 1/200 for each mouse. One star indicates a p value < 0.05 compared with the control

group (□). Two shaded stars indicate a p value < 0.05 compared with any other group.

FIG. 7: Anti-NS3 humoral response induced in BALB/c mice following immunization with NS3 helicase combined with C16:0-LPC and C18:0-LPC.

Groups of 6 mice were immunized 3 times at 3 weeks interval with 1 µg of NS3 helicase combined with either C16:0-LPC (A and B) or C18:0-LPC (C and D) using decreasing doses from 500 to 75 nmol (A and C), and from 75 to 12.5 nmol (B and D). Humoral responses were analyzed by ELISA 3 weeks after the last immunization. O.D. median values (490 nm) of each mentioned group at various serum dilutions are represented. The positive threshold was defined as three times the mean of pre-immune sera diluted at 1/200 for each mouse. One star indicates a p value < 0.05 compared with the control group (□). Two shaded stars indicate a p value < 0.05 compared with any other group.

FIG. 1

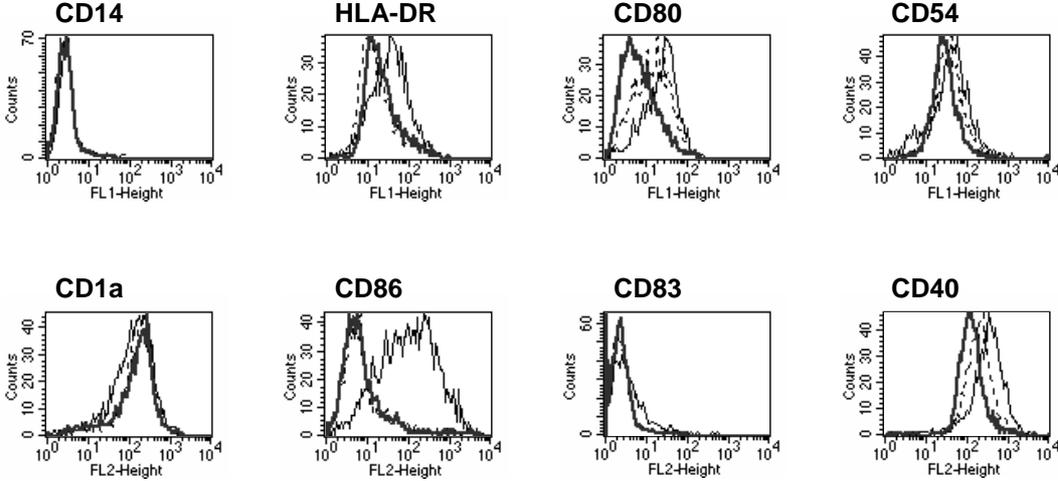
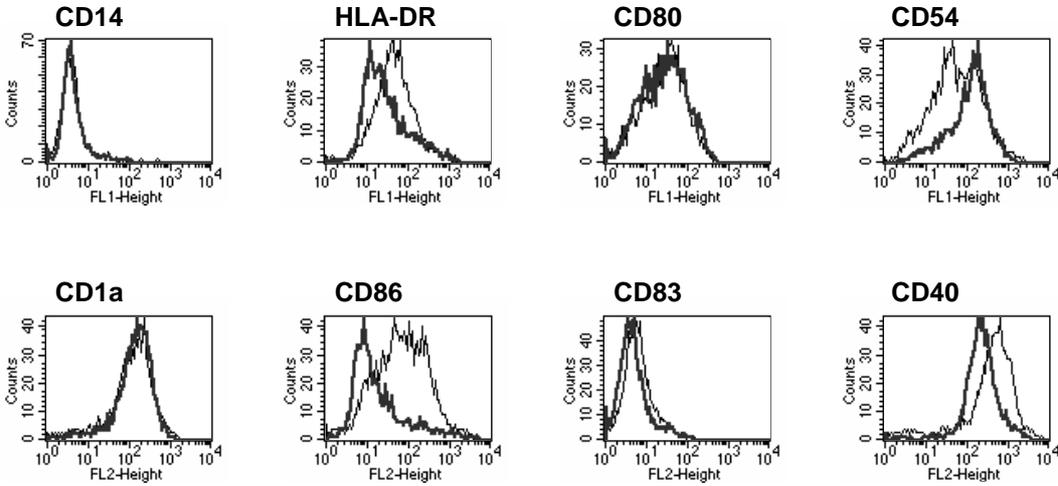


FIG. 2

(A) C16:0-LPC (40µM)



(B) C18:0-LPC (40 µM)

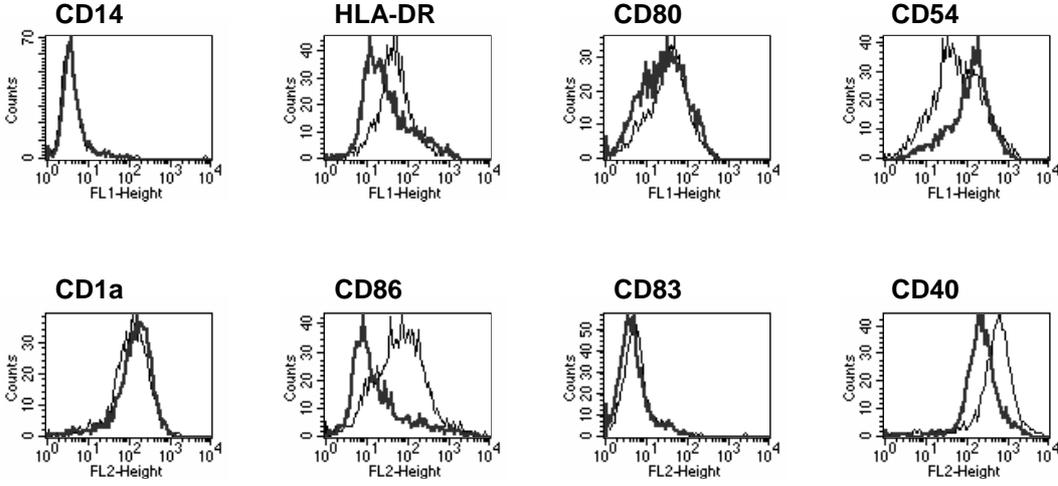


FIG. 2

(C) LPS

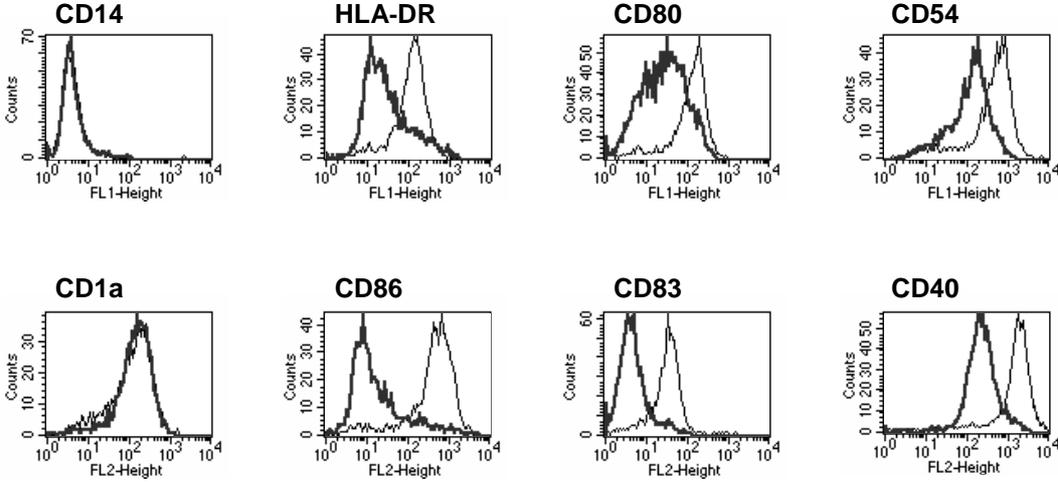


FIG. 3

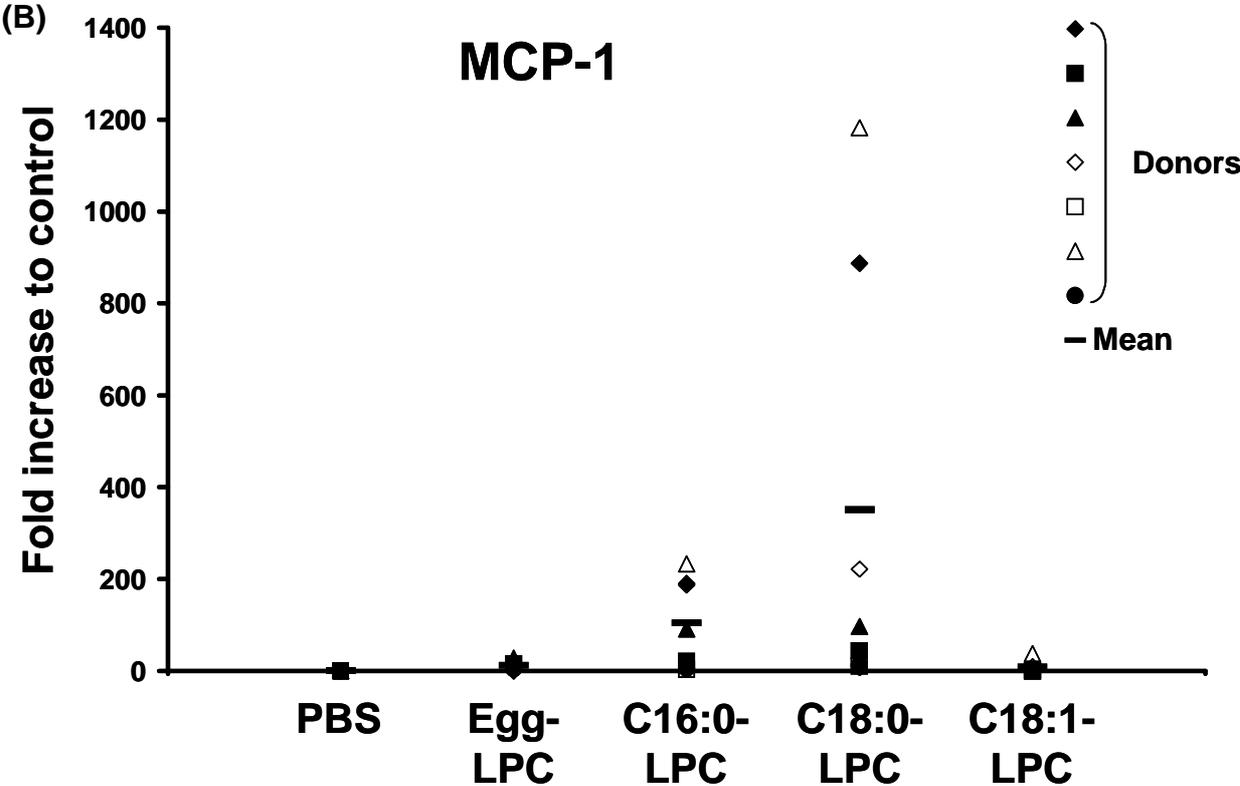
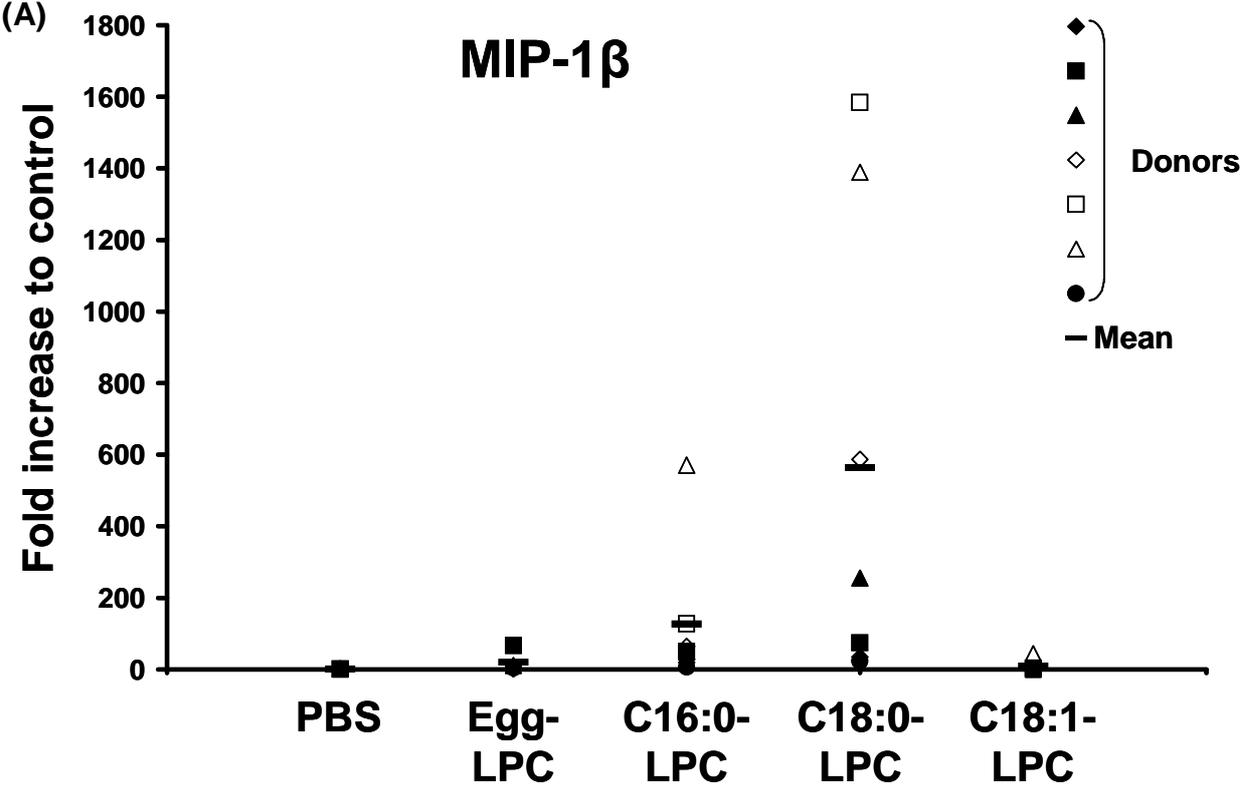


FIG. 3

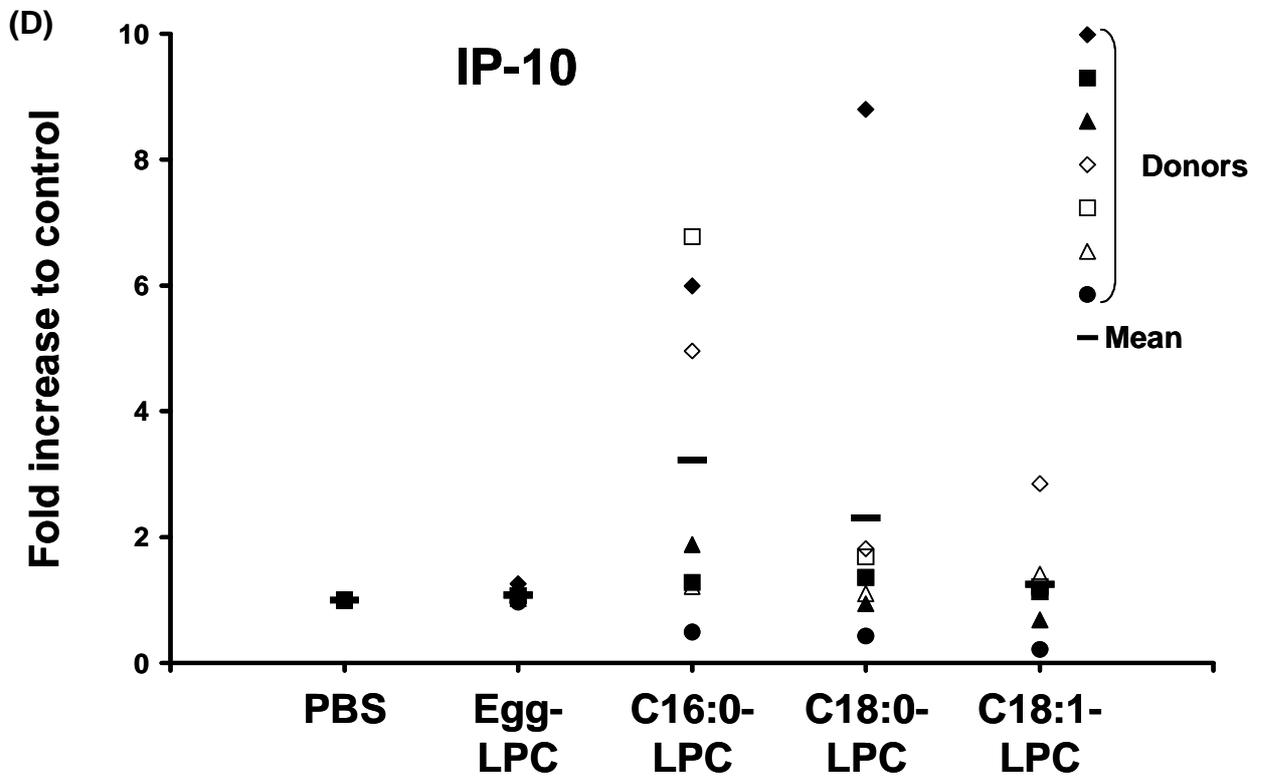
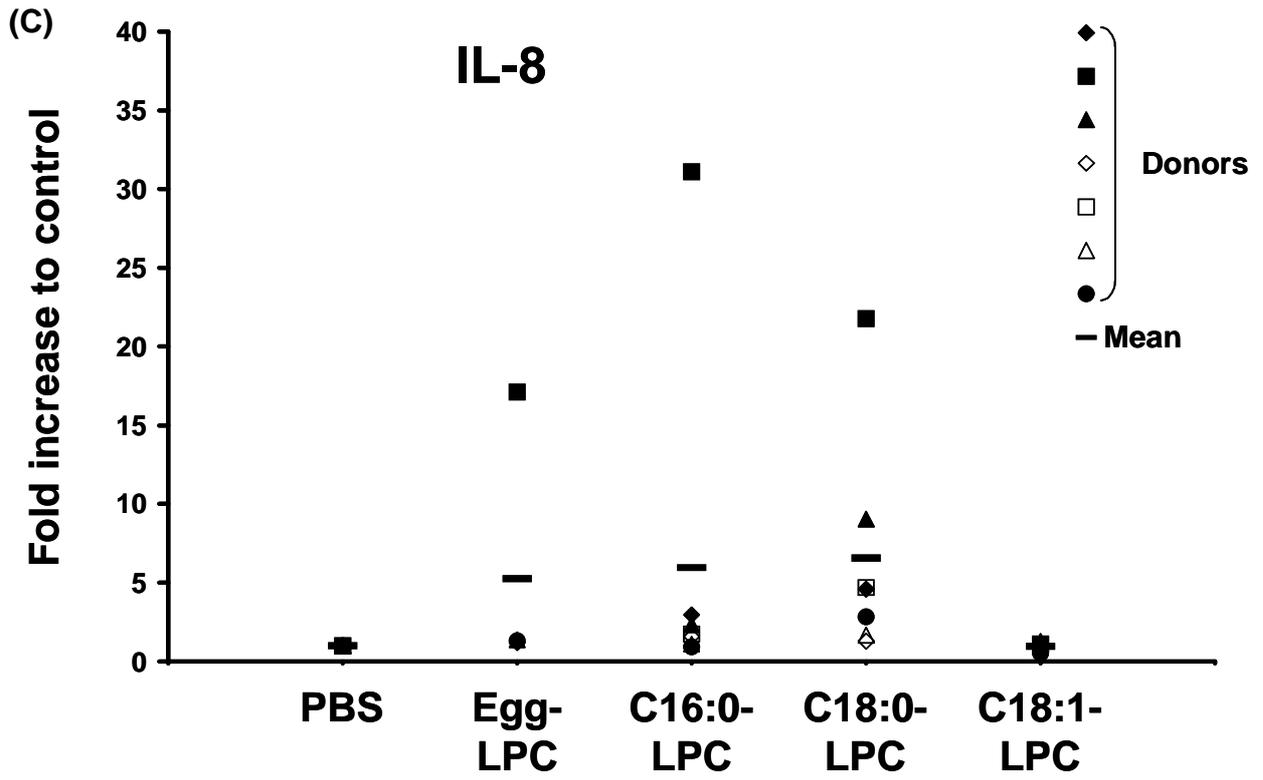


FIG. 4

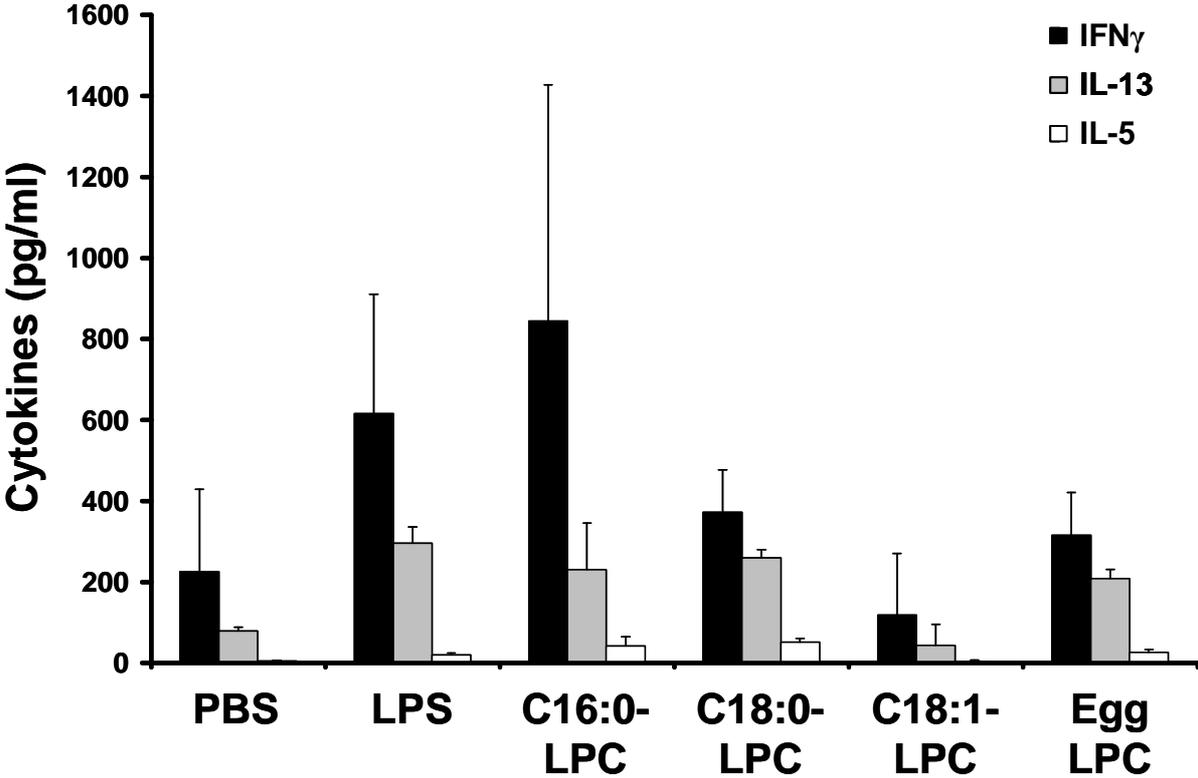


FIG. 5

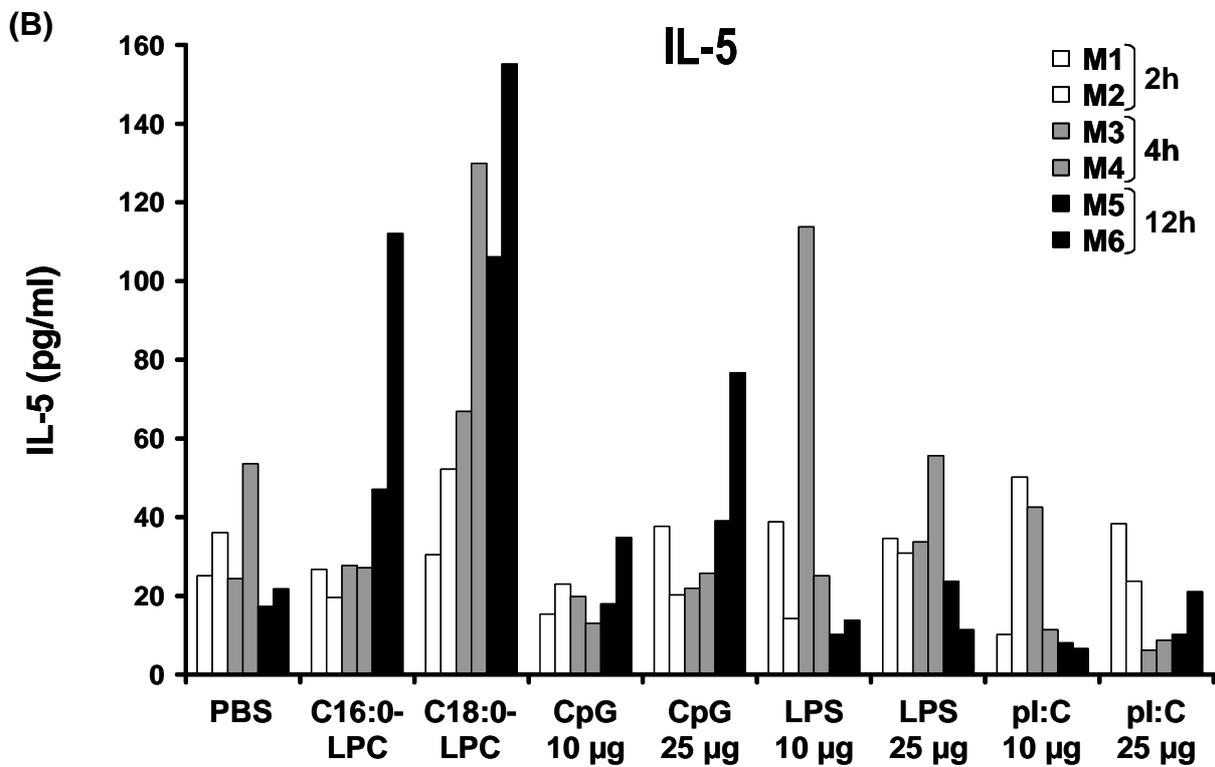
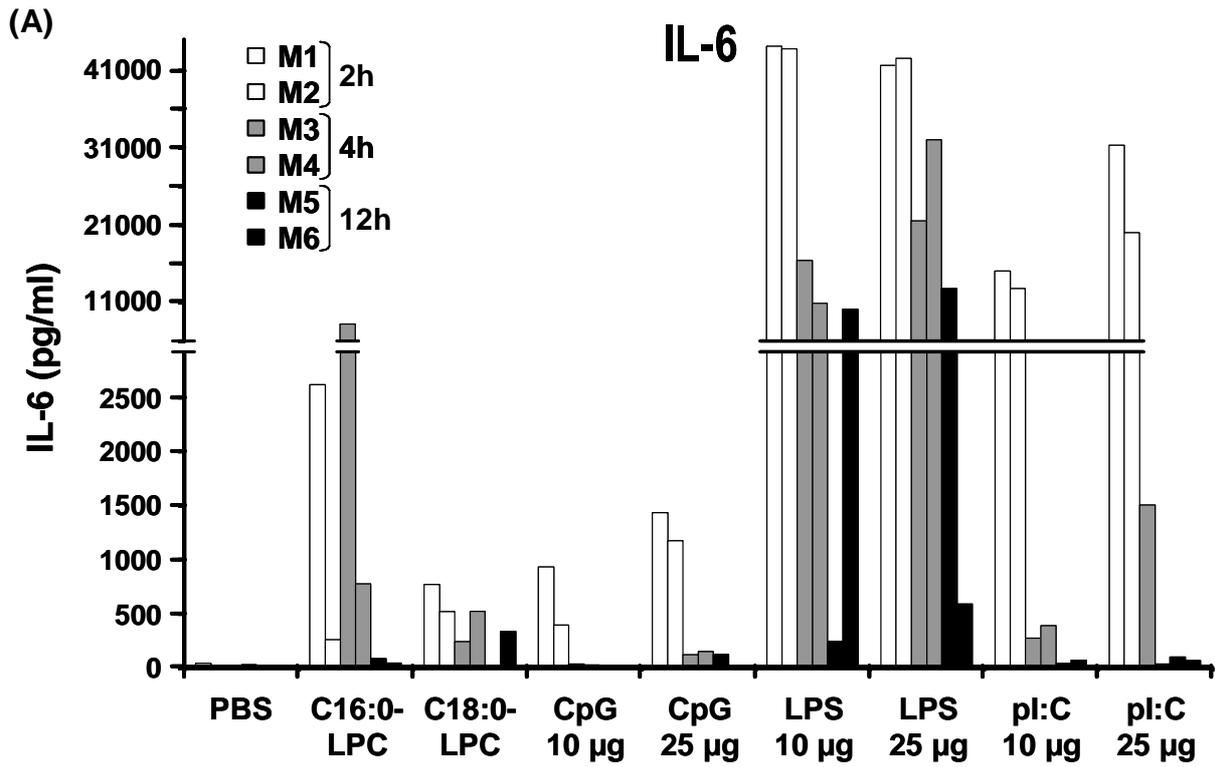


FIG. 6

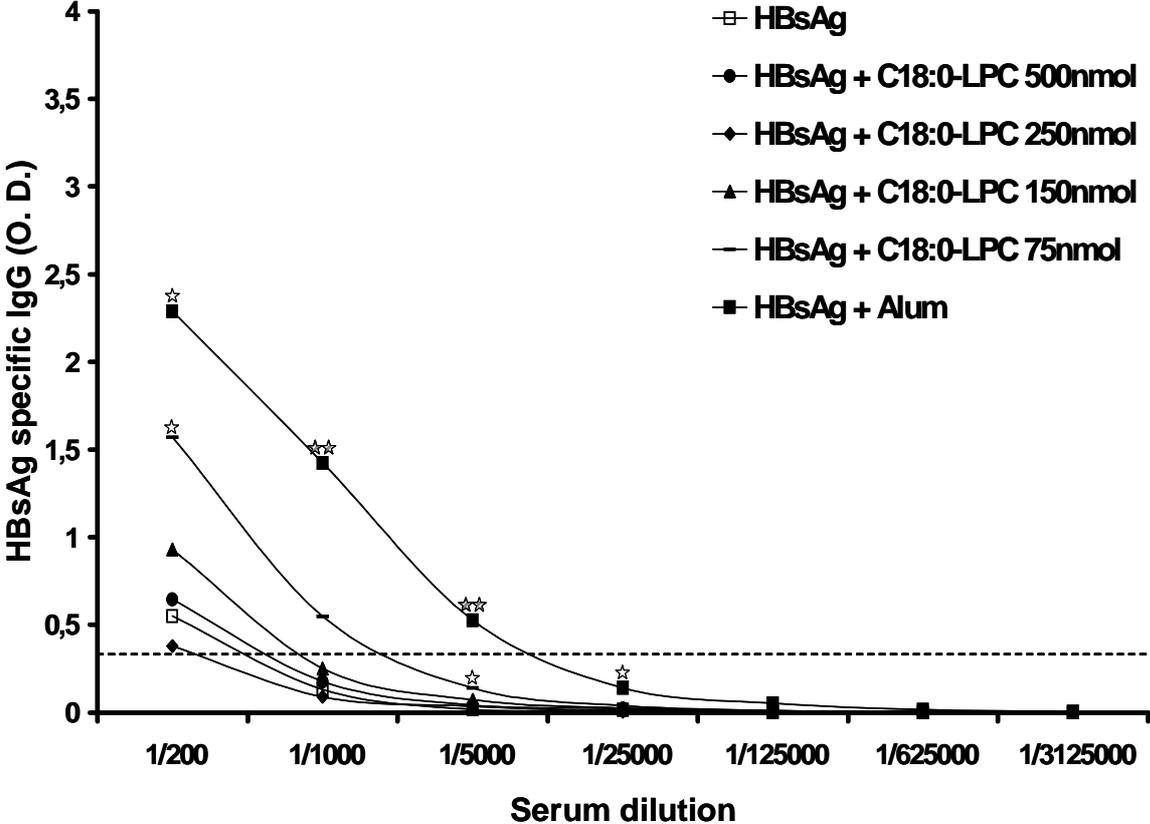


FIG. 7

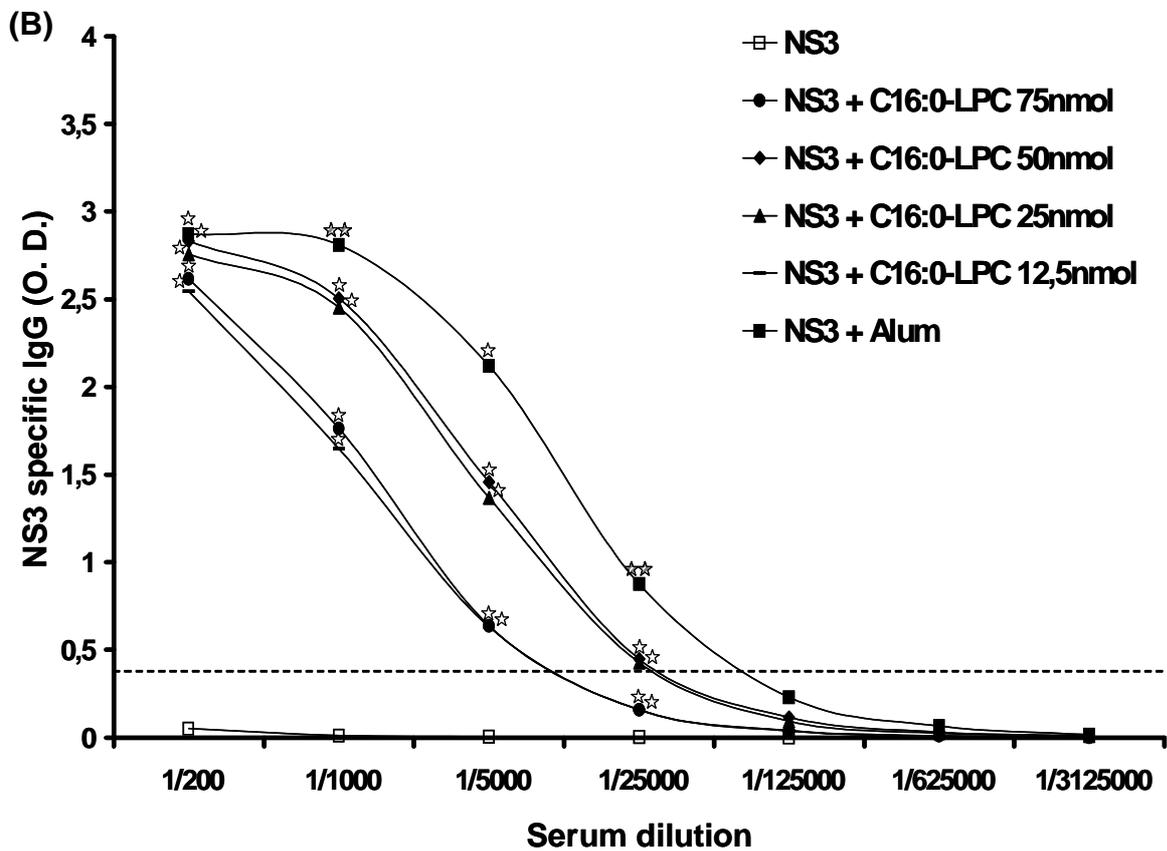
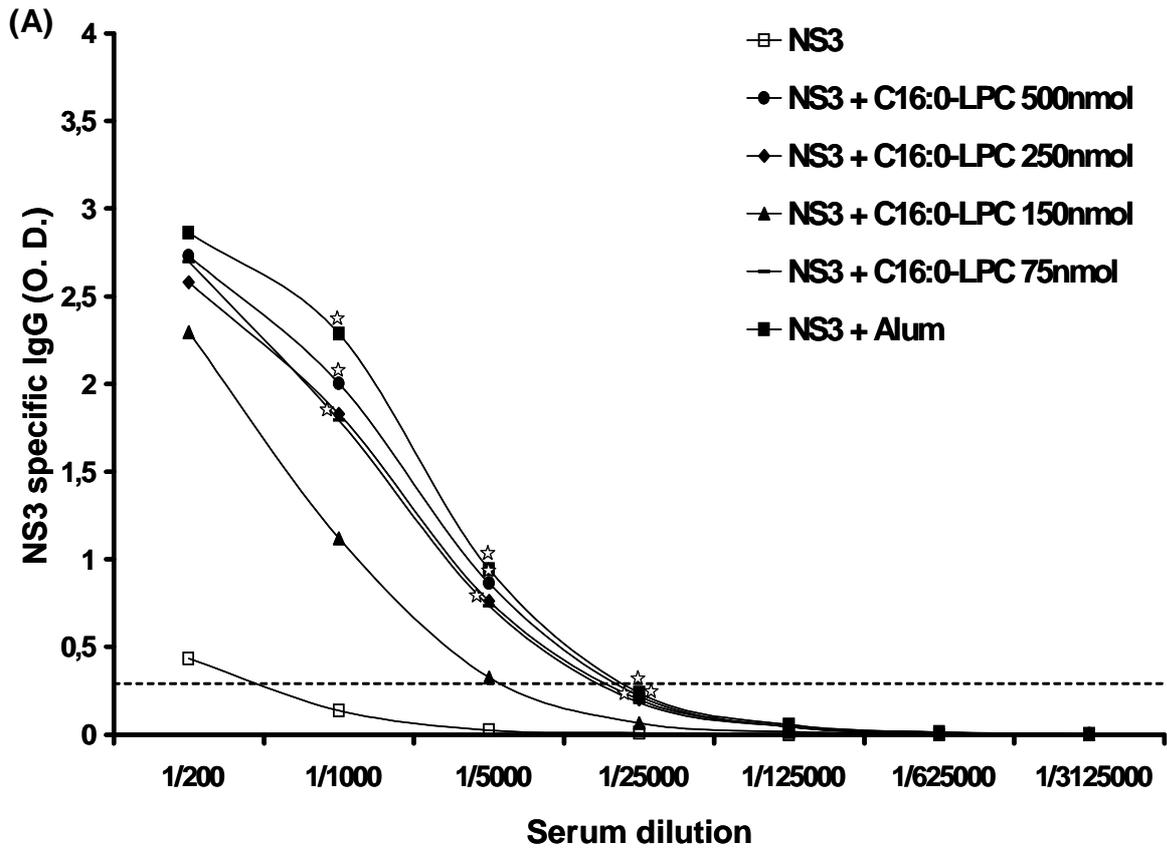
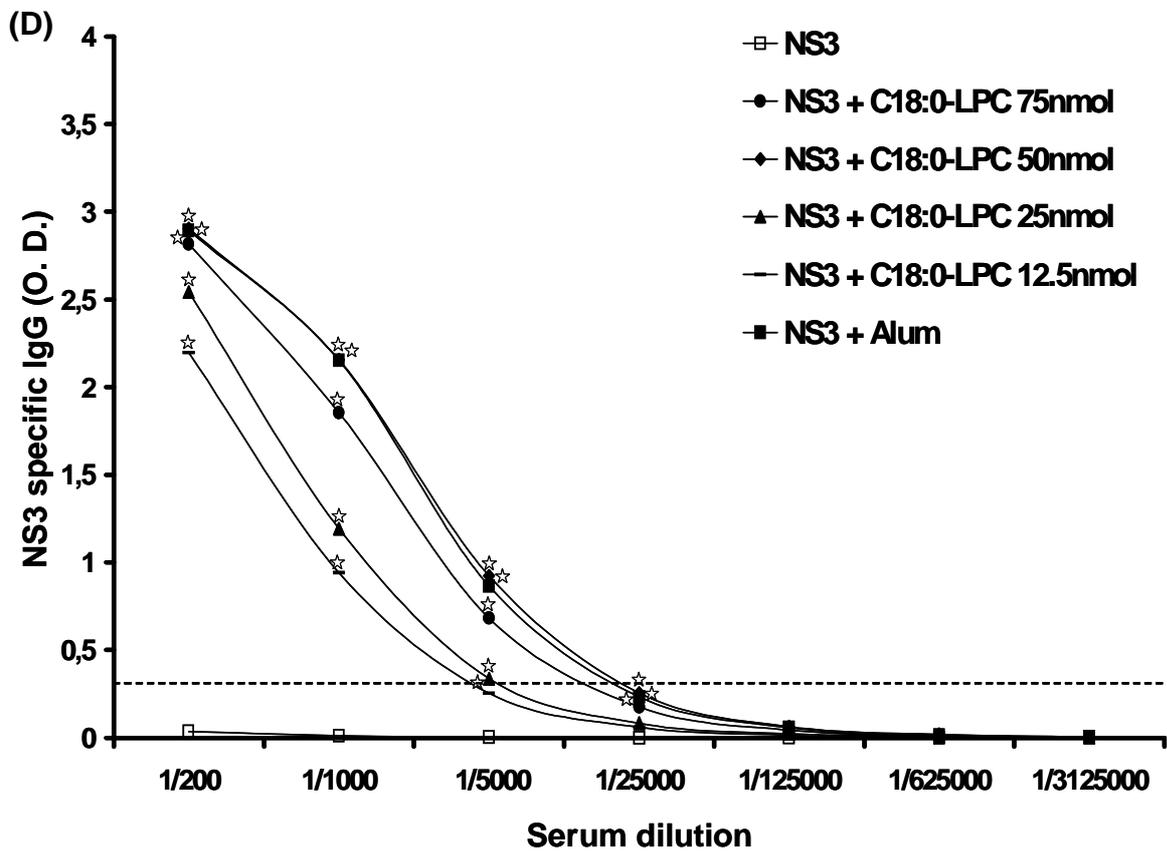
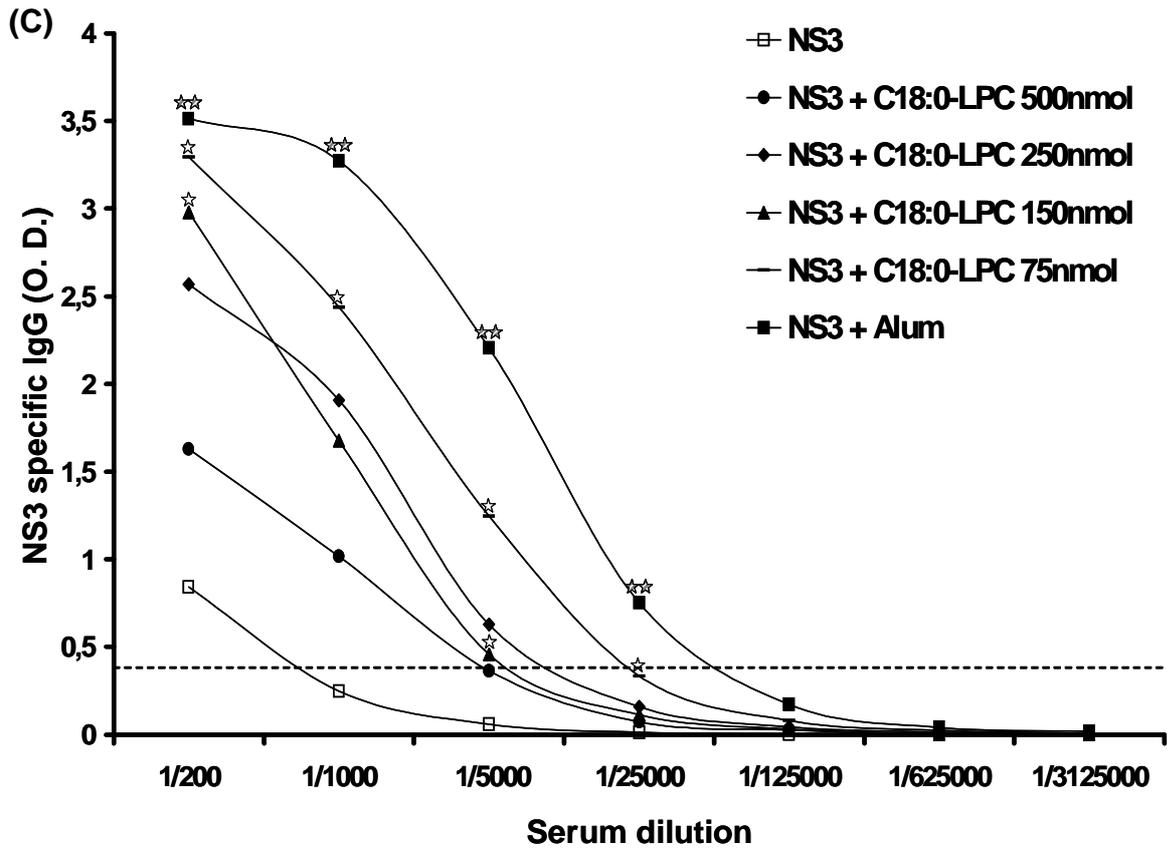


FIG. 7



III) Résultats complémentaires

Suite à l'identification du potentiel adjuvant des LPC C16 :0 et C18 :0, nous avons mené diverses études complémentaires à celles décrites dans l'Article 1 dont l'objectif est de caractériser les LPC plus finement et d'élargir nos connaissances sur leur pouvoir adjuvant. Nous avons tout d'abord cherché à obtenir des détails sur leur structure. Puis nous avons essayé de caractériser leur pouvoir adjuvant sur les réponses humorales contre un troisième antigène viral et leur aptitude à induire des réponses immunes cellulaires (immunogénicité vis-à-vis de protéines virales, d'un vecteur viral et fonctionnalité dans un modèle de challenge alternatif). Enfin dans une approche mécanistique, nous avons cherché à déterminer si ces LPC activent des récepteurs de l'immunité innée.

A. Caractérisation structurale de la LPC

Nous avons tout d'abord souhaité caractériser les LPC C16 :0 et C18 :0 pour avoir une vision structurale des LPC telles qu'elles sont utilisées dans nos expérimentations *in vivo*. Notre objectif était d'obtenir des informations structurales des LPC en solution et d'étudier les interactions entre les LPC et les antigènes viraux.

Les informations sur la structure des LPC en solution que nous cherchions sont en partie suggérées par les données du fournisseur (Avanti Polar Lipids) et la littérature [130]. Ils indiquent que les concentrations micellaires critiques, c'est-à-dire la concentration au-dessus de laquelle on considère que les lipides s'arrangent en micelles, sont de 4 à 8,3 μ M pour la LPC C16 :0 et de 0,4 μ M pour la LPC C18 :0. Ces valeurs sont largement inférieures aux concentrations utilisées dans nos expériences *in vitro* (40 μ M) et *in vivo* (minimum testé 12,5 nmole / 100 μ L soit 125 μ M) et implique que nos espèces de LPC sont sous forme de micelles en solution. Nous avons ensuite souhaité connaître la taille de ces micelles et avons pensé à deux techniques pour cela, la microscopie électronique à transmission (MET) et la diffusion dynamique de lumière (DLS). Nous n'avons pas utilisé la MET car la préparation

nécessaire des échantillons peut conduire à l'apparition d'artéfacts [372] et nous avons donc choisi la DLS qui permet l'analyse des particules en solution sous forme native.

Nous espérons donc déterminer la taille de nos micelles de LPC C16 :0 et C18 :0 seules puis souhaitons étudier l'impact de l'association avec les antigènes viraux sur la taille de la micelle.

1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS (dynamic light scattering) est une technique permettant la mesure de la taille de particules en suspension à l'échelle du sub-micron [171]. Elle est basée sur l'analyse du spectre de diffusion de la lumière obtenu après rencontre d'un faisceau laser ($\lambda=592$ nm) avec des particules en solution, soumises à des mouvements thermiques aléatoires (mouvements Brownien). L'analyse du spectre de la diffusion au cours du temps à une température donnée permet d'identifier le diamètre des particules. Cette technique est largement employée pour définir la taille de nanoparticules et s'assurer de l'homogénéité de particules en solutions.

Nous avons dans un premier temps analysé les solutions de LPC seules reprises dans un tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 5000 nmoles/mL similaire à la concentration injectée chez la souris. Les figures 4A (LPC C16 :0) et 4B (LPC C18 :0) présentent la distribution de la taille des particules en solution en fonction de l'intensité reçue par le détecteur. Chaque spectre se caractérise par l'indice de polydispersité (Pdl). C'est un indicateur de l'uniformité de l'échantillon et il est défini par une valeur comprise entre 0 et 1, caractérisant la solution de hautement homogène à désorganisée. Nous considérons que jusqu'à 0,5 les particules en solution sont homogènes et faiblement agrégées, permettant une analyse correcte des tailles des particules. On observe que l'échantillon de LPC C16 :0 (figure 4A), avec un Pdl de 0,328, présente un pic étroit caractéristique de structures micellaires à 11,08 nm avec une largeur de 3,09 nm. L'analyse indique que 82% des éléments de la solution possèdent ces caractéristiques (résultat non présenté). Un pic large

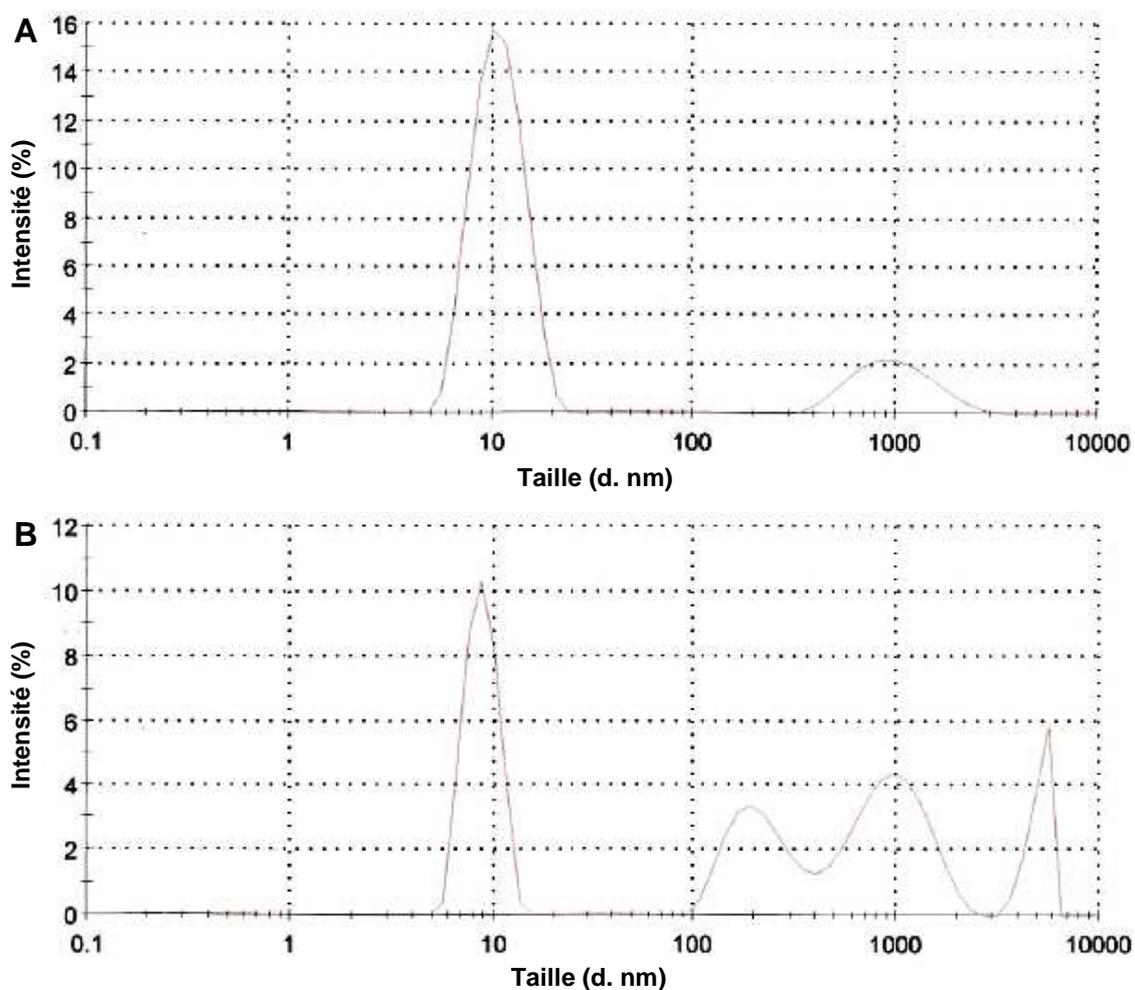


Figure 4: Spectres DLS des LPC C16:0 et C18:0 en solution. Les LPC C16 :0 (A) et C18 :0 (B) ont été analysées à une concentration de 5000 nmoles/mL en PBS. Les spectres présentent le profil des tailles des particules en solution en fonction de l'intensité détectée par l'analyseur. Les résultats sont représentatifs de deux expérimentations séparées

(471 nm) et minoritaire (18% des éléments de la solution possèdent ces caractéristiques) apparaît à 1040 nm, caractéristique de la présence d'agrégats. Le spectre des micelles de LPC C18 :0 (figure 4B) est plus hétérogène que celui de la LPC C16 :0 avec un Pdl égal à 0,628. Cette valeur nous indique que la solution est hétérogène et ceci est corrélé avec la présence simultanée d'un pic de micelles à 8,81 nm (35,3% des éléments de la solution, largeur 1,62 nm) et d'un pic d'agrégats à 973,9 nm (32,2% des éléments de la solution, largeur 388,9 nm). De plus, d'autres pics larges apparaissent et perturbent le signal de notre

pic d'intérêt pouvant le faire varier de 2 à 3 nm autour de 8,81 nm. En résumé nous n'avons pas pu conclure précisément sur la taille des micelles de LPC C18 :0 en solution.

Dans un second temps, nous avons analysé l'impact de la présence de la protéine NS3 hélicase sur la structure des particules de LPC C16:0. Un ml de la solution de LPC C16 :0 à 5000 nmoles/mL a été mélangé à 10 µg de NS3 hélicase créant ainsi une solution comparable à celle injectée chez les souris (*i. e.* 1µg NS3hel + 500 nmoles de LPC C16 :0 par souris). La figure 5 montre que le pic correspondant aux micelles de LPC est déplacé à 7,58 nm par rapport au composé analysé seul (figure 4A). Ce pic a une largeur de 1,66 nm, caractérise 75% des éléments de la solution et le Pdl indique une solution homogène (0,276). Il existe toujours un pic minoritaire à 299,3 nm (21,9% des éléments de la solution, largeur de 85,96 nm) qui n'influerait pas sur la qualité du résultat. Ceci nous indique que la présence de la NS3 hel a sans doute induit une contraction de la micelle de LPC C16 :0 et une analyse plus poussée serait nécessaire pour mieux comprendre et interpréter ce phénomène.

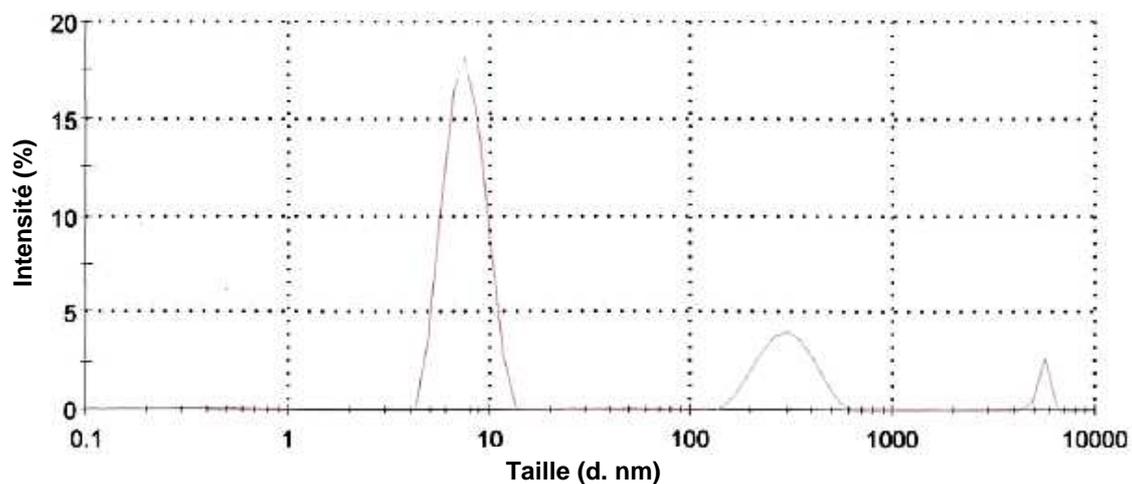


Figure 5: Spectre DLS de la LPC C16:0 associée à la protéine NS3 hélicase du VHC. Une solution de LPC C16 :0 (5000nmoles/mL) a été mélangée à 10 µg de la NS3 hel et le mélange a été analysé. Le graphique présente le profil des tailles des particules en solution en fonction de l'intensité détectée par l'analyseur. Le résultat est représentatif de deux expérimentations séparées.

Nous n'avons pas pu obtenir d'informations à partir de cette méthode pour l'analyse des perturbations des micelles de LPC en présence de l'HBsAg. En effet, nous n'avons pas réussi à analyser une solution d'HBsAg combinée à la LPC dans un rapport équivalent à celui que nous utilisons *in vivo* pour des raisons de sensibilité de l'appareil. Nous nous sommes alors tournés vers une technique de dichroïsme circulaire avec comme objectif de caractériser, cette fois, les perturbations subies par l'HBsAg en présence des micelles de LPC, et non l'inverse comme avec la DLS.

2. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une méthode d'étude de la structure secondaire des protéines en solution (*e. g.* arrangements en hélices α , feuillets β , boucles ...) [161]. Elle est basée sur l'analyse du spectre d'absorption d'une onde polarisée, de 180 nm à 260 nm, au travers de l'échantillon à analyser. Le temps d'analyse relativement court, de l'ordre d'une dizaine de minutes, permet d'étudier les modifications structurales, de type repliement et dénaturation, de la protéine au cours du temps. Nous avons donc utilisé le dichroïsme circulaire pour évaluer l'impact des LPC sur la structure des immunogènes viraux en débutant par l'analyse des antigènes seuls en solution.

L'une des premières difficultés rencontrées en dichroïsme réside dans le type de tampon dans lequel sont repris les éléments à analyser. En effet, différents tampons absorbent la lumière polarisée aux longueurs d'ondes utilisées dans cette méthode et interfèrent sur l'analyse. Or c'est le cas du tampon de chlorure de sodium (NaCl) dans lequel est repris notre HBsAg. Nous avons donc dialysé notre protéine dans un tampon pauvre en NaCl (50 mM) et évalué le spectre de l'échantillon. Une deuxième difficulté à laquelle nous avons été confronté est la concentration protéique requise pour obtenir un spectre interprétable en dichroïsme. En effet, au cours de l'analyse de la protéine HBsAg en tampon NaCl 50 mM, seuls les spectres établis avec des concentrations protéiques supérieures à 250 $\mu\text{g/mL}$ permettaient d'obtenir un signal suffisamment intense pour être analysé. Or, étant donné que nous souhaitons faire des analyses en conservant le rapport entre le nombre de

moles de LPC et la concentration d'HBsAg utilisée chez les souris *in vivo*, il aurait fallu pour maintenir ce rapport, une solution de LPC à 130 mg/mL en PBS, ce qui est difficile à réaliser car au-dessus de la limite de solubilité de la LPC. Cette dernière est estimée à 25-50 mg/mL dans un mélange chloroforme et méthanol qui sont, de plus, des solvants plus efficaces que le PBS avec lequel cette limite de solubilité serait sans doute abaissée (données Sigma-Aldrich). Ces contraintes ne nous ont pas permis d'évaluer les perturbations structurales des LPC sur la structure de l'HBsAg par dichroïsme circulaire.

En conclusion de ces analyses structurales, et de manière décevante, ces méthodes se sont révélées difficile à mettre en œuvre au regard des objectifs que nous avons fixés. Elles ne nous ont donc pas permis de faire un parallèle avec les données obtenues chez l'animal afin d'essayer de comprendre les mécanismes pouvant influencer l'immunogénicité. D'autres méthodes ou approches pourraient être proposées et seront décrites dans le chapitre Discussion.

B. Réponse humorale induite contre un antigène du VIH.

Dans nos essais *in vivo* chez la souris, nous avons montré l'aptitude des LPC à induire des réponses humorales contre la protéine NS3 du VHC et, dans une moindre mesure, contre la protéine HBsAg du VHB. Nous avons étendu ces analyses à un modèle infectieux particulièrement pertinent pour l'étude des réponses humorales, celui de la protéine gp120 du VIH, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Thomas VanCott de la société ABL (Lexington, MA). Les anticorps dirigés contre la protéine d'enveloppe gp120 pourraient être déterminants dans la protection contre l'infection par le VIH en limitant l'entrée du virus dans sa cible cellulaire (T CD4+). Diverses études ont montré que l'immunogénicité faible de la vaccination ADN pour induire des réponses humorales et cellulaires spécifiques d'antigènes viraux du VIH peut être augmentée en réalisant un boost protéique en présence d'un adjuvant [75;241]. Le développement clinique de ces protocoles peut cependant être limité par l'emploi d'adjuvants réactogènes. Dans ce

contexte, l'équipe ABL a induit chez la souris des réponses humorales spécifiques dirigées contre la gp120 ainsi que la sécrétion d'un panel mixte de cytokines Th1/Th2 en réalisant une vaccination ADN (codant pour un gène *env* modifié et délivré par électroporation) suivi d'un boost (protéine recombinante gp120 injectée en i. m.) associé à un adjuvant ayant un profil d'innocuité permettant d'envisager un développement clinique chez l'homme [74]. Dans cette étude, l'adjuvant utilisé comme contrôle positif pour le boost protéique est le QS21 (Antigenics). Cet adjuvant permet de maintenir chez les souris les titres d'anticorps anti-gp120 initiés par la vaccination ADN pendant 16 semaines et d'augmenter les sécrétions de cytokines Th1 (TNF α , IFN γ , IL-2) induites par le prime ADN. Ainsi, il nous est apparu intéressant de comparer dans ce modèle l'efficacité de l'adjuvantation de la gp120 par la LPC à celle du QS21 ainsi qu'à un adjuvant de référence, l'alun (sous la forme d'hydroxyde d'aluminium, Alhydrogel, Brenntag Biosector). Comme première expérience, nous avons initié une expérimentation basée uniquement sur des immunisations protéiques avant d'envisager de passer au schéma de prime / boost.

Au cours de cette étude, nous avons choisi d'évaluer l'adjuvant LPC C18 :0 dont le potentiel nous semble plus large car, contrairement à la LPC C16 :0, il a démontré un effet adjuvant vis-à-vis des deux antigènes viraux (NS3 hel et HBsAg). N'ayant que des résultats préliminaires sur les doses adjuvantes de la LPC C18 :0 au commencement de cette expérience, nous l'avons testée à trois doses (125, 250 et 500 nmoles) selon un schéma d'immunisation basé sur les protocoles expérimentaux de l'équipe du Dr VanCott [74]. Au cours de l'étude, nous avons déterminé le profil de sécrétion des cytokines TNF α , IFN γ , IL-2 (Th1) et IL-5, IL-4 (Th2) par les splénocytes des souris immunisées. De plus, les sera des animaux ont été récoltés et les productions d'anticorps anti-gp120 de type IgG et IgA déterminés par ELISA. Les sécrétions des muqueuses vaginales ont également été recueillies et ont été utilisées pour détecter la présence d'anticorps anti-gp120 de type IgA. En effet, la présence d'anticorps au niveau des muqueuses, porte d'entrée privilégiée du virus, a un rôle primordial dans la protection contre la primo-infection ou la réinfection. Des souris naïves ont été utilisées comme contrôle négatif pour définir les seuils de positivité de

sécrétion de cytokines (seuil équivalent à la valeur moyenne des sécrétions obtenues dans le groupe de souris naïves) et du test ELISA (seuil équivaut à la médiane de l'absorbance obtenue à la dilution 1/10 avec le groupe de souris naïves).

La figure 6A montre que l'injection de la gp120 en association avec le QS21 permet d'induire la production des cytokines Th1 par les splénocytes. Les valeurs moyennes de sécrétion sont à minima 5 fois supérieures à celles observées chez les souris contrôles pour le TNF α (504 pg/mL), l'IFN γ (4298 pg/mL) et l'IL-2 (906 pg/mL) et sont statistiquement supérieures à celles obtenues dans les autres conditions. Les splénocytes des souris immunisées avec la protéine adjuvantée par l'alun produisent en moyenne des quantités équivalentes au seuil de positivité fixé à 85 pg/mL pour le TNF α , et supérieures aux seuils de positivité de l'IFN γ et de l'IL-2 (respectivement fixés à 2,5 pg/mL et à 5 pg/mL, ici équivalents à la limite de détection) avec 84 pg/mL d'IFN γ et 117 pg/mL d'IL-2. La LPC C18 :0 ne permet pas l'induction de TNF α . En revanche, la LPC induit la production d'IFN γ et d'IL-2 par les splénocytes avec des sécrétions moyennes d'IFN γ de 68, 69 et 40 pg/mL et d'IL-2 de 68, 35 et 31 pg/mL pour les doses de 125, 250 et 500 nmoles, respectivement. Les sécrétions d'IFN γ et d'IL-2 par les souris immunisées avec l'alun et la LPC sont statistiquement supérieures à celles observées chez les souris naïves, et les sécrétions d'IL-2 sont statistiquement supérieures avec l'alun par rapport à la LPC (non présenté).

Les sécrétions moyennes d'IL-5 (pro-Th2) sont supérieures au seuil de positivité (fixé à 5 pg/mL) et similaires pour les trois adjuvants (641 pg/mL pour le QS21, 561 pg/mL pour l'alun, et pour la LPC C18 :0, 678 pg/mL à 125 nmoles, 359 pg/mL à 250 nmoles et 437 pg/mL à 500 nmoles) (figure 6B). Enfin, seules les splénocytes des souris immunisées avec le QS21, l'alun et la LPC C18 :0 (125 mM) présentent des sécrétions moyennes positives d'IL-4 bien que très faiblement positives (respectivement, 10, 5 et 6 pg/mL pour un seuil à 5 pg/mL) (figure 6B). En résumé, la LPC C18 :0 peut induire chez la souris la production de cytokines Th1 (IFN γ et IL-2) et Th2 (IL-5) par les splénocytes de souris immunisées avec la protéine gp120. Ces sécrétions restent statistiquement plus faibles que celles induites par le

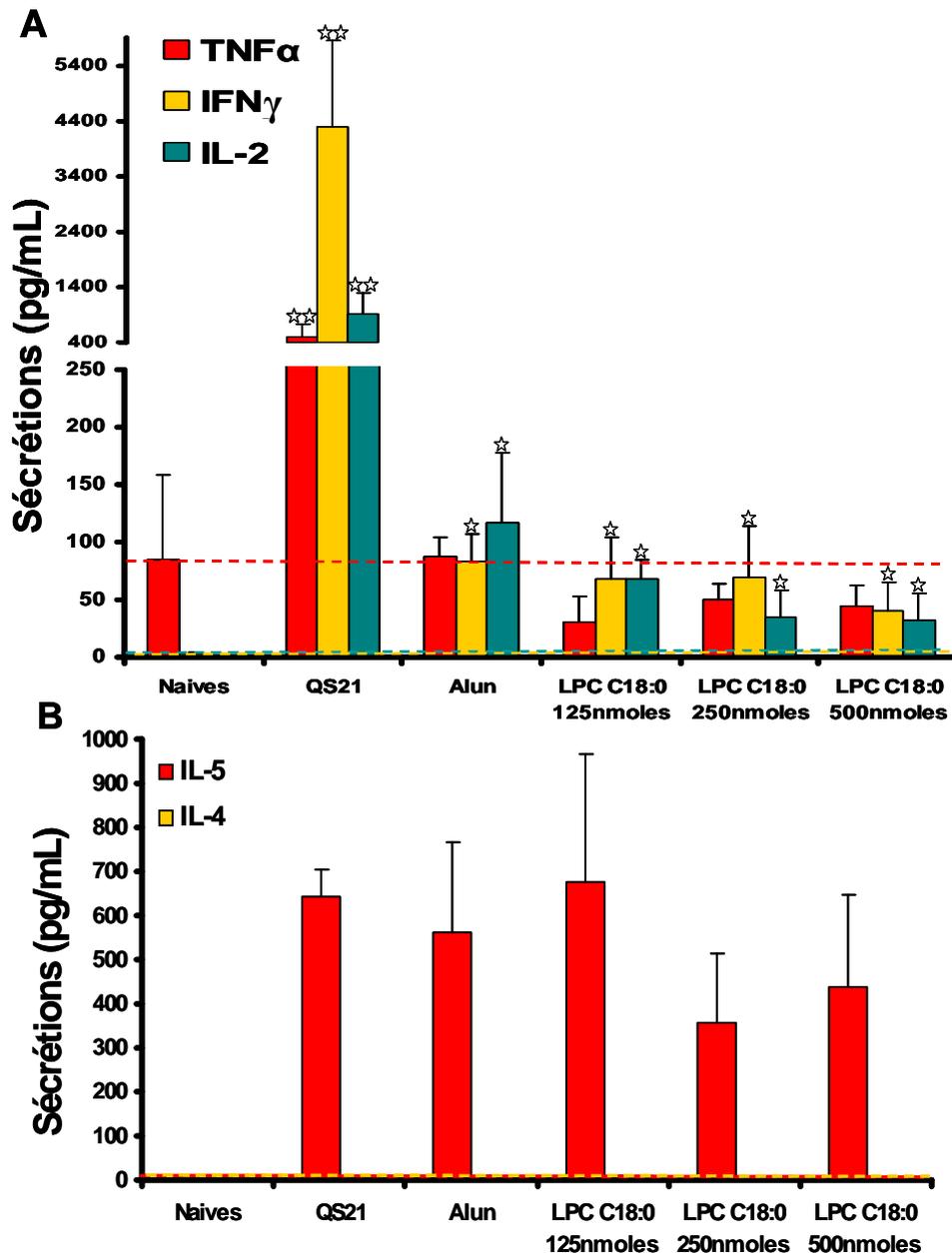


Figure 6: Evaluation des sécrétions de cytokines induites par l'adjuvantation de la protéine gp120. Des BALB/c (5 souris/groupe) ont été immunisées 3 fois à 2 semaines d'intervalle par voie intramusculaire (i. m.) avec 25 μ g de la gp120 combinée à 20 μ g de QS21, 250 μ g d'alun ou 125, 250 ou 500 nmoles de LPC C18 :0. Quinze jours après, les sécrétions des cytokines TNF α , IFN γ , IL-2 (A) et IL-5, IL-4 (B) ont été mesurées dans les surnageants de culture par CBA à partir des splénocytes stimulés 24h *in vitro* avec 1 μ g/mL d'un pool de peptides de la gp120 (constitué de 211 peptides de 15 acides aminés et chevauchants de 11 acides aminés). Les valeurs moyennes des sécrétions et les écart-types sont présentés en pg/mL. Le seuil de positivité correspond à la valeur moyenne des souris naïves et est indiqué par une barre horizontale hachurée de la couleur de la cytokine analysée. Une étoile indique une valeur statistiquement supérieure ($p < 0,05$) à la valeur des souris naïves, deux étoiles indiquent une valeur statistiquement supérieure ($p < 0,05$) à toutes les conditions. Seuils de positivité : TNF α : 85 pg/mL, IFN γ :2,5 pg/mL, IL-2,-4,-5: 5pg/mL.

QS21 mais sont proches, bien que généralement plus faibles mais sans être toujours statistiquement différentes, de celles induites par l'alun.

Nous avons ensuite mesuré les productions d'anticorps spécifiques anti-gp120 de type IgG dans les sera des animaux (figure 7). L'alun et le QS21 induisent la sécrétion d'Ig

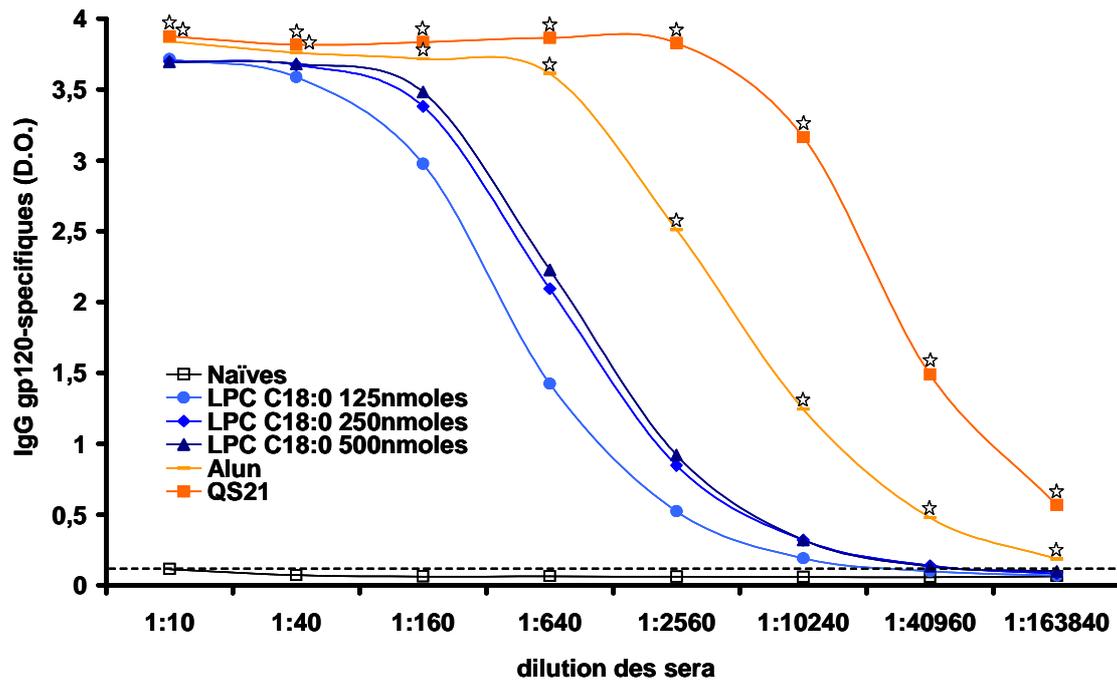


Figure 7 : Evaluation de l'effet adjuvant de la LPC C18 :0 sur les réponses humorales spécifiques contre la gp120. Les animaux ont été immunisés comme indiqué dans la figure 6. Quinze jour après, la présence d'IgG anti-gp120 dans les sera des animaux a été évaluée par ELISA. Le graphique présente les valeurs médianes des absorbances de chaque groupe à différentes dilutions. Le seuil de positivité (barre horizontale pointillée) est déterminé par la valeur médiane des sécrétions des souris naïves dans les sera dilués au 1/10 (le seuil est équivalent à 0,1). L'étoile indique une DO médiane statistiquement supérieure ($p < 0,05$) aux médianes des groupes immunisés avec la LPC C18 :0 et du groupe des souris naïves.

spécifiques de la gp120. Nous observons que toutes les doses de LPC C18 :0 induisent la production d'anticorps anti-gp120 jusqu'à la dilution 1/10240. Nous observons également un léger effet dose, à minima entre la plus faible dose (125 nmoles) et les deux supérieures (250 et 500 nmoles), sans que cette différence ne soit statistique. En revanche, l'alun et le

QS21 permettent des sécrétions d'anticorps significativement supérieures à celles obtenues chez les souris immunisées avec la LPC C18 :0. Enfin, les sécrétions d'IgA dans le sérum des animaux sont négatives quel que soit l'adjuvant utilisé (résultat non présenté). Les IgA du sérum sont une indication du degré de la réponse humorale dans les muqueuses, et en effet, la recherche d'IgA anti-gp120 par ELISA n'a pas permis de détecter ces anticorps dans la muqueuse vaginale (résultat non présenté).

Dans leur ensemble, et en accord avec nos précédentes observations, ces résultats suggèrent que la LPC C18 :0 oriente les réponses immunitaires vers un profil Th2, ici caractérisées par l'induction des sécrétions spléniques d'IL-5 concomitantes avec une faible production d'IFN γ et d'IL-2 ressemblant au profil d'un adjuvant Th2 de référence (alun). Le pouvoir adjuvant de la LPC C18 :0 sur l'induction de réponses humorales contre la gp120 a été clairement mis en évidence bien qu'il ne se soit pas montré supérieur à celui de l'alun ou du QS21 dans cette étude. Nous n'avons donc pas poursuivi l'évaluation de la LPC C18 :0 en tant qu'adjuvant de la gp120 dans un protocole de prime ADN / boost pour la vaccination contre le VIH.

C. Réponses immunes cellulaires induites par les LPC

Parallèlement à nos études du pouvoir adjuvant de la LPC sur les réponses immunes humorales, nous avons voulu savoir si la LPC a un potentiel adjuvant sur l'induction de réponses immunes cellulaires. Nous avons pour cela travaillé dans différents modèles d'immunisations basés sur des protéines virales (NS3 du VHC, HBsAg du VHB et E7 du VPH) et nous avons évalué le potentiel adjuvant de la LPC à l'aide de tests fonctionnels *in vitro* (ELISpot, ICS, test de cytotoxicité) et *in vivo* (test d'épreuve par une Listéria recombinante pour la protéine NS3 du VHC) (voir Annexe technique). Nous nous sommes aussi intéressés à l'activité adjuvante de la LPC sur l'immunogénicité d'un vecteur viral MVA recombinant. L'ensemble de ces résultats est présenté dans la suite de ce mémoire.

1. Evaluation des réponses immunes cellulaires contre des antigènes viraux

Nous avons tout d'abord évalué le potentiel adjuvant de réponses cellulaires des LPC C16 :0 et C18 :0 contre les deux antigènes viraux utilisés dans les études de la réponse humorale. Toutefois, dans nos expériences et avec les analyses effectuées qui sont décrites dans le tableau 2, nous n'avons pas pu détecter de réponses positives contre les protéines NS3 hel et HBsAg et ce, même en utilisant des adjuvants de référence (CpG-ODN1826 et CFA).

Tableau 2 : Expériences conduites pour la mise en évidence de réponses immunes cellulaires induites par les LPC contre les antigènes viraux NS3 hel et HBsAg.

Lignée murine	Antigène	Voie d'immunisation	Schéma d'immunisation	LPC	Contrôle positif	Analyses	Cellules analysées
HLA-B7	NS3 hélicase VHC (10µg)	s. c. base de la queue	2 inj. 2 sem intervalle - Analyse 15 j après	C16:0, C18:0 et C18:1 (500 nmoles)	CpG-ODN1826 (20µg)	ELISpot/ICS IFN γ	Splénocytes
HLA-A2	HBsAg VHB (10µg)	s. c. base de la queue	2 inj. 2 sem intervalle - Analyse 15 j après	C18:0 (500 nmoles)	CpG-ODN1826 (20µg) et CFA	ELISpot/ICS IFN γ /CIL-CFSE	Splénocytes

Devant ces résultats négatifs, nous avons alors cherché à induire une réponse cellulaire adjuvantée par la LPC C18 :0 et mesurable en testant différents antigènes, tests fonctionnels, méthodes d'analyses et lignées murines.

a. Réponses cellulaires contre la protéine NS3 du VHC

Tout d'abord, nous avons évalué le potentiel adjuvant de la LPC en utilisant une autre forme de la protéine virale NS3 du VHC. Nous nous sommes orientés vers la protéine NS3 commercialisée par la société Mikrogen (NS3 Mkg, génotype 1a, contient les domaines hélicase et protéase de la NS3, acide aminé 1007 à 1534) avec laquelle nous avons précédemment détecté des réponses cellulaires, bien que faibles (en moyenne 60 SFU-

spots forming units- par 10^6 splénocytes), en présence de CpG-ODN1826 dans le modèle de souris transgéniques pour la molécule HLA-B7. L'utilisation de cet immunogène avec la LPC était potentiellement limitée par le fait que la NS3 Mkg est reprise dans un tampon contenant 0,1% de SDS (sodium dodecyl sulfate) dont la présence est susceptible de déstabiliser la structure de notre adjuvant. Nous avons donc réalisé une étude préliminaire pour savoir si l'activité détergente du SDS n'avait pas un effet délétère sur la structure de la LPC et donc éventuellement sur sa fonction adjuvante. Cette étude a consisté à reprendre la protéine NS3 hélicase dans la même concentration de SDS que celle dans laquelle est reprise la NS3 Mkg et à vérifier que la réponse humorale induite contre la NS3 hel par la LPC n'est pas altérée par rapport à un mélange sans SDS (expérimentation similaire à celle décrite dans les Résultats, Chapitre II) B.1.b). Les souris BALB/c ont été injectées avec la NS3 hélicase seule ou associée à l'adjuvant LPC C18 :0 et en présence de 0.044% ou 0.0044% de SDS. Ces valeurs correspondent à l'apport de SDS que nous aurions si, respectivement, 10 μ g et 1 μ g de NS3 Mkg étaient injectés à une souris. Trois semaines après la dernière injection, la présence d'Ig totales anti-NS3 hel dans les sera des souris a été mesurée par ELISA. L'analyse révèle que la présence du SDS n'impacte pas la réponse humorale induite par la LPC C18 :0 et suggère que nous pouvons utiliser la protéine NS3 Mkg jusqu'à une concentration de 10 μ g sans que le SDS présent ne soit délétère par rapport à l'activité de la LPC (résultat non présenté).

Nous avons donc ensuite évalué l'effet adjuvant de la LPC C18 :0 sur la réponse immune cellulaire induite par la protéine NS3 Mkg dans les souris transgéniques HLA-B7. Le protocole d'immunisation, basé sur les précédents résultats du laboratoire, a consisté à immuniser les souris avec la NS3 Mkg en présence de la LPC C18 :0 ou de CpG-ODN1826. Nous avons inclus une injection unique d'adénovirus (AdNS3-4, recombinant pour la protéine NS3-4 du VHC) dont nous savons qu'il induit des réponses cellulaires fortes chez ces souris. Les splénocytes des animaux ont été mis en culture pour détecter les lymphocytes T producteurs d'IFN γ par ELISpot et par marquage intracellulaire de cytokine (ICS) sur les populations T CD4+ et CD8+.

Comme attendu pour l'ELISpot, les splénocytes des souris immunisées avec la NS3 Mkg + CpG-ODN1826 sécrètent de l'IFN γ en réponse à la stimulation protéique NS3 Mkg (les fréquences se répartissent de 53 à 118 SFU/10⁶ splénocytes, figure 8) et l'AdNS3-4 induit la production de cellules sécrétrices d'IFN γ en réponse à une stimulation spécifique par des épitopes CD8 HLA-B7 restreints du domaine protéase de la NS3 (les fréquences se répartissent de 58 à 85 SFU/10⁶ pour WPA10 et de 245 à 329 SFU/10⁶ pour LSP10).

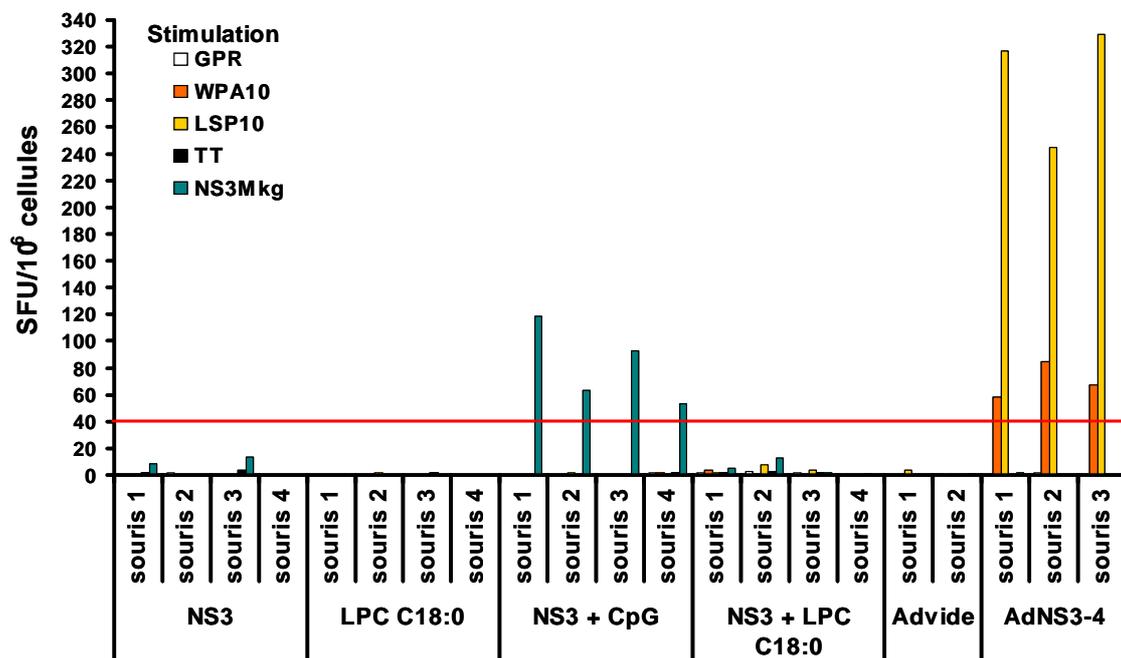


Figure 8 : Evaluation de l'effet adjuvant de la LPC C18 :0 sur les réponses cellulaires spécifiques contre la protéine NS3 Mkg du VHC. Des souris HLA-B7 (4 souris/groupe) ont été immunisées 3 fois à 1 semaine d'intervalle par voie sous-cutanée (s. c.) avec soit 10 μ g de la NS3 Mkg, soit 500 nmoles de LPC C18 :0, soit une combinaison de NS3 Mkg et 20 μ g de CpG-ODN1826 ou 500 nmoles de LPC C18 :0. Un groupe contrôle positif (AdNS3-4, 3 souris) et son propre contrôle négatif (Advide, 2 souris) ont été inclus et injectés en i. m. à 1 reprise (10⁹ IU/souris). Quinze jours après, les fréquences de LT sécréteurs d'IFN γ ont été évaluées par ELISpot à partir des splénocytes stimulés 40h *in vitro* avec des peptides (GPR, non pertinent ; WPA10 et LSP10) et des protéines (toxine tétanique, non pertinente et NS3 Mkg). Le graphique présente les fréquences de LT IFN γ + exprimées en SFU par million de splénocytes. La barre horizontale rouge indique le seuil positif fixé à 40 SFU/10⁶ cellules. Séquences des peptides : GPR : GPRLGVRAT, WPA10 : WPAPPGARSM, LSP10 : LSPRPVSYLK.

En revanche, la LPC C18 :0 est incapable d'induire la production d'IFN γ par les splénocytes de souris HLA-B7. Nous avons ensuite montré dans l'analyse ICS que la NS3 Mkg associée au CpG-ODN1826 stimule la sécrétion d'IFN γ par les LT CD4+ des splénocytes (0,111 à 0,316% de LT CD4+IFN γ +) et suggère que la réponse observée en ELISpot soit majoritairement assurée par ces cellules (figure 9A). L'AdNS3-4 est également positif dans le test ICS et la réponse semble ici assurée par les LT CD8+ comme le montrent les fréquences de LT CD8+IFN γ obtenues après stimulation avec les épitopes HLA-B7 restreints (de 0,224% à 0,515% pour WPA10 et de 2,064% à 3,706% pour LSP10, figure 9B). Dans le test ICS et en accord avec l'ELISpot, la LPC C18 :0 n'induit pas de cellules productrices d'IFN γ dans les splénocytes des animaux.

En résumé, dans ce premier modèle d'adjuvantation de la protéine NS3 Mkg, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une capacité de la LPC C18 :0 à induire des lymphocytes T CD4+ et CD8+ sécréteurs d'IFN γ .

b. Réponses cellulaires contre la protéine E7 du VPH

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence le pouvoir adjuvant de la LPC C18 :0 vis-à-vis d'un autre immunogène protéique. Nous avons choisi la protéine E7 du VPH (génotype 16) pour laquelle nous avons mis en évidence au laboratoire des réponses cellulaires chez les souris C57BL/6 par ELISpot IFN γ (en moyenne 150 SFU/10⁶ splénocytes) après injection de la protéine avec du CpG-ODN1826. Le protocole a donc consisté à immuniser les souris avec la protéine associée à la LPC C18 :0 ou au CpG-ODN1826 et analyser les productions d'IFN γ induites dans les splénocytes par ELISpot et ICS.

Dans les tests fonctionnels de l'ELISpot, contrairement aux résultats précédents du laboratoire, et de l'ICS des LT CD4+, le groupe positif ne permet malheureusement pas l'induction de LT producteurs d'IFN γ empêchant l'interprétation de ces tests (résultat non présenté). En revanche, l'analyse ICS montre que les LT CD8+ des splénocytes des

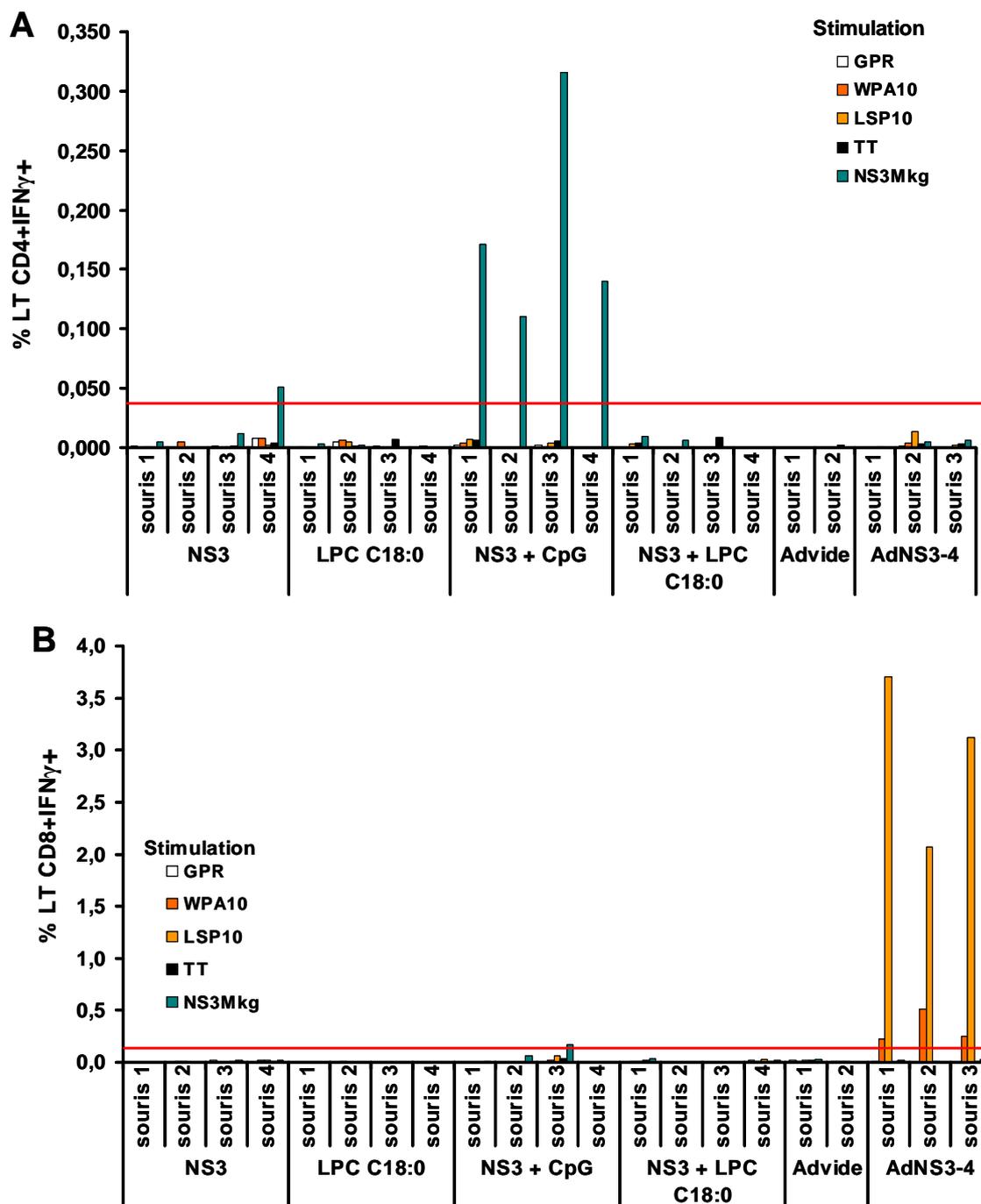


Figure 9 : Evaluation de l'effet adjuvant de la LPC C18:0 sur les réponses cellulaires spécifiques contre la protéine NS3 Mkg du VHC. Les animaux ont été immunisés et les splénocytes stimulés *in vitro* comme indiqué dans la figure 8. Seize à 18h après la stimulation, les fréquences de LT CD4+ (A) et CD8+ (B) sécréteurs d'IFN γ ont été mesurées par ICS. La barre horizontale rouge indique le seuil positif fixé à 0,032% (A) et à 0,095% (B). Séquences des peptides : GPR : GPRLGVRAT, WPA10 : WPAPPGARSM, LSP10 : LSPRPVSYLK.

animaux du groupe positif produisent de l'IFN γ en réponse à la stimulation avec les deux peptides de la protéine E7 testés (de 0,032% à 0,224% de LT CD8+IFN γ + dans les splénocytes de ces souris, figure 10). De manière décevante, la LPC C18 :0 ne permet pas d'induire de réponse positive détectable par ICS en association avec la protéine E7 et ce quelle que soit la restimulation.

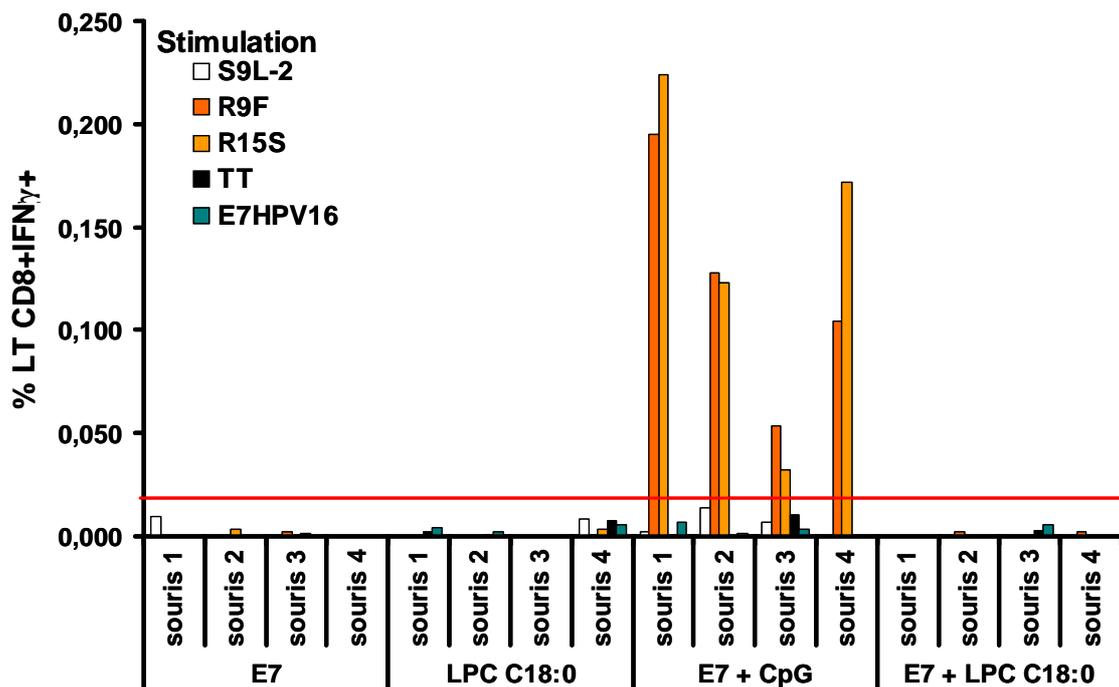


Figure 10: Evaluation de l'effet adjuvant de la LPC C18 :0 sur les réponses cellulaires spécifiques contre la protéine E7 du VPH. Des souris C57BL/6 (4 par groupe) ont été immunisées 3 fois à 1 semaine d'intervalle par voie s. c. avec soit 10 μ g de la protéine E7, soit 500 nmoles de la LPC C18 :0, soit une combinaison de E7 et 20 μ g de CpG-ODN1826 ou 500 nmoles de LPC C18:0. Sept jours après, les pourcentages de LT CD8+ sécréteurs d'IFN γ ont été mesurés par ICS à partir des splénocytes stimulés 16-18h *in vitro* avec des peptides (S9L-2, peptide non pertinent ; R9F et R15S) et des protéines (TT, E7). La barre horizontale rouge indique le seuil positif fixé à 0,02% (voir Annexe technique). Séquences des peptides : S9L-2 (peptide issu de la protéine mucine 1) : SAPDNRPAL, R9F : RAHYNIVTF, et R15S : RAHYNIVTFCKCDS.

Au cours des deux expérimentations précédentes, seules les réponses spléniques ont été analysées. Nous avons donc essayé de mettre en évidence les réponses dans un

autre organe lymphoïde, et avons choisi les ganglions drainants du site d'injection dans lesquels les antigènes sont dirigés par les cellules présentatrices d'antigènes après l'immunisation. Nous espérons ainsi augmenter nos chances de détecter, si ils existent, les lymphocytes T sécréteurs d'IFN γ spécifiques de l'antigène viral induits. Ainsi, nous avons évalué les réponses immunes cellulaires dans les ganglions rassemblés en pool par groupe d'immunisation, en utilisant le protocole décrit précédemment pour la protéine E7 et l'ELISpot a été utilisé pour l'analyse (voir Annexe technique). Les réponses dans la rate des animaux rassemblés en pool par groupe d'immunisation ont également été incluses car, contrairement à l'expérimentation précédente, les cellules ont subi une étape de purification sur ficoll avant la restimulation pour essayer de travailler avec une population plus pure de splénocytes.

L'immunisation des souris avec la protéine E7 combinée au CpG-ODN1826 permet d'induire des fréquences de lymphocytes T sécréteurs d'IFN γ positives (seuil positif à 3 SFU/10⁶ cellules), bien que faibles, dans les ganglions (fréquence 41 SFU/10⁶ cellules) et dans la rate des animaux (6 SFU/10⁶ cellules) en réponse à la stimulation avec les peptides C57BL/6 restreints de la protéine E7 (R9F et R15S, figure 11). Malheureusement, les animaux immunisés avec la protéine E7 + LPC C18 :0 ne développent pas de réponses positives dans ce protocole, que ce soit dans les ganglions ou la rate.

2. Evaluation de l'effet adjuvant des LPC dans un modèle d'épreuve alternative

Au-delà des tests fonctionnels *in vitro* avec lesquels nous n'avons pas pu déterminer d'activité adjuvante pour la LPC C18 :0, nous avons cherché à caractériser son effet adjuvant dans un test fonctionnel *in vivo* utilisé classiquement au laboratoire [105].

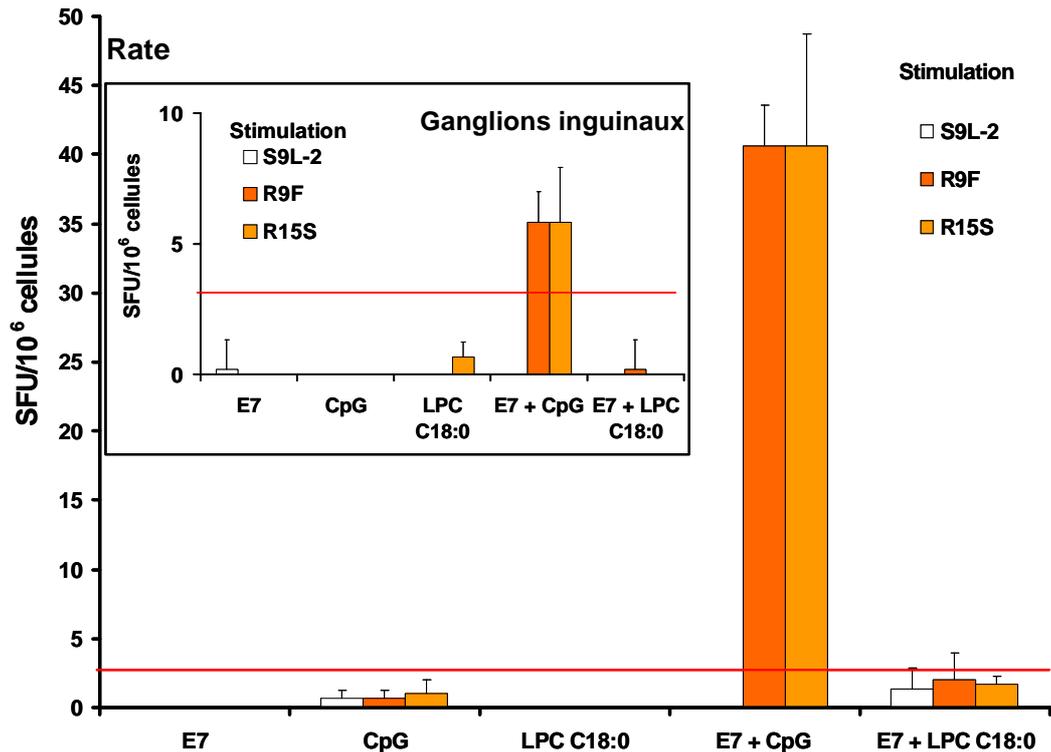


Figure 11: Evaluation de l'effet adjuvant de la LPC C18:0 sur les réponses cellulaires spécifiques contre la protéine E7 du VPH dans les ganglions et dans la rate. Des souris C57BL/6 (5 par groupe) ont été immunisées 3 fois à 1 semaine d'intervalle par voie s. c. avec soit 10 µg de la protéine E7, soit 10 µg de CpG-ODN1826, soit 500 nmoles de LPC C18:0, soit une combinaison de ces produits. Sept jours après, les fréquences de LT sécréteurs d'IFN γ ont été évaluées par ELISpot à partir des splénocytes purifiés par ficoll et des cellules des ganglions inguinaux (graphique encadré), rassemblés en un pool par groupe d'immunisation, et stimulés 20h *in vitro* avec les peptides indiqués. Le graphique présente les fréquences de LT IFN γ + exprimées en SFU par million de splénocytes. La barre horizontale rouge indique le seuil positif fixé à 3 SFU/10⁶ (moyenne des valeurs observées en culture en milieu seul + 2 fois l'écart-type).

a. Description du modèle

Afin de réaliser l'évaluation fonctionnelle des réponses immunes de ses candidats vaccins VHC contre la protéine NS3, le laboratoire Transgene utilise un modèle d'épreuve alternative basé sur l'infection par une *Listéria monocytogenes* recombinante pour la protéine NS3 (TC-LNS3) [310]. Cette bactérie intracellulaire exprime une protéine NS3 de génotype 1a (acides aminés 1027 à 1656) du VHC et est capable, entre autres organes, d'infecter et de se répliquer dans le foie et la rate des souris permettant d'obtenir l'expression

de NS3 dans ces tissus, mimant dans une certaine mesure l'infection hépatique naturelle par le VHC. La réponse protectrice contre la *L. monocytogenes* est notamment conférée par les réponses LT CD8+ spécifiques de l'antigène [18]. Ce modèle nous permet donc d'évaluer un candidat vaccin contenant la protéine NS3 dans sa capacité à induire des réponses CD8+ fonctionnelles, NS3 spécifiques, qui peuvent migrer vers la rate et le foie et réduire le titre bactérien. En pratique, après l'injection intraveineuse de 1 LD50 (9×10^7 colony-forming units ou CFU) de la TC-LNS3, l'efficacité du candidat vaccinal testé se mesure par titration des colonies bactériennes résiduelles dans les organes cibles (voir Annexe technique). L'infection par la bactérie TC-LNS3 n'étant pas chronique, la titration des bactéries résiduelles se fait dans un laps de temps de 48h après l'épreuve.

Nous avons utilisé ce modèle d'épreuve pour évaluer l'effet adjuvant de la LPC en la combinant à la protéine NS3. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur les précédents résultats positifs générés en utilisant la NS3 Mkg et le protocole décrit (Chapitre III), paragraphe C.1.a). Cette protéine a l'avantage d'être de même génotype que la protéine exprimée par la TC-LNS3 ce qui nous place dans des conditions favorables pour induire des réponses protectrices. Le contrôle positif de protection de l'expérience est réalisé en injectant une dose sub-létale (0,1 LD50), dite dose vaccinale, unique de TC-LNS3 parallèlement à la troisième injection vaccinale. Quinze jours après la dernière immunisation, les animaux sont éprouvés avec une dose de 1LD50 de TC-LNS3 et 48h après les titres bactériens sont mesurés dans les foies et les rates de chaque animal. Les résultats sont présentés en exprimant le logarithme du nombre de CFU par milligramme de tissu (log (CFU/mg de tissu)).

b. Résultats

Dans ce test, aucun résultat positif de protection n'est observé avec la LPC C18 :0. A titre d'exemple, les résultats de titration dans la rate sont montrés (figure 12). Le témoin positif de protection TC-LNS3 (dose vaccinale) confère une protection (les titres bactériens sont réduits à 1,06 et à 0 log (CFU/mg de rate)). En revanche dans ce protocole, quelle que

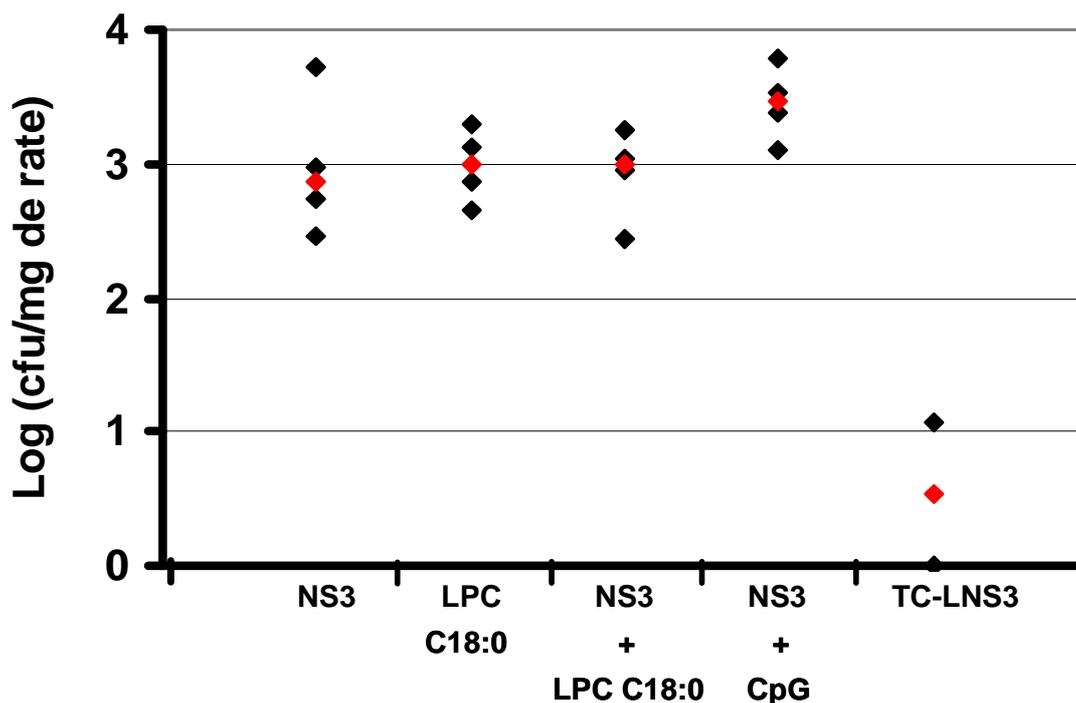


Figure 12: Titres bactériens résiduels dans la rate des souris dans un modèle d'épreuve alternative. Des souris C57BL/6 (4 souris/groupe) ont été immunisées 3 fois à 1 semaine d'intervalle par voie s.c. avec soit 10 µg de NS3 Mkg, soit 500 nmoles de LPC C18 :0, soit une combinaison de NS3 Mkg et 500 nmoles de LPC C18 :0 ou 20 µg de CpG-ODN1826. Deux souris contrôles positifs ont été immunisées avec 0,1LD50 de TC-LNS3 (dose vaccinale). Quinze jours après, une épreuve bactérienne a été réalisée en injectant 1LD50 de TC-LNS3 en i. v., et 48h après les animaux ont été sacrifiés. Les rates ont été prélevées et la titration des bactéries résiduelles effectuée par étalement des suspensions cellulaires de la rate sur gélose BHI (voir Annexe technique). Le losange noir représente une souris et le losange rouge indique la médiane de chaque groupe. Les résultats sont exprimés en logarithme du nombre de CFU par milligramme de rate.

soit l'adjuvantation de la NS3 (CpG ou LPC C18 :0), aucune baisse du titre bactérien n'est induite. Cet essai n'a donc pas permis de révéler un potentiel adjuvant de réponse protectrice de la LPC C18 :0.

Malgré l'évaluation de plusieurs antigènes, dans plusieurs modèles murins et avec différents test fonctionnels, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence un quelconque potentiel adjuvant de réponses cellulaires des LPC (C18 :0 essentiellement). Ce point fera l'objet d'un chapitre dans le paragraphe Discussion.

D. Effet adjuvant des LPC sur l'immunogénicité d'un vecteur viral

MVA

Au-delà d'un potentiel adjuvant sur des immunogènes protéiques, nous avons voulu savoir si la LPC était capable d'augmenter l'immunogénicité d'un antigène vectorisé notamment par un vecteur viral MVA (modified virus of Ankara) qui constitue la plate-forme vectorielle principale de Transgene. Le MVA est une souche du virus de la vaccine (VV) atténuée par passages successifs sur cellules embryonnaires de poulet. Trois candidats vaccins de Transgene basés sur ce vecteur sont en cours de développement clinique, le TG4001 (MVA-HPV-IL2), le TG4010 (MVA-MUC1-IL2) et le TG4040 (MVA-HCV). Mon laboratoire d'accueil a développé le TG4040 [105] qui code pour les protéines NS3-NS4 et NS5B du VHC et qui est actuellement en essai clinique thérapeutique de phase I chez des patients infectés chroniquement par le VHC et naïfs de traitement. Le TG4040 est donc utilisé dans ma thèse comme modèle pour évaluer l'activité adjuvante de la LPC sur l'immunogénicité d'un vecteur viral. Toutefois, la LPC étant connue pour avoir une activité détergente sur les membranes biologiques et le MVA étant un virus enveloppé par une à plusieurs couches de lipides, nous pouvions craindre une perturbation de la structure et donc de la fonction du MVA par le contact avec l'adjuvant. Nous avons donc voulu réaliser une étude préliminaire *in vitro* pour savoir si la LPC affectait le pouvoir infectieux du TG4040 avant d'étudier le potentiel adjuvant de la LPC sur l'immunogénicité du vecteur chez la souris.

1. Influence de la LPC sur le pouvoir infectieux du TG4040

Pour évaluer l'impact de la LPC sur l'infectivité du TG4040 nous avons mis en contact la LPC C16 :0 ou C18 :0 et le TG4040 pendant 1 heure à température ambiante afin de mimer les interactions qui se produiront avant l'injection aux animaux. Les mélanges ont été

étalés sur un tapis cellulaire de BHK-21, qui sont des lignées de fibroblastes rénales de bébé hamster permissives pour le TG4040, puis l'infectivité du TG4040 a été suivie par ELISA.

Nous observons sur la figure 13 que l'anticorps utilisé pour la détection (anti-VV) se fixe non spécifiquement sur les BHK-21 non infectées créant un bruit de fond élevé (DO moyenne = 1,3 et écart-type = 0,07), et donnant un seuil de positivité de 1,45 (moyenne + 2 écarts-type). Malgré cela, l'infectivité du TG4040 est distinguable du bruit de fond et montre

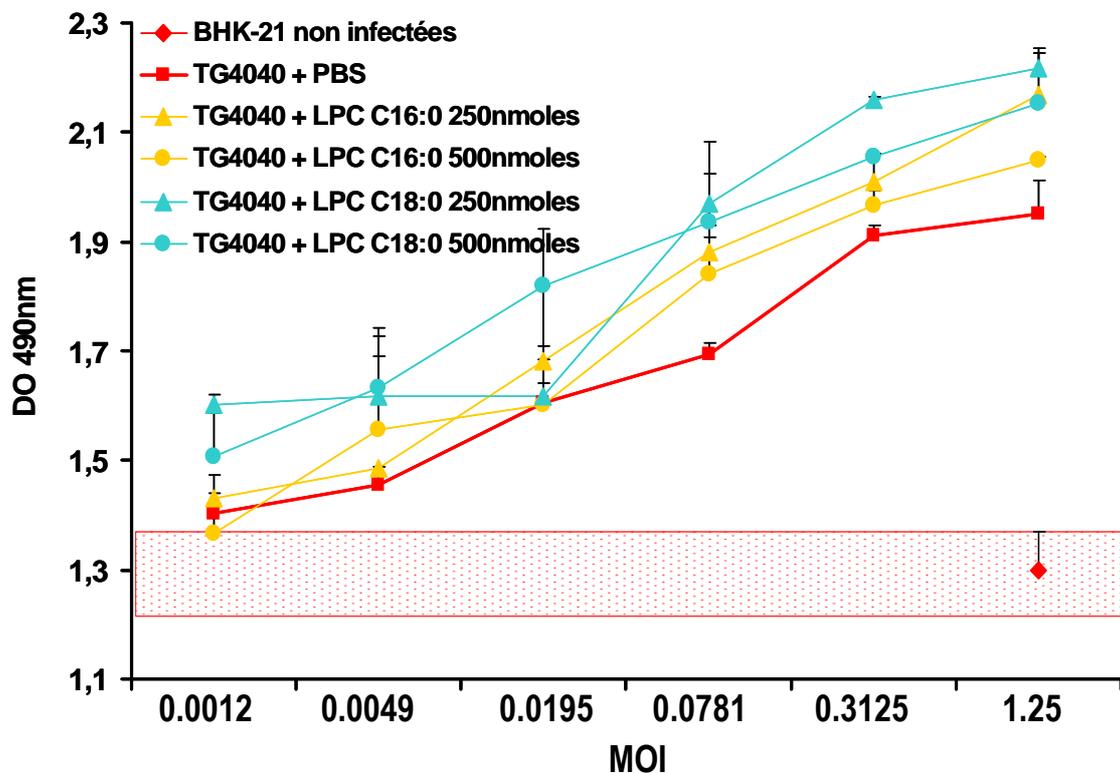


Figure 13 : Suivi de l'infectivité du TG4040 sur BHK-21 en présence des LPC C16 :0 et C18 :0. Différents mélanges constitués de TG4040 en présence de PBS (courbe rouge), de LPC C16 :0 (courbes oranges) ou de C18 :0 (courbes bleues) à 250 (triangles) ou 500 (ronds) nmoles ont été incubés 1 heure à température ambiante. Ces mélanges ont ensuite été étalés en duplicata et en dilution en cascade (5 dilutions, facteur de dilution 4) sur des cellules BHK-21 en partant d'une multiplicité d'infection (MOI) de 1,25. L'infection des BHK-21 par le TG4040 a été mesurée 18 à 24h après par une détection colorimétrique à 490 nm de la présence de structure MVA (voir Annexe technique). Le graphique présente les DO moyennes et l'écart-type à 490 nm pour chaque condition en fonction de la MOI testée. Des cellules BHK-21 non infectées (moyenne : losange rouge, zone pointillée : écart-type) et infectées avec le TG4040 en présence de PBS ont servi de contrôle négatif et positif de l'infectivité, respectivement.

la correcte infection des BHK-21 par le TG4040 seul. De même, quelle que soit la dose de LPC C16 :0 et C18 :0 utilisée avec le TG4040, l'infectivité apparaît équivalente au témoin TG4040 seul jusqu'à une MOI de 0,0012 où les DO atteignent la limite du seuil de positivité. En résumé, ces résultats indiquent que la LPC n'a pas une activité délétère sur la structure du TG4040 qui affecterait son infectivité, et pourra être utilisée *in vivo* comme nous le souhaitons afin d'évaluer son effet adjuvant sur l'immunogénicité du TG4040.

2. Activité adjuvante de la LPC sur l'immunogénicité du TG4040

Après avoir vérifié l'impact négligeable des LPC sur l'infectivité du vecteur TG4040 *in vitro*, nous avons pu évaluer si les LPC C16 :0 et C18 :0 pouvaient moduler les réponses cellulaires induites par ce vecteur viral chez la souris. Nous avons pour cela utilisé un protocole d'immunisation et des analyses pratiquées au laboratoire qui ont été utilisés pour la caractérisation de l'immunogénicité du candidat vaccin TG4040 [105].

Des souris transgéniques HLA-B7 ont été injectées avec du TGN33 (contrôle négatif, ne contient aucun insert) ou du TG4040, seuls, ou en présence de la LPC C16 :0 ou C18 :0. Nous avons choisi la dose de 250 nmoles pour les LPC car les données accumulées au moment de cette étude nous semblaient en faveur d'une meilleure réponse à cette dose comparée aux 500 nmoles utilisées jusqu'alors. Les splénocytes des animaux immunisés ont été utilisés pour la détection des LT sécréteurs d'IFN γ par ELISpot et ICS.

Tout d'abord, les résultats de l'ELISpot indiquent que le TG4040 injecté seul induit des cellules productrices d'IFN γ dans toutes les souris après restimulation avec le peptide WPA10 et / ou LSP10 (chaque souris répond à au moins un des peptides, résultat non présenté). Les fréquences moyennes détectées par souris s'échelonnent de 47 à 418 spots/10⁶ cellules. En revanche, les LPC C16 :0 et C18 :0 associées au TG4040 n'induisent que rarement une réponse positive dans ce test (un maximum de 2 souris par groupe sont positives aux peptides mais à faible fréquence). Ensuite, l'analyse ICS des LT CD8+ révèle que tous les splénocytes des souris injectées avec le TG4040 ont des pourcentages de LT CD8+IFN γ + positifs (seuil à 0,05%) contre les deux peptides WPA10 et LSP10, à l'exception

d'une souris qui ne répond pas à LSP10 (figure 14). Les valeurs s'échelonnent de 0,142% à 1,256% de LT CD8+IFN γ + et sont représentatives de l'immunogénicité du TG4040 dans cette souche murine. A l'inverse, les splénocytes des souris des groupes injectées avec le MVA TG4040 adjuvanté par la LPC C16 :0 ou C18 :0 ont des pourcentages de LT CD8+IFN γ + inférieurs au groupe TG4040 seul en réponse à la stimulation peptidique et même fréquemment sous le seuil positif. Enfin, l'analyse ICS des LT CD4+ révèle que le TG4040 n'induit pas de LT CD4+ sécréteurs d'IFN γ détectable par l'ICS, et que les LPC C16 :0 et C18 :0 n'ont pas d'activité modulatrice sur cette réponse (résultat non présenté). Classiquement au laboratoire, nous observons qu'1 souris sur 2 induit des pourcentages de

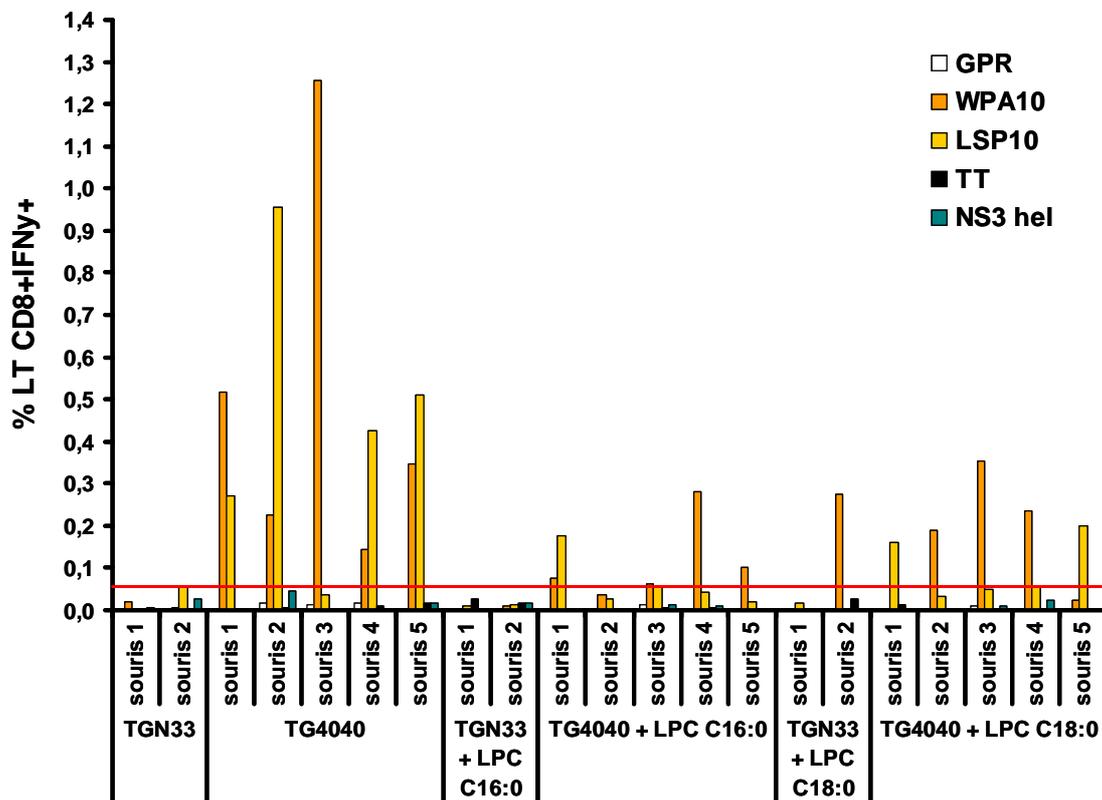


Figure 14: Evaluation de l'effet adjuvant des LPC sur l'immunogénicité du TG4040. Des souris transgéniques HLA-B7 ont été immunisées 3 fois à 3 semaines d'intervalle par voie s. c. avec 10^7 PFU (plaque forming unit) de TGN33 (2 souris/groupe) ou de TG4040 (5 souris/groupe) seuls ou associés avec 250 nmoles de LPC C16:0 ou de LPC C18:0. Quinze jours après, les pourcentages de LT CD8+ sécréteurs d'IFN γ ont été mesurés par ICS à partir des splénocytes stimulés 16-18h *in vitro* avec des peptides (GPR, WPA10 et LSP10) et des protéines (TT et NS3 hel). La barre horizontale rouge indique le seuil positif fixé à 0,095% (voir Annexe technique).

LT CD4+IFN γ + après l'immunisation avec le TG4040. Notre analyse se révèle donc légèrement en dessous de ce qui est attendu. Finalement, sans être statistiquement significative, la baisse générale des réponses observées en ELISpot et ICS CD8+ semblerait indiquer que les LPC ont un impact négatif sur l'immunogénicité du MVA.

Dans leur globalité, ces résultats indiquent que les LPC C16 :0 et C18 :0 ne sont pas capables d'augmenter les réponses cellulaires induites contre des antigènes véhiculés par un vecteur MVA type TG4040.

E. Implication d'un récepteur TLR dans l'activité des LPC

Pour compléter notre étude de la LPC et essayer d'élucider une partie de son mode d'action, nous avons voulu savoir si la LPC était capable d'activer un ou des récepteurs autres que ceux déjà identifiés (*i. e.* les récepteurs couplés aux protéines G [157]). Nous savons que parmi les récepteurs de type toll, les hétérodimères TLR2/1 et TLR2/6 ainsi que les TLR4 reconnaissent des lipoprotéines [182]. Considérant cette observation, nous avons envisagé que les LPC puissent également être reconnues par un récepteur de type toll.

Pour tester cette hypothèse, nous avons pu bénéficier d'une plate-forme de criblage *in vitro* de ligands des TLR développée à Transgene et avons réalisé ce travail en collaboration avec le département d'immunologie moléculaire. Cette plate-forme utilise des lignées cellulaires commerciales HEK 293 (cellules rénales embryonnaires humaines, InvivoGen) qui expriment stablement de nombreuses copies d'un récepteur TLR humain unique à leur surface. Les TLR 2, 3, 4, 5, 2/6, 7, 8 et 9 sont représentés mais pas les hétérodimères TLR2/1. Au laboratoire, ces lignées ont été transfectées stablement avec un plasmide (pNiFty2-luc, InvivoGen) codant pour le gène rapporteur de la luciférase. Ce gène est sous contrôle d'un promoteur inductible constitué de cinq sites de liaisons pour le facteur de transcription NF-KB. L'activation d'une lignée cellulaire par un ligand spécifique (tableau 3), est mesurable par quantification de l'émission lumineuse produite par l'activité du gène

Tableau 3 : Activation des lignées exprimant les TLR 2 à 9 par les LPC. Les LPC C16 :0 et C18 :0 (45µM) ont été évaluées dans deux expérimentations indépendantes sur des lignées HEK-293 exprimant stablement des récepteurs TLR2 à 9. L'activité est rapportée par un gène luciférase sous le contrôle d'un promoteur inductible par NF-KB. Le clone indiqué 293-luc2-8 est utilisé comme contrôle d'activation de la voie NF-KB TLR-indépendante des lignées HEK-293 exprimant un TLR. Le ligand utilisé comme témoin positif de chaque lignée est indiqué et a permis de définir l'activation maximale de référence (100%) pour chacune d'elles. Les valeurs indiquées pour les LPC représentent le pourcentage d'activation du gène reporteur luciférase après stimulation. La mesure de l'activité luciférase est effectuée sur un luminomètre (Berthold Tristar LB941).

		TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR2/6	TLR7	TLR8	TLR9	293-luc2-8
		% act max	% act max	% act max	% act max					
Contrôles Positifs		Fsl1	Poly I:C	LPS	Flagellin	Fsl1	Resiquimod	Resiquimod	CpG ODN 2006	TNFα
		100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Expérience #1	LPC C16:0	0	0	2	0	0	0,3	0	0	0,4
	LPC C18:0	0	0	0	0	0,1	0,4	0	0	0,3
Expérience #2	LPC C16:0	0	0	0	0	0	0,8	0	0,3	
	LPC C18:0	0	0	0	0	0,2	0,7	0	0,5	

de la luciférase sur son produit, la luciférine, en présence d'ATP et du Coenzyme A. Le gène de la luciférase étant lui-même activé par la présence et la fixation du facteur de transcription NF-KB sur son promoteur dans le noyau cellulaire. Une lignée HEK 293 n'exprimant aucun TLR a également été transfectée stablement avec le pNiFty2-luc pour servir de contrôle d'activation TLR indépendante de la voie NF-KB et l'activation obtenue avec cette lignée est utilisée comme seuil de positivité. La mesure de l'activité luciférase dans ce système de criblage est donc le reflet de l'activation d'un récepteur TLR par la voie NF-KB dépendante.

Les deux candidats LPC C16:0 et C18:0 ont d'abord été criblés sur les différentes lignées cellulaires dans deux expériences indépendantes à une concentration proche de celles de nos expériences *in vitro* (45µM). Le 100% d'activation des lignées (contrôle positif) est défini à partir du signal lumineux obtenu après stimulation avec le ligand standard du

TLR testé. Ces ligands, fournis par InvivoGen (Fsl-1/TLR2, poly I:C/TLR3, LPS/TLR4, Flagellin/TLR5, Fsl-1/TLR2/6, Resiquimod/TLR7/8, ODN2006/TLR9, TNF α /293HEK contrôle), sont utilisés à 1,8 fois la dose effectrice permettant d'atteindre 50% de saturation du signal (EC50). L'utilisation de ces ligands à une dose non saturante pour le système de détection permet de suivre l'évolution de la sensibilité de la lignée à son ligand contrôle tout en restant hautement positif (données générées par Transgene).

Les résultats montrent qu'aucune des molécules de LPC n'a permis d'activer une des lignées TLR testées dans ce système au-delà de 1% de l'activité obtenue avec le contrôle positif (Tableau 3). Ces valeurs sont identiques à la stimulation de la lignée cellulaire contrôle HEK-293 n'exprimant aucun TLR et indiquent que les LPC C16 :0 et C18 :0 ne semblent pas activer de TLR par la voie du NF-KB sur cette plate-forme de criblage.

Discussion

Les vaccins sous-unitaires sont des candidats prometteurs dans un environnement réglementaire de plus en plus strict. Parallèlement, et pour améliorer l'immunogénicité généralement faible de ce type de vaccins, le développement d'adjuvants de vaccination est en plein essor. La lysophosphatidylcholine d'œuf de poule identifiée par l'équipe du Dr Lotteau présente des caractéristiques adjuvantes qui nous ont conduit à évaluer le potentiel adjuvant d'espèces moléculaires dérivées de la LPC. Nous avons donc entrepris au cours de cette thèse de cribler *in vitro* des composés de LPC et de les évaluer ensuite chez l'animal. L'objectif était de proposer un nouvel adjuvant de vaccination hautement caractérisé de la famille des LPC.

Notre criblage *in vitro* nous a permis d'identifier deux espèces aux caractéristiques adjuvantes, les LPC C16 :0 et C18 :0, capables d'induire la maturation de CD humaines en culture, la sécrétion de chimiokines pro-Th1, et dans une certaine mesure pour la LPC C16 :0, l'engagement vers un profil Th1 de lymphocytes T CD4+ naïfs. Les effets adjuvants des LPC C16 :0 et C18 :0 apparaissent plus marqués que ceux du mélange de LPC d'œuf de poule dont elles sont issues, suggérant l'importance de l'utilisation d'un adjuvant LPC caractérisé. Au niveau fonctionnel, les sécrétions de chimiokines seraient en faveur d'un recrutement actif de cellules immunitaires sur le site d'injection et contribueraient à l'induction d'une réponse inflammatoire. Chez la souris, l'injection i. v. des LPC a conduit à la mise en place d'une réaction inflammatoire (IL-6) transitoire et modérée, au profil Th2 (IL-5). L'injection i. m. de la LPC C18 :0 associée à la protéine gp120 du VIH permet de corroborer ce résultat en induisant aussi la sécrétion d'IL-5 par les splénocytes. Ce profil est corrélé avec le développement de réponses humorales de type IgG après injection i. m. de la gp120, et de type IgG1 après injection s. c. de la protéine NS3 hélicase du VHC et de la protéine HBsAg du VHB associées aux LPC C16 :0 et / ou C18 :0. Les réponses induites sont similaires ou proches de celles obtenues en utilisant l'adjuvant de référence en clinique (alun) et sont détectables à de faibles doses supposées non toxiques, ouvrant des perspectives intéressantes pour l'utilisation des LPC en tant qu'adjuvant des réponses humorales.

Dans la discussion qui suit, nous aborderons tout d'abord le choix de la stratégie de criblage des composés. Ensuite, l'analyse des données ainsi générées, mises en parallèle des résultats *in vivo*, permettra une étude critique de nos choix de criblage. Nous verrons après cela les caractéristiques structurales, non structurales et les mécanismes qui influencent les activités adjuvantes des LPC. Finalement, la revue des résultats des réponses humorales et les difficultés rencontrées pour mettre en évidence des réponses cellulaires, nous amèneront à discuter des perspectives pour le développement clinique de la LPC en tant qu'adjuvant de vaccination.

Choix et limites de la stratégie de criblage in vitro.

Nous nous sommes entièrement appuyés sur un crible *in vitro* pour choisir les espèces de LPC aux effets adjuvants à évaluer chez la souris. Une telle analyse, où seuls les composés positifs *in vitro* seront testés *in vivo*, pourrait être considérée comme restrictive et nous ne pouvons donc pas exclure que certains composés adjuvants n'aient pas été détectés. Toutefois, nous avons choisi de faire ce criblage sur des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains (MoDC) car c'est ce modèle *in vitro* qui nous semblait le plus pertinent pour les raisons évoquées ci-après. Nous verrons aussi dans la suite de ce paragraphe comment ce crible pourrait être amélioré.

Nous avons pour but final de proposer un adjuvant des réponses immunes de type LPC qui serait utilisable en vaccination chez l'homme. Les CD sont des cellules présentatrice d'antigènes (CPA) dites « professionnelles » largement impliquées dans l'initiation et l'orientation des réponses immunitaires [20], et donc également des réponses vaccinales. Ainsi, pour détecter une espèce de LPC adjuvante, nous avons choisi d'évaluer sa capacité à activer les CD car l'activation de ces CPA apparaît cruciale pour définir l'activité adjuvante d'un composé. La recherche d'un adjuvant applicable à l'homme nous a logiquement conduit à travailler avec des CD d'origines humaines. Il existe diverses méthodes permettant de disposer de CD humaines en cultures [391]. Pour notre étude, c'est un modèle classique employant des CD issues de cultures de monocytes humaines CD14+ isolées du sang total

d'individus sains qui a été choisi. En tant que modèle, celui-ci est considéré actuellement comme le plus proche des CD humaines présentes *in vivo*. En effet, il a été montré que la différenciation des monocytes humains CD14+ en présence de GM-CSF et d'IL-4 permet, en 6 à 7 jours, d'obtenir des cellules ayant la morphologie des CD [167] et les caractéristiques des CD sentinelles ou immatures *in vivo* (CD14-CD1a+, grande capacité à ingérer des particules et inefficaces pour la présentation d'antigènes [291]). Un des grands atouts de ce système est que l'activation des CD est suivie de manière aisée par phénotypages (*e. g.* CD80, CD86, HLA-DR ...) et analyses fonctionnelles (*e. g.* sécrétions de cytokines et chimiokines, instruction des LT naïfs ...) [391], et que divers contrôles positifs existent (*e. g.* LPS, TNF α , CD40L ...). A ce titre, les MoDC humaines sont fréquemment utilisées pour la découverte ou la caractérisation des activités adjuvantes d'un composé [11] [388] [9;108] et elles nous ont permis de mettre en évidence le potentiel adjuvant de la LPC d'œuf de poule [253].

Il est cependant important de garder à l'esprit que ce criblage n'est qu'une image partielle du phénotype et des fonctions que doit avoir, en théorie, une CD pour initier une réponse immune efficace. Le panel des analyses que nous avons réalisé *in vitro* pourrait donc être augmenté avec des analyses fréquemment employées évaluant l'expression des récepteurs aux chimiokines [108], l'activité de capture des CD [9] ou encore affiner l'analyse des cultures de LT allogéniques [11] [388]. En effet, tout d'abord, divers récepteurs aux chimiokines (CCR7, CXCR4, CCR1, CCR5) sont exprimés de façon différentielle sur les MoDC reflétant leur capacité à répondre à des signaux chimiotactiques [292]. Le suivi de l'expression de CCR7, considéré comme particulièrement important pour la migration des CD vers les organes lymphoïdes secondaires [293], et de CXCR4 qui aiderait à la localisation avec les zones riches en LT, serait indicateur de la capacité des CD à venir au contact avec les LT naïfs dans les zones lymphoïdes. Associée à la présence de marqueurs de costimulation comme CD80 ou de molécule du CMH II (HLA-DR), le suivi de CCR7 et de CXCR4 renforcerait le potentiel adjuvant des composés criblés. De leur côté, les récepteurs CCR1 et CCR5, qui lient la chimiokine inflammatoire RANTES, permettent la maturation des

CD en conditions infectieuses et sont donc réprimés lorsque la CD est mature. Ces récepteurs pourraient servir de marqueurs de la maturation correcte des cellules et de leur stade de maturité [108]. Ensuite nous savons qu'un des évènements précoces de la maturation des CD est la réduction des activités de captures d'antigènes exogènes. Le suivi de cette capture pourrait être utilisé pour connaître le degré de maturité des CD en culture. Cette approche a notamment été utilisée par l'équipe du Dr Lotteau pour identifier la LPC d'œuf de poule [72] à l'aide de billes fluorescentes. Enfin, les CD dans les zones lymphoïdes stimulent la prolifération clonale des LT naïfs pour initier la réponse à médiation cellulaire qui, en retour, secrètent des cytokines aidant à l'orientation des réponses. Avec le test de MLR, nous avons évalué l'activité fonctionnelle des CD pour induire la sécrétion des cytokines IFN γ , IL-13 et IL-5 par les LT allogéniques. Il serait aussi intéressant d'étudier la prolifération des LT induite par les CD dans ces cultures comme cela peut être couramment réalisé [11] [388] [108]. De plus, l'analyse des sécrétions des LT en MLR pourrait être étendue à l'IL-2 et l'IL-4 car ces cytokines sont des indicateurs du profil des LT et affinerait ainsi notre vision de l'orientation des réponses induites par les LPC.

Considérant maintenant l'ensemble des résultats de ce crible et nos analyses chez l'animal, une certaine discordance est mise en évidence. Nous observons que l'activité adjuvante orientée Th2 des réponses humorales de ces molécules *in vivo* contraste avec le profil obtenu lors du crible *in vitro* des LPC C16 :0 et C18 :0 que nous qualifions de Th1. En effet, *in vivo*, nous avons montré que nos LPC induisent des anticorps IgG1 indiquant l'orientation Th2 des réponses humorales induites. De plus, que ce soit avec des souris injectées avec les adjuvants par voie i. v., ou des splénocytes de souris immunisées avec la LPC C18 :0 associée à la protéine gp120 du VIH, nous avons mis en évidence des productions d'IL-5, qui est aussi indicateur d'un profil Th2. En outre, nos diverses tentatives de mise en évidence de réponses cellulaires induites par les LPC chez la souris sont restées infructueuses. Ainsi, nous pouvons proposer deux hypothèses pour expliquer cette discordance :

1/ tout d'abord, bien qu'ayant réalisé un criblage sur des MoDC d'origine humaine, l'évaluation pré-clinique *in vivo* des LPC s'est ensuite déroulée chez la souris pour des raisons évidentes de faisabilité et d'éthique. Ce changement de modèle pourrait, en partie, expliquer l'effet contrasté entre les profils, car nous pouvons considérer que l'extrapolation de données *in vitro* obtenues sur cellules humaines à l'évaluation chez la souris est implicitement hasardeuse ;

2/ ensuite, il faudrait nuancer en partie le terme Th1 utilisé pour qualifier nos résultats avec les cultures de MoDC. Deux points en particulier pourraient être considérés. Tout d'abord, au niveau des sécrétions mesurées dans les surnageants de cultures des MoDC, des inductions supérieures de chimiokines pro-Th1 par nos LPC C16 :0 et C18 :0 sont détectées par rapport aux LPC d'œuf et la C18 :1. Par ailleurs, nous n'avons pas mis en évidence la sécrétion de cytokines associées aux réponses adjuvantes inflammatoires (IL-12p40, IL-6, TNF α). Ces données pourraient donc suggérer que la LPC ait une activité adjuvante *in vitro* qui serait qualifiable d'intermédiaire, entre Th2 et Th1. Cette proposition s'appuie notamment sur une étude qui montre que la toxine cholérique (CT), identifiée comme un puissant initiateur de réponses Th2, est capable d'induire la maturation des CD au niveau phénotypique mais ne modifie pas leurs sécrétions de cytokines, tout comme nos LPC [108]. Dans cette étude, les CD stimulées par la CT n'induisent pas de chimiokines ce qui, par contre, constitue une différence majeure avec nos LPC capables d'induire des chimiokines pro-Th1. Ensuite, le second point qui nous incite à nuancer notre définition d'une réponse Th1 *in vitro* est d'ordre technique. En effet, 10 expérimentations de MLR ont été réalisées à partir de 10 donneurs séparés, mais seules 3 ont pu montrer que la LPC C16 :0, et la C18 :0 dans une moindre mesure, pouvaient orienter, et ce de façon limitée, les LT vers une sécrétion d'IFN γ supérieure à celle d'IL-13 et d'IL-5. Nous avons donc rencontré des difficultés pour mettre en évidence le profil Th1 de nos LPC C16 :0 et C18 :0 dans le test MLR. En revanche, il est important de rappeler que la LPC d'œuf de poule s'était montrée capable d'induire des sécrétions d'IFN γ et d'IL-2 en MLR [72]. Ainsi, en résumé, nous ne pouvons actuellement pas savoir si ces observations reflètent réellement un défaut dans

l'activité des LPC C16 :0 et C18 :0 ou si la mise en œuvre technique de la MLR n'a pas été optimale dans ces travaux de thèse.

Il semblerait donc que diverses analyses permettraient d'améliorer notre compréhension des activités adjuvantes et des discordances des résultats *in vitro* et *in vivo*. Nous pourrions aussi par exemple tester l'activité adjuvante des LPC sur des cellules murines. Toutefois, l'équipe du Dr Lotteau a montré précédemment qu'en utilisant un modèle de culture de CD issues de la moelle osseuse de souris et différenciées en présence du ligand Flt-3 [13], la délipoprotéination du sérum de culture, nécessaire pour éviter l'inhibition de la LPC, entraîne une forte mortalité de ces cellules. Il resterait éventuellement à démontrer que d'autres modèles, utilisant le GM-CSF et l'IL-4 pour différencier des monocytes ou des cellules de la moelle osseuse murine en CD, pourraient être par contre envisagés [298].

Profil des CD matures.

Au cours du criblage *in vitro* des espèces moléculaires de LPC, deux d'entre-elles, les C16 :0 et C18 :0, ont augmenté l'expression du HLA-DR, du CD86 et du CD40 à la surface des MoDC reflétant une maturation correcte induite par nos produits et donc leur potentielle activité adjuvante. De plus, cette maturation a été observée à l'identique dans 10 cultures de MoDC en provenance de 10 donneurs séparés, renforçant cette caractérisation. Nous avons aussi systématiquement observé que, contrairement à ce qui est obtenu avec notre contrôle positif LPS, les CD devenues matures sous l'effet des LPC ont une expression réduite du CD54 comparé aux CD en culture avec du PBS. CD54, également appelé ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), est impliqué dans l'attachement des cellules de l'immunité aux parois endothéliales et dans leur pénétration dans les tissus inflammés [92]. De plus, l'expression d'ICAM-1 à la surface des CD a un rôle de maintien de la liaison CD-LT, permettant les activités d'initiation des réponses immunes conduites par ces cellules (Chapitre Introduction). Ainsi, un agent immunostimulant, tel le LPS, augmente l'expression de CD54 à la surface des CD, ce qui favoriserait l'inflammation et les fonctions des CD. Il est

difficile de spéculer sur l'impact d'une baisse du CD54 induite par les LPC, mais cela pourrait suggérer une altération des fonctions des CD qui ont été stimulées par les LPC. Toutefois, les effets adjuvants obtenus avec les LPC sur les réponses humorales sont en défaveur d'une telle hypothèse. Le fait que notre incapacité à caractériser l'induction de réponses cellulaires par les LPC contre des antigènes viraux soit liée à la baisse du CD54 reste à démontrer au cours d'études plus poussées. Plus simplement, nous pouvons suggérer que la baisse observée du CD54 soit une caractéristique propre de la maturation des CD induites par nos LPC dans ce modèle sans nécessairement d'impact fonctionnel.

Caractérisation des interactions des LPC avec les immunogènes.

La LPC est un lipide aux propriétés notamment détergentes qui pourrait donc avoir une action sur la structure des antigènes viraux. Nous avons donc entrepris la caractérisation des LPC C16 :0 et C18 :0, seules, et en présence des antigènes viraux. Nous souhaitons en effet savoir si les variations d'activités adjuvantes de réponses humorales contre la NS3 et l'HBsAg pouvaient être expliquées par des modifications structurales des LPC et / ou des antigènes. Nous avons pour cela en premier lieu cherché à connaître la structure des LPC en solution. Selon les données du fournisseur (Avanti Polar Lipids) et la littérature [130], les LPC C16 :0 et C18 :0 aux concentrations utilisées s'arrangent spontanément en micelles en solution. Une micelle est un agrégat sphérique de molécules lipidiques amphiphiles dont les têtes polaires (hydrophiles) s'orientent vers le solvant (si il est polaire comme l'eau), et les queues apolaires (hydrophobes) se regroupent à l'intérieur de la structure. La formation d'une micelle n'est visible qu'à partir d'une concentration appelée la concentration micellaire critique (CMC), en-dessous de laquelle les lipides restent sous forme de monomères solubles. La présence d'une seule chaîne carbonée sur les LPC ne leur permet pas de s'arranger en liposomes c'est-à-dire en structures sphériques composés de bicouches lipidiques renfermant un cœur hydrophile. Sachant que les LPC sont en structures micellaires en solution, nous avons donc voulu savoir si les interactions des micelles de LPC avec les antigènes pouvaient avoir un impact sur la structure micellaire.

Nous avons pour cela cherché à déterminer les variations des tailles des micelles de LPC par DLS (dynamic light scattering). Le dichroïsme circulaire a également été utilisé pour détecter les variations de structures des protéines en présence des micelles de LPC bien qu'aucun résultat n'ait été obtenu.

L'analyse de la taille des micelles de LPC par DLS nous indique que les LPC C16 :0 à 5mM s'auto-assemblent en micelles de 11,8 nm +/- 3,09 nm. Cette valeur semble fortement dépendante de la concentration utilisée dans notre expérimentation. En effet, et bien que les techniques de mesures soient différentes, une étude semble indiquer qu'à partir d'une concentration de 200µM les micelles de LPC C16 :0 ont des tailles supérieures à 7,2 nm [130] suggérant que dans notre essai la présence de larges micelles puisse être due à la forte concentration utilisée (5mM). Enfin, en présence de la protéine NS3 du VHC, la taille de la micelle est réduite à 7,58 nm +/- 1,66 nm, suggérant que la présence de la protéine ait pu entraîner une perturbation de la structure micellaire de la LPC C16 :0, sans que nous ne puissions proposer d'explication précise à cette observation.

En résumé, les informations de DLS et de dichroïsme devaient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes d'adjuvantation des LPC et d'envisager de les moduler si nécessaire. Cependant, des difficultés liées à la sensibilité des appareils de mesure et à l'apparition d'agrégats ont empêché nos analyses. Ainsi, en l'absence de comparaison entre les divers mélanges de LPC et d'antigènes viraux, la caractérisation aux concentrations utilisées chez l'animal ne nous a pas permis de savoir avec certitude si, et comment, des modifications des structures des micelles de LPC et / ou des antigènes viraux pourraient moduler l'activité adjuvante. Pour poursuivre cependant ces essais de caractérisation, nous pourrions envisager d'effectuer une séparation sur colonne de chromatographie de nos échantillons de LPC pour évaluer si des agrégats sont formés et éventuellement les séparer de l'échantillon avant de réaliser l'analyse DLS.

Comment l'activité adjuvante des lipides est-elle influencée?

Divers paramètres semblent influencer les activités adjuvantes des LPC et leur prise en compte devrait permettre, en partie, de mieux appréhender la relation structure-fonction des LPC et peut-être d'optimiser leur utilisation en tant qu'adjuvant. Durant ces travaux de thèse, nous avons observé que la longueur des chaînes carbonées, leur état de saturation et l'immunogène viral associé aux LPC ont une importance sur l'effet adjuvant.

Tout d'abord, nous avons pu montrer lors du test de criblage que ce sont les LPC dont la chaîne carbonée est supérieure à 16 atomes de carbones qui sont actives dans ce modèle. De plus, la présence d'une double liaison sur la molécule à 18 atomes annule l'effet adjuvant *in vitro* tout comme l'utilisation du mélange majoritairement insaturé de LPC dérivé de graines de soja. Ces résultats suggèrent l'existence d'une dépendance d'activité liée à la taille et à l'état de saturation de la chaîne carbonée, comme cela a déjà été montré dans d'autres études utilisant des dérivées de monophosphoryl lipide A [255] ou diverses structures liposomales [353]. Dans cette dernière étude, Vangasseri *et al.* évaluent l'effet adjuvant de divers liposomes cationiques sur l'activation de CD murines et proposent un mode d'action pour leur composé d'intérêt constitué de lipides, de protamine (protéine nucléaire riche en arginine) et d'un plasmide ADN non codant. Il est intéressant de noter que, en contradiction avec notre analyse, les auteurs mettent en évidence que les chaînes carbonées de courtes tailles (12 et 14 atomes) et celles possédant une insaturation (18 atomes et 1 insaturation) ont une meilleure activité adjuvante que les chaînes saturées à 16 ou 18 atomes [353]. Ainsi, et bien que cette étude ait été réalisée sur cellules murines avec des liposomes, les auteurs suggèrent qu'avec des chaînes courtes et insaturées, les molécules, plus fluides, pourraient facilement fusionner avec la membrane des CD déstabilisant la membrane et déclenchant leur stimulation par un effet mécanique détergent. Cette théorie suggérerait donc que les LPC C16 :0 et C18 :0 auraient moins de faciliter pour pénétrer dans les CD et pourraient plutôt produire leur effet adjuvant par un autre moyen, et par exemple, par l'intermédiaire d'un ou plusieurs récepteurs, renforçant les observations précédentes de l'utilisation de récepteurs RCPG (récepteur couplé aux protéines G) par la

LPC d'œuf de poule [72]. Toutefois, Vangasseri *et al.* indiquent que le SDS, qui est pourtant composé de 12 atomes de carbones, ne permet pas la maturation des CD dans leur système suggérant que finalement les caractéristiques globales d'un lipide (*i. e.* structure, état de saturation, charges, liaison à un récepteur) influence sa fonction.

En effet, d'autres paramètres non mesurés durant ces travaux, comme la charge et le degré d'absorption, pourraient modifier la liaison de la LPC avec l'immunogène et pourraient influencer son activité adjuvante. Cela a pu être montré avec, entre autres, des liposomes où la charge influence l'orientation de la réponse humorale induite contre une protéine recombinante de *Leishmania major* (rgp63) chez la souris [17;61]. En ce qui nous concerne, la LPC est un zwitterion, c'est-à-dire un lipide globalement neutre mais chargé. Il pourrait être alors intéressant d'effectuer la mesure de la charge de la LPC avec ou sans immunogène pour comprendre le comportement du couple adjuvant-antigène et le moduler si nécessaire. Classiquement, la détermination du potentiel zeta, qui représente la charge que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution, est réalisée pour évaluer ce phénomène. De plus, *in vivo*, le degré d'absorption des immunogènes sur un adjuvant est influençable par les protéines interstitielles, c'est-à-dire les protéines des fluides corporels comme le fibrinogène et l'albumine, comme cela a été montré avec l'alun [55;140]. Or on sait que, physiologiquement, la LPC est majoritairement fixée à l'albumine, ce qui pourrait créer des déplacements des immunogènes liés à la LPC après injection. L'étude du degré d'absorption pourrait sans doute permettre d'augmenter l'immunogénicité d'une combinaison LPC-antigène en jouant, par exemple, sur le pH des solutions afin de modifier les degrés d'absorption.

Enfin, nous avons montré que les LPC C16 :0 et C18 :0 sont capables d'induire des réponses humorales dirigées contre des antigènes viraux d'intérêt dont la nature semble cependant faire moduler l'activité adjuvante. Notamment la LPC C16 :0 induit des réponses contre la protéine NS3 hélicase comparables à celles obtenues avec l'adjuvant de référence (alun) à des doses allant de 500 nmoles jusqu'à une faible dose de 12,5 nmoles par souris, mais n'en induit pas contre l'HBsAg. De son côté, la LPC C18 :0 a une activité adjuvante

contre 3 antigènes viraux qui présentent pourtant des structures variées : l'HBsAg protéine d'enveloppe transmembranaire qui est particulière [218], la NS3 hélicase constituée de 3 domaines isolés [249] et la gp120 glycoprotéine d'enveloppe sans domaine transmembranaire [58]. Cet effet adjuvant est comparable ou inférieur à l'alun quand la protéine NS3 et la gp120 sont adjuvantées et est également détectable jusqu'à 12,5 nmoles par souris pour la NS3. Toutefois, l'activité adjuvante de la LPC C18 :0 contre l'HBsAg est moins efficace (qualitativement et quantitativement) que celle observée contre la NS3 et nous suggère que cette différence d'adjuvantation soit principalement liée à la nature particulière d'HBsAg, qui rend cette protéine intrinsèquement immunogène.

Les LPC activent-elles des récepteurs TLR?

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons voulu savoir si les TLR2/6 et TLR4, qui reconnaissent des lipopeptides, pourraient être des récepteurs de nos LPC dans un modèle représentatif de l'activation NF-KB dépendante des TLR. Bien que diverses études aient montré que la LPC active le facteur de transcription NF-KB [327;389], il semble que cette activation ne soit pas une conséquence de l'activation des TLR par les LPC C16 :0 et C18 :0, d'après nos résultats de criblage sur les lignées cellulaires transfectées stablement par différents TLR. Toutefois, dans une étude de Sugiyama [327], il est intéressant de voir que seules les faibles concentrations de LPC C16 :0 (5 à 15 μ M) activent le facteur de transcription NF-KB et qu'à 50 μ M, l'activation n'a plus lieu, suggérant que dans notre étude (réalisée à 45 μ M) un tel phénomène ait pu se produire. Dans une autre étude, Zhu *et al.* montrent que l'activation de NF-KB par la LPC est dépendante de l'activation d'une tyrosine kinase [389]. Or nous savons que les TLR activent ces motifs dans des voies de signalisation autres que NF-KB. Il est donc envisageable que, dans notre crible, l'activation des récepteurs TLR par les LPC stimule d'autres voies que la voie NF-KB utilisée dans notre modèle d'étude. Par exemple, il existe une voie de signalisation utilisant le facteur de transcription IRF3, et IRF7 dans une moindre mesure, après l'activation du TLR4 par le LPS [244]. Il est intéressant d'observer que la signalisation impliquant IRF3 conduit à la

production de chimiokines, dont IP-10 (CXCL10) qui a été l'une des molécules induites dans ce travail, ce qui pourrait suggérer que la LPC puisse utiliser en partie ce facteur de transcription via TLR4 [144]. Moins d'informations sont disponibles sur les diverses voies de signalisation du TLR2/6 mais il semblerait que, après stimulation, diverses MAP (mitogen-activated protein) kinases soit mobilisables (e. g. p38, c-Jun N terminal Kinase JNK) [286]. Nous savons que la LPC active JNK et phosphoryle des MAP kinases ERK (extracellular signal-regulated kinase) [242] [72], suggérant une utilisation possible de la voie MAP kinase par la LPC après activation du TLR2/6. En conclusion, diverses études ont montré que les LPC sont des ligands du récepteur G2A de la famille de RCPG [72;157], néanmoins, et malgré nos résultats négatifs sur un modèle TLR, NF-KB-dépendant, l'implication d'un autre récepteur, peut-être TLR, n'est sans doute pas à exclure.

Induction de réponses immunes cellulaires par les LPC C16 :0 et C18 :0?

Durant ces travaux de thèse, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'induction de réponses cellulaires spécifiques de nos antigènes viraux par les LPC avec nos analyses fonctionnelles, en contraste avec l'équipe du Dr Lotteau qui avait réussi à détecter des réponses cellulaires avec la LPC d'œuf de poule. Dans mes travaux, l'objectif principal était de proposer un adjuvant de type LPC qui pourrait être développé au niveau clinique pour l'homme. Nous avons réussi à mettre en évidence le potentiel adjuvant de réponses humorales des LPC C16 :0 et C18 :0. Nous avons donc ensuite voulu étudier les réponses immunes cellulaires dirigées contre des antigènes viraux qui ont un intérêt vaccinal, et avons utilisé la voie d'injection s. c. car elle est transposable à l'homme. Ainsi, nous avons évalué les réponses cellulaires induites contre 3 immunogènes différents (NS3 - 2 formes ont été testées, HBsAg, E7), dans 3 lignées murines différentes (HLA-A2, HLA-B7, C57BL/6) et nous avons effectué diverses analyses fonctionnelles standards (ELISpot IFN γ , marquage intracellulaire de l'IFN γ , test de cytotoxicité *in vitro* [105]) ou réalisées au laboratoire (modèle d'épreuve alternative [105]) sur des populations cellulaires issues de 2 organes lymphoïdes (rate et ganglions inguinaux). De plus, nous avons évalué le pouvoir adjuvant de la LPC

C18 :0 sur un antigène vectorisé par un vecteur viral MVA (codant pour les protéines NS3-4 et NS5B du VHC). Malgré ces nombreuses expérimentations, aucune réponse cellulaire induite par les LPC C16 :0 et C18 :0 n'a pu être détectée. A l'inverse, dans son étude, l'équipe du Dr Lotteau a montré que la LPC d'œuf de poule était capable d'induire une réponse mixte Th1/Th2 caractérisée par l'induction de réponses T cytotoxiques, par le recrutement de T CD8+ en réponse à l'application de DNFB dans un protocole d'hypersensibilité retardée et par la sécrétion d'anticorps contre des antigènes modèles, ovalbumine (OVA) et lysozyme du blanc d'œuf de poule [253]. De même, cette LPC s'était révélée efficace pour ralentir les progressions de cellules tumorales exprimant l'OVA dans un modèle préventif et thérapeutique chez la souris [253].

Deux hypothèses pourraient être proposées pour expliquer cette discordance. Dans un premier temps, la LPC d'œuf de poule est un mélange complexe dérivé d'une source naturelle qui pourrait contenir des traces de composés aux propriétés immunostimulantes inattendues. Dans notre étude, les LPC C16 :0 et C18 :0 sont à l'inverse des produits hautement caractérisés qui auraient pu avoir perdu ces caractéristiques adjuvantes non désirées. De plus, les LPC utilisées dans ces études sont issues de fournisseurs différents chez lesquelles les méthodes de production pourraient varier, expliquant peut-être les différences d'activité. Ces observations pourraient être indicatives de l'importance d'utiliser un adjuvant caractérisé pour limiter les variations de composition d'un lot à un autre et satisfaire aux exigences pour un développement clinique. Dans un second temps, de nombreuses divergences dans les modèles et les analyses utilisées existent entre ces études. L'extrapolation d'un modèle à un autre est difficile et doit être réalisée avec précaution car la mécanistique fonctionnelle entre les modèles est différente.

Considérant notre objectif initial, qui était de proposer un adjuvant pour la clinique, nous ne souhaitons pas nous tourner vers des modèles plus expérimentaux, en termes notamment de procédures d'immunisation, que ceux que nous avons utilisés. Nous pourrions toutefois envisager l'évaluation de la voie d'injection intradermique qui est transposable en clinique et qui semble être un moyen efficace d'induction de réponses

immunes, comme cela a été montré par exemple après une vaccination protéique ou génétique [19;78]. En conclusion, nous pensons que la diversité des études et analyses entreprises a été suffisamment exhaustive ici pour pouvoir penser que les LPC C16 :0 et C18 :0 n'induisent pas de réponses cellulaires détectables dans nos modèles.

Atouts en clinique des LPC.

En tant qu'adjuvants de vaccination, les LPC C16 :0 et C18 :0 ont l'avantage d'être synthétiques et caractérisées, permettant d'envisager une synthèse industrielle reproductible, simple, et dénuée de contaminant. De plus, les LPC C16 :0 et C18 :0 induisent des réponses humorales contre des antigènes viraux à de faibles doses en pré-clinique. Cela permet de supposer une utilisation clinique sans danger, d'autant qu'une étude a montré que l'injection s. c. de la LPC C16 :0 (200 à 800 nmol) à des individus sains n'induit pas d'effet secondaire toxique mais permet une réponse inflammatoire transitoire (caractérisée par l'apparition d'un érythème, d'un oedème et l'infiltration de leucocytes au site d'injection) [287]. De plus, dans le plasma d'un individu sain, les concentrations en LPC sont localement de 150 nmol/mL [326]. L'ensemble de ces données suggère que les LPC C16 :0 et C18 :0 pourraient être adjuvantes et non toxiques en vaccination chez l'homme, ouvrant d'intéressantes perspectives pour ces molécules.

Perspectives et conclusion générale.

Les résultats obtenus dans ces travaux de thèse indiquent donc que les LPC C16 :0 et C18 :0 ont des activités adjuvantes et pourraient être utilisées en tant qu'adjuvants de vaccination des réponses humorales. Nous proposons ici des études complémentaires qui devraient être réalisées et étudions diverses perspectives pour une utilisation avantageuse de ces molécules.

Pour être proposées comme adjuvants humoraux, il serait nécessaire de comparer les LPC C16 :0 et C18 :0 à des adjuvants humoraux commercialisés tels que l'Alhydrogel,

l'Adju-phos, le MPLA, le MF59 et la CTB. Dans ce contexte, il faut rappeler que lors de l'adjuvantation de la protéine gp120 du VIH, la LPC C18 :0 a été capable d'induire des sécrétions d'anticorps anti-gp120, bien que moins efficacement que l'Alhydrogel. Nous pouvons cependant observer que la LPC n'a pas été testée à de faibles doses dont l'effet adjuvant pourrait être similaire voire supérieur à celui observé dans cette étude, si l'on considère les effets adjuvants marqués obtenus à de faibles doses contre la protéine NS3 du VHC. Ainsi, l'utilisation d'une dose faible, qui est supposée non toxique, serait peut-être la valeur ajoutée des LPC face aux adjuvants commerciaux.

D'autre part, et bien que nous ne l'ayons pas testé ici, nous pourrions envisager l'utilisation de la LPC dans un protocole de prime / boost. En effet, de nombreuses études utilisent ce type de stratégie vaccinale pour le développement de vaccins [202]. Nous pouvons donc envisager que la LPC pourrait être utilisée pour adjuvanter un immunogène viral dans une vaccination de rappel et permettre d'orienter la réponse vers un profil Th2 dans une stratégie de prime / boost hétérologue.

Dans les perspectives d'utilisation précédemment citées pour la LPC, celle-ci est envisagée comme un adjuvant employé seul. Cependant, afin de répondre aux besoins actuels, et notamment pour induire une réponse vaccinale mixte Th1/Th2, il semble peu probable que la LPC soit utilisée seule de part son profil nettement orienté Th2. La LPC pourrait donc être avantageusement couplée à un adjuvant véhiculaire pour apporter une activité immunostimulante, et / ou être couplée à un adjuvant immunostimulant pour compléter son activité adjuvante. Dans cette optique, il est intéressant de rappeler qu'en tant que lipide, la LPC pourrait être incluse dans des bicouches lipidiques, et à ce titre, les adjuvants de type ISCOMATRIX, IRIV et liposomes semblent des modèles intéressants. En effet, nous savons que les ISCOMATRIX et les IRIV sont des structures dans lesquelles l'enveloppe lipidique est, entre autres, composée de molécules de phosphocholines (PC) [217],[85] et la présence de LPC dans ces structures pourrait peut-être moduler leur profil adjuvant. Egalement, l'intégration de la LPC dans une structure liposome, pourrait être envisagée comme un moyen pour apporter ou améliorer une activité immunostimulante à la

structure. Toutefois, la présence d'une seule chaîne carbonée dans la LPC lui confère une forme conique expliquant l'arrangement des LPC en micelles plutôt qu'en bicouches comme cela se produit avec des lipides à deux chaînes carbonées [307]. Ainsi, en s'insérant dans une enveloppe lipidique, la LPC modifie la courbure de la membrane et peut entraîner sa dissolution. Il faut donc imaginer que seule une proportion réduite soit intégrée dans une structures ISCOM, IRIV ou un liposome afin de limiter la déformation de la surface de ces structures. Il serait alors sans doute nécessaire de s'assurer au préalable que, enchâssées dans une bicouche et non plus sous la forme de micelles, les LPC conservent leur propriété adjuvante.

En dernier lieu, et au regard du profil pro-Th2 de la LPC, son association avec un inducteur de réponses *in vivo* Th1 semble particulièrement indiquée. A ce titre, les ligands des TLR pourraient être avantageusement employés. Dans ce sens, l'équipe de Baudner à récemment montré chez la souris, dans un modèle de vaccination utilisant un vaccin trivalent contre la grippe comme modèle, que l'association d'un ligand synthétique des TLR4 ou TLR9 avec le MF59 permet l'induction des sécrétions de cytokines Th1 en supplément de la réponse humorale déjà induite par le MF59 [27]. Au niveau commercial, l'alun, en tant que puissant inducteur de réponses humorales, est associé au MPL (ligand TLR4, profil Th1) pour former le système d'adjuvantation de la société GSK indiquant le succès du couplage des activités complémentaires de deux adjuvants.

Dans un contexte de crainte de pandémies grippales, par exemple, les espèces synthétiques de LPC décrites dans ces travaux pourraient présenter un intérêt non négligeable. Il leur faudrait alors montrer leur capacité à induire rapidement des réponses humorales fortes, maintenues dans le temps, et ce, en présence d'une quantité limitée d'immunogènes afin de répondre à la demande élevée du nombre de doses vaccinales nécessaires dans ces situations.

Annexe technique

A. Test d'infectivité du MVA *in vitro* sur BHK-21

Matériel :

BHK-21 (Réf. ATCC : CCL-10, adhérente)
Milieu de culture: GMEM (Gibco) additionné de 5% SVF + 5% tampon tryptose phosphate (Gibco) + pénicilline / streptomycine (Pan Biotech, 80U/mL et 80µg/mL final) + glutamine (Gibco, 2mM final)

J1

- Préparer les différentes conditions en tube eppendorf à tester dans PBS 1X : (le MVA doit subir une sonication de 1 minute)
 - MVA TG4040 seul en tant que contrôle (10^7 PFU/100µL final)
 - MVA TG4040 + Adjuvant pour le test (à mettre en dernier dans le mélange)
- Incuber 1h à TA
- En parallèle, trypsiner les BHK-21
- Numérer et reprendre les cellules à 2.10^6 cellules/mL
- A la fin de l'heure d'incubation, répartir dans une plaque 96 puits à fond plat :
 - volume nécessaire milieu dans tous les puits de dilution et contrôles
 - volume nécessaire des différentes conditions dans les puits de plus forte MOI
- Réaliser des dilutions successives et jeter les derniers surplus de volume
- Ajouter 50 µL de BHK-21 dans chaque puits (soit 10^5 cellules)
- Incuber 18-24h – 37°C, 5% CO₂

J2

- Vider le surnageant et laver avec du PBS 1X (2 fois)
- Ajouter 50 µL/puits de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) et incuber 15 min à température ambiante
- Ajouter 100 µL/puits de Permwash (BD Biosciences), vider et laver 2 fois avec 150 µL de Permwash
- Ajouter 50 µL/puits d'un anticorps de lapin anti-virus de la vaccine dilué au 1/300 dans le Permwash

- Incuber 1h à TA
- Laver 3 fois avec 150 µL de Permwash
- Ajouter l'anticorps anti-Ig de lapin couplé à la peroxydase dilué au 1/200 pendant 1h à température ambiante
- Laver 3 fois avec de Permwash puis 2 fois en PBS 1X
- **Révélation** : sous la hotte chimique
 - Ajouter 100µL/puits d'ortho phényl diaminobenzidine (OPD – Sigma) soit 1 tablette OPD + 1 tablette urée dans 20mL d'eau déminéralisée
 - Laisser développer selon la vitesse de réaction dans l'obscurité
 - Arrêt de la réaction avec 100µL d'HCl à 0.8M et lire à 492nm

B. ELISpot IFN γ Murin (splénocytes)

• SOLUTIONS A PREPARER

Milieu α -MEM complet (réactifs Gibco)

500 mL milieu α -MEM
+50 mL SVF (10% final)
+4 mL pénicilline / streptomycine (PAN Biotech, 80U/mL et 80 μ g/mL final)
+5 mL L-glutamine (2mM final)
+5 mL Hepes (10mM final)
+5 mL Sodium Pyruvate (1mM final)
+5 mL d'acides aminés non essentiels (1X final)
+0,5 mL β -mercaptoethanol (50 μ M final)

PBS/Tween 0,05%

900 ml d'eau déminéralisée
+ 100 ml PBS 10X
+ 0,5 ml Tween 20

Tampon acétate 0,5M

41g d'acétate de sodium (Prolabo) + eau déminéralisée, Ajuster au pH de 5,6
Compléter à 1L d'eau déminéralisée

Solution mère d' amino ethylcarbazol (AEC)

Préparer sous sorbonne

100mg AEC (Sigma) + 10mL N,N-Diméthyl-Formamide (Sigma)
Garder à température ambiante, à l'abri de la lumière

Solution de révélation AEC (pour 1 plaque)

A préparer extemporanément

10 ml eau distillée
+ 1,1 ml tampon acétate de sodium 0,5M pH 5,6
A partir de cette étape, travailler sous sorbonne
+ 280 μ l AEC solution mère
Filtrer la solution sur filtre 0,45 μ m.
+ 6 μ l H₂O₂ (Prolabo)

• MODE OPERATOIRE

J-1 ou J1 : Coating des plaques

Prévoir toutes les conditions en triplicata (sauf milieu seul et ConA qui peuvent être

en duplicata et « simplicata » respectivement)

Diluer l'anticorps de rat anti-IFN γ de souris (BD Biosciences, 1mg/ml) au 1/100 (concentration finale 10 μ g/mL) en PBS 1X stérile

Mettre 100 μ L/puits dans une plaque Multiscreen 0,45 μ m (Millipore)

Incubation sur la nuit à 4°C (J-1) ou 1h à 37°C (J1).

J1 : Mise en culture

1/ Lavages et saturation

Laver 3 fois en PBS 1X stérile, 200 μ L/puits.

Saturer avec milieu α MEM complet, 200 μ L/puits,

Incuber 2h minimum à 37°C

2/ Broyage des rates

Récupérer les rates dans des tubes contenant 5 à 10 mL de α MEM complet
Broyer dans des boîtes de Pétri à l'aide d'un piston de seringue

Transférer les cellules en tubes

Laisser décanter

Prendre le nombre de splénocytes nécessaires pour l'ELISpot : estimer le nombre de cellules en prévoyant de récupérer environ 80 à 100.10⁶ splénocytes par rate (attention : doubler le nombre nécessaire au final car risque de perte à la lyse des globules rouges).

3/ Lyse des globules rouges

Centrifuger les splénocytes (5 min, 1500 rpm soit 450g)

Vider le surnageant

Ajouter le tampon de lyse (Red Blood Cell Lysing Buffer, Sigma) à raison de 500 μ L pour 10.10⁶ cellules estimées, et au maximum 5 mL pour une rate totale.

Incuber pendant 5 minutes à TA. (attention : ne pas dépasser 5 min)

Ajouter 10 mL de PBS1X pour stopper la lyse

Centrifuger (5 minutes, 1500 tours/min. soit 450g)

Ajouter 10 mL de PBS1X
Centrifuger (5 minutes, 1500 tours/min. soit 450g)
Reprendre les cellules en α MEM complet (volume en fonction du nombre initial de cellules).
Numérer au microscope ou au cytomètre
Ajuster à 2.10^6 cellules/mL en α MEM complet.
Stocker à +4°C jusqu'au dépôt dans les plaques.

4/ Solution peptides, protéines ou ConA

Préparer les solutions pour stimulations des splénocytes en quantité suffisante sachant qu'on fait :

- par souris : 3 puits par stimulation peptidique ou protéique, 2 puits pour le milieu seul et 1 puits pour la ConA
- à raison de 100 μ L/puits
- la solution préparée est 2 fois plus concentrée que la concentration finale voulue car dans chaque puits on met 100 μ L solution de stimulation et 100 μ L cellules.

Toutes les solutions peptidiques ou protéiques (et le contrôle négatif dit « milieu seul ») contiennent de l'IL2 (Peprotech) à concentration finale 10U/mL.

Peptides

Concentration initiale - 10mM
- 20 μ M (dilution = 1/500)
Concentration finale - 10 μ M

Protéine

Concentration initiale - variable
Concentration de la solution à préparer - 4 μ g/mL
Concentration finale - 2 μ g/mL

IL-2

Concentration initiale - 10 000U/mL
Concentration de la solution à préparer - 20U/ml (d 1/500)
Concentration finale - 10U/mL

Concanavaline a (Sigma)

Concentration initiale - 5mg/mL
Concentration de la solution à préparer - 10 μ g/mL (dilution = 1/500)
Concentration finale - 5 μ g/mL

4/Dépôts dans les plaques

Ajouter 100 μ L/puits de la solution de stimulation voulue
Ajouter ensuite 100 μ L/puits de la suspension cellulaire à 2.10^6 cellules/mL
Incuber les plaques à 37°C pendant 40 h.

J3 : Révélation

1/ Lavages

1 fois en PBS 1X, minimum 200 μ L/puits
3 fois en PBS/Tween 0,05 %, minimum 200 μ L/puits.

2/Incubation anticorps biotynilé:

anticorps de rat anti-IFN γ de souris (BD Biosciences, concentration finale 1 μ g/mL)
Dilution au 1/500 en PBS/Tween 0,05 %
→ 100 μ L/puits.
Incubation 2h à température ambiante à l'obscurité.

3/Lavages

3 fois en PBS/Tween 0,05 %, minimum 200 μ L/puits.

4/Incubation Streptavidine - HRP:

anticorps streptavidine couplé à la peroxydase (Southern Biotech)
Dilution au 1/1000 en PBS/Tween 0,05%
→ 100 μ L/puits.
Incubation 1h à température ambiante à l'obscurité (attention : ne pas dépasser 1h)

5/Lavages

3 fois en PBS/Tween 0,05 %, minimum 200 μ L/puits.
3 fois en PBS 1X, minimum 200 μ L/puits.

6/Révélation AEC

Mettre 100 μ L/puits de solution de révélation AEC
Incubation de 5 à 15 minutes
Stopper la réaction par rinçage à l'eau du robinet. Enlever la protection plastique située sous les plaques, et rincer également le dessous des plaques.
Rincer à l'eau déminéralisée
Laisser sécher les plaques puis les conserver à l'abri de la lumière

Lecture des spots

Lire les plaques sur un lecteur Elispot dans la semaine suivant la révélation

Analyse

La moyenne des spots obtenus dans les conditions « milieu seul » est soustraite à la moyenne du nombre de spots obtenu avec une stimulation peptidique ou protéique pour chaque souris. La valeur obtenue est multipliée par 5 pour être rapportée à 10^6 cellules.

Seuil de positivité : 40 spots pour 10^6 cellules (correspond à la limite technique du lecteur utilisé = 8 spots/puits minimum)

C. ELISpot IFN γ Murin (ganglions lymphatiques et rates)

• SOLUTIONS A PREPARER

Milieu RPMI (Sigma) complet (réactifs Gibco)

500 mL milieu RPMI 1640
+50 mL SVF (10% final)
+5.5 mL pénicilline / streptomycine (PAN Biotech, 100U/mL et 100 μ g/mL final)
+5 mL L-glutamine (2mM final)
+550 μ L β -mercaptoethanol (50 μ M final)

Solution de lyse des globules rouges

10 mL de tampon de lyse (BD Biosciences)
+90 mL H₂O « Versol »

PBS/Tween 0,05% – Solution de lavage

900 ml eau déminéralisée
+ 100 ml PBS 10X
+ 0,5 ml Tween 20

PBS / 1% BSA – Solution d'incubation

1 g BSA (Sigma)
+ 100 mL PBS 1X

• MODE OPERATOIRE

J1 : Coating des plaques

Diluer l'anticorps de rat anti-IFN γ de souris (BD Biosciences, 1 mg/ml) au 1/400 (concentration finale 2.5 μ g/mL) en PBS 1X stérile

Mettre 100 μ L/puits dans une plaque Multiscreen 0,45 μ m (Millipore)

Incubation sur la nuit à température ambiante

J2 : Mise en culture

1/ Lavages et saturation

Laver 3 fois en PBS 1X stérile, 200 μ L/puits.

Saturer avec RPMI complet, 200 μ L/puits

Incuber 2h minimum à 37°C

2/ Broyage des ganglions et des rates

Récupérer d'un côté tous les ganglions et de l'autre toutes les rates des souris d'un même groupe dans des tubes contenant 5 mL de RPMI complet

Broyer dans un tamis (diamètre 40 μ m, BD) à l'intérieur d'une boîte de Pétri avec le piston d'une seringue

Rincer le tamis avec 5 mL de RPMI complet puis le jeter

Transférer les 10 mL de cellules en tubes de 15 mL et mettre sur glace

Pour les cellules des ganglions :
centrifuger et resuspendre dans 5 mL puis conserver ainsi les cellules jusqu'à l'étape **3/ Numération**

Pour les cellules de la rate :

Lavage

Centrifuger environ 150x10⁶ cellules de suspension à température ambiante (3 minutes, 1500 tours/min. soit 450g)

Vider le surnageant et resuspendre dans 8 mL de RPMI complet

Séparation des lymphocytes et lyse des globules rouges

Déposer les 8 mL de la suspension cellulaire sur 4 mL de Lympholyte-M (Cedarlane) en tubes de 15 mL

Centrifuger 20 min, 1500g (soit 2700 tours/min.), sans accélération, ni frein, température ambiante

Collecter l'anneau de lymphocytes dans un nouveau tube et compléter à 10 mL avec du RPMI complet

Laver 2 fois avec 10 mL de RPMI complet (3 minutes, 1500 tours/min. soit 450g)

Resuspendre les lymphocytes dans 2 mL de tampon de lyse des globules rouges et homogénéiser avec précaution

Incuber 15 minutes à température ambiante puis compléter à 10 mL avec RPMI complet ou PBS1X stérile

Centrifuger (3 minutes, 1500 tours/min. soit 450g) et éliminer le surnageant

Laver 1 fois avec 10 mL de RPMI complet et resuspendre les cellules dans 10 mL de RPMI complet

3/ Numération

Numérer au microscope dans bleu de trypan (Sigma, classiquement, rates au 1/10 et ganglions au 1/2)

Ajuster à 1.10^7 cellules/mL en RPMI complet.
Stocker à +4°C jusqu'au dépôt dans les plaques.

4/ Solutions peptides, protéines ou concanavaline a

Préparer les solutions pour stimulations des cellules en quantité suffisante sachant qu'on fait :

- par pool : 3 puits par stimulation peptidique ou pour le milieu seul et 1 puits pour la concanavaline a
- à raison de 100µl/puits
- la solution préparée est 2 fois plus concentrée que la concentration finale voulue car dans chaque puits on met 100 µL solution de stimulation et 100 µL cellules.

Peptides

Concentration initiale - 10mM
Concentration de la solution à préparer - 20µM (dilution = 1/500)
Concentration finale - 1µM

Concanavaline a (Sigma)

Concentration initiale - 5mg/mL
Concentration de la solution à préparer - 10µg/mL (dilution = 1/500)
Concentration finale - 5µg/mL

5/Dépôts dans les plaques

Ajouter 100µL/puits de la solution de stimulation voulue
Ajouter ensuite 100µL/puits de la suspension cellulaire à 1.10^7 cellules/mL
Incuber les plaques à 37°C, 5%CO₂ pendant 20 h.

J3 : Révélation

1/ Lavages

2 fois en eau déminéralisée / Tween 0,05 %, minimum 200µL/puits
5 fois en PBS/Tween 0,05 %, minimum 200µL/puits.

2/Incubation anticorps biotynilé:

anticorps de rat anti-IFN γ de souris biotynilé (BD Biosciences, concentration finale 4µg/mL)

Dilution au 1/125 en PBS/1%BSA

→ 100µL/puits.

Incubation 2h à température ambiante à l'obscurité.

3/Lavages

5 fois en PBS/Tween 0,05 %, minimum 200µL/puits.

4/Incubation Streptavidine - AP:

anticorps streptavidine couplé à la phosphatase alcaline (BD Biosciences)

Dilution au 1/2000 en PBS/BSA

→ 100 µL/puits.

Incubation 1h à température ambiante à l'obscurité (attention : ne pas dépasser 1h)

5/Lavages

5 fois en PBS/Tween 0,05 %, minimum 200µL/puits.
2 fois en PBS 1X, minimum 200µL/puits.

6/Révélation BCIP-NBT(Sigma)

Mettre 100µL/puits de solution de révélation (1 tablette pour 10 mL d'eau déminéralisés, préparation extemporanée)

Incubation 3 minutes maximum (attention : même si spots invisibles, incuber 3 min. max)

Stopper la réaction par rinçage à l'eau du robinet. Enlever la protection plastique située sous les plaques, et rincer également le dessous des plaques.

Rincer à l'eau déminéralisée

Laisser sécher les plaques puis les conserver à l'abri de la lumière

Lecture des spots

Lire les plaques sur un lecteur ELISpot dans la semaine suivant la révélation

Analyse

La moyenne des spots obtenus dans les conditions « milieu seul » est soustraite à la moyenne du nombre de spots obtenu avec une stimulation peptidique ou protéique pour chaque souris.

Seuil de positivité : correspond à la moyenne des valeurs « milieu seul » de l'expérimentation + 2 fois l'écart-type

D. Marquage intracellulaire des lymphocytes T CD8+ et CD4+ sécrétants de l'IFN γ

• SOLUTIONS A PREPARER

Milieu α -MEM complet (réactifs Gibco)

500 mL milieu α -MEM
+50 mL SVF (10% final)
+4 mL pénicilline / streptomycine (PAN Biotech, 80U/mL et 80 μ g/mL final)
+5 mL L-glutamine (2mM final)
+5 mL Hepes (10mM final)
+5 mL Sodium Pyruvate (1mM final)
+5 mL d'acides aminés non essentiels (1X final)
+0,5 mL β -mercaptoethanol (50 μ M final)

PBS-1%SVF

1 volume SVF
+ 99 volumes PBS 1X

Perm/Wash Solution

1 volume de Perm/Wash Solution 10X (BD Biosciences)
+ 9 volumes eau déminéralisée

• MODE OPERATOIRE

J1 : Mise en culture

1/ Broyage des rates

Récupérer les rates dans des tubes contenant 5 à 10 mL de α MEM complet
Broyer dans des boîtes de Pétri à l'aide d'un piston de seringue
Transférer les cellules en tubes
Laisser décanter
Prendre le nombre de splénocytes nécessaires : estimer le nombre de cellules en prévoyant de récupérer environ 80 à 100.10⁶ splénocytes par rate (attention : doubler le nombre nécessaire au final car risque de perte à la lyse des globules rouges).

2/ Lyse des globules rouges et ajustement de la concentration cellulaire.

Centrifuger les splénocytes (1500 tours/min. (450g), 5 minutes)

Vider le surnageant

Ajouter le tampon de lyse (Red Blood Cell Lysing Buffer, Sigma) à raison de 500 μ l pour 10.10⁶ cellules estimées, et au maximum 5 mL pour une rate totale.

Remettre en suspension

Incuber pendant 5 minutes à température ambiante. (attention : ne pas dépasser 5 min)

Ajouter 10 mL de PBS1X pour stopper la lyse

Centrifuger (5 minutes, 1500 tours/min. soit 450g)

Ajouter 10 mL de PBS1X

Centrifuger (5 minutes, 1500 tours/min. soit 450g)

Reprendre les cellules en α MEM complet (volume en fonction du nombre initial de cellules).

Numérer au microscope ou au cytomètre

Ajuster la concentration des cellules à 20*10⁶cellules/mL en α MEM complet.

Garder à +4°C jusqu'à mise en plaque (nécessité 100 μ L=2*10⁶cellules/condition)

4/ Solution Peptides, protéines ou concanavine a et dépôts dans les plaques

Préparer les solutions pour stimulations des splénocytes en quantité suffisante sachant qu'on fait :

-un puits par stimulation par souris à raison de 100 μ L/puits (milieu seul compris)

-la solution préparée est 2 fois plus concentrée que la concentration finale voulue car dans chaque puits on met 100 μ L solution de stimulation et 100 μ L cellules.

Toutes les solutions peptidiques ou protéiques (et le contrôle négatif dit « milieu seul ») contiennent de l'IL2 à concentration finale 10U/mL.

Peptides

Concentration initiale - 10mM

- 20 μ M (dilution = 1/500)

Concentration finale - 10µM

Protéine

Concentration initiale - variable

Concentration de la solution à préparer - 4µg/mL

Concentration finale - 2µg/mL

IL-2 (Peprotech)

Concentration initiale - 10 000U/mL

Concentration de la solution à préparer - 20U/ml (d 1/500)

Concentration finale - 10U/mL

Concanavaline a (Sigma)

Concentration initiale - 5mg/mL

Concentration de la solution à préparer - 10µg/mL (dilution = 1/500)

Concentration finale - 5µg/mL

Ajouter 100µL/puits de la solution voulue dans plaque 96 puits à fond plat.

Ajouter ensuite 100µL/puits de la suspension cellulaire à 20*10⁶cellules/mL

Incuber la (les) plaque(s) à 37°C, 5%CO₂ pendant 16-18h (sur la nuit).

• **J2 :**

1/ Ajout de Golgi Stop

Préparer la solution intermédiaire de GolgiStop (BD Biosciences, 3,3µL GolgiStop par mL de αMEM)

Enlever 100µL de milieu de chaque puits
Ajouter 25µL/puits de la solution intermédiaire de GolgiStop.

Remettre les cellules en suspension à l'aide d'une pipette multicanale

Incuber la plaque pendant 6h ± 30minutes à 37°C, 5%CO₂

2/Marquage de surface et fixation:

Transférer les cellules dans une plaque 96 puits à fond conique

Centrifuger (2000 tours/min. (800g), 1minute) et éliminer les surnageants par retournement.

Ajouter 150µL/puits de PBS-1%SVF.

Centrifuger (2000 tours/min. (800g), 1minute) et éliminer les surnageants par retournement.

Ajouter 50µL/puits des anticorps de phenotypage (BD Biosciences) dilués dans PBS-1%SVF :

Anti-CD3-PE à 1/200 (clone 145-2C11) ;

Anti-CD4-PerCP à 1/600 (clone RM4-5

Anti-CD8-APC à 1/600 (clone 53-6.7)

Mélanger avec l'aide d'une pipette multicanale

Incuber 15 minutes à température ambiante, à l'obscurité

Ajouter 100µL/puits de PBS-1%SVF.

Centrifuger (2000 tours/min. (800g) 1minute) et éliminer les surnageants par retournement.

Ajouter 150µL/puits de PBS-1%SVF.

Centrifuger (2000 tours/min. (800g) 1minute) et éliminer les surnageants par retournement.

Ajouter 50 µL/puits de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) et mélanger avec une pipette multicanale

Incuber 15 minutes à température ambiante, à l'obscurité.

Ajouter 100µL/puits de Perm/Wash (BD Biosciences)

Centrifuger (2000rpm tours/min. (800g) 1minute) et éliminer les surnageants par retournement.

Ajouter 150µL/puits de Perm/Wash.

A ce stade, la (les) plaque(s) peuvent être gardées à 4°C en attendant la suite du marquage (une nuit ou, en cas de problème, jusqu'à 4 jours).

• **J3 :**

1/ Marquage intracellulaire

Centrifuger (2000 tours/min. (800g) 1minute) et éliminer les surnageants par retournement.

Ajouter 50µL/puits d'anticorps anti-IFNγ-Alexa488 (BD Biosciences, clone XMG1.2) dilué au 1/400 dans du Perm/Wash et mélanger avec une pipette multicanale

Incuber 15 minutes à température ambiante, à l'obscurité

Ajouter 100µL/puits de Perm/Wash .

Centrifuger (2000 tours/min. (800g) 1minute) et éliminer les surnageants par retournement.

Ajouter 150µL/puits de Perm/Wash.

Centrifuger (2000 tours/min. (800g) 1minute) et éliminer les surnageants par retournement.

- Si la même plaque à fond conique va être utilisée pour le passage au cytomètre :

Ajouter 200µL/puits de PBS-1%SVF et mélanger les cellules avec une pipette multicanale en évitant de faire des bulles.

- Si non :

Ajouter 100µL/puits de PBS-1%SVF, mélanger les cellules avec une pipette multicanale et transférer dans une plaque à fond rond préalablement remplie avec 150µL/puits de PBS-1%SVF.

2/ Passage au cytomètre (BD, FacsCalibur) en utilisant HTS plate loader

Remplir les puits vides destinés au lavage avec de l'eau distillée.

Lancer le programme PlateManager (BD Biosciences)

Indiquer :

Type de plaque : fond conique (V) / fond rond (U)

Mode : Standard

Volume d'échantillon : 170µL - 200µL (selon les plaques - fond V ou U)

Vitesse d'acquisition de 0,5 à 2 µL/seconde (ne pas dépasser 5000 événements/seconde)

Définir le schéma de plaque.

Sauvegarder le fichier HTS

Lancer la lecture.

• MODE Analytique

1/ Définition des gates et exportation des données (CellQuest, BD et/ou FlowJo, Tree Star)

Afficher dot-plot FSC-SSC

Définir la région morphologique (R1), établir **G1=R1**

Afficher dot-plot SSC-FL2(CD3-PE) (restreint aux événements du G1)

Définir la région de cellules CD3 positives (R2), établir **G2=G1 and R2**

Afficher dot-plot FL3(CD4-PerCP)-FL4(CD8-APC) (restreint aux événements du G2)

Définir les régions de cellules CD4 positives (R3) et CD8 positives (R4) sans

prendre en compte les cellules doublement positives (CD4 et CD8)

Etablir **G3=G2 and R3** et **G4=G2 and R4**

Afficher les dot-plots SSC-FL1(IFN γ -Alexa488) restreints aux événements du G3 et G4

Définir les régions de cellules IFN γ positives R5 et R6 pour G3 et G4 respectivement

Etablir les gates **G5=G3 and R5; G6=G4 and R6**

Vérifier la position des gates pour tous les échantillons.

Afficher les valeurs statistiques des gates.

Exporter les statistiques en feuille Excel en utilisant la fonction Batch.

2/ Calcul du pourcentage de cellules IFN γ positives (Excel)

Pour chaque condition expérimentale:

Calculer le pourcentage brut de CD4+IFN γ + (G5/G3 x 100)

Calculer le pourcentage brut de CD8+IFN γ + (G6/G4 x 100)

Calculer le pourcentage net de cellules IFN γ + sur CD4 et/ou CD8 pour chaque condition de stimulation en soustrayant au pourcentage brut celui trouvé pour la même souris en condition « milieu seul ».

Seuil de positivité :

Calculé en prenant 3 fois l'écart-type des conditions «milieu seul» pour l'ensemble des souris du protocole.

Si le seuil ainsi calculé est inférieur au seuil de détection d'événements rares* (voir tableau ci-après), utiliser ce dernier.

Seuil de détection d'événements rares : il est calculé en prenant en compte
1) le nombre moyen d'événements CD4 ou CD8 (calculé pour les lignées HLA-A2 ou HLA-B7 à partir des protocoles réalisés sur 2 ans)

2) la valeur de 25 événements dans la gate d'intérêt qui correspond au nombre d'événements rares pour un CV de 20% (calcul d'événements rares CV =100/ $\sqrt{25}$)

	CD4	CD8
Souris HLA-A2	0,028%	0,244%
Souris HLA-B7	0,032%	0,095%

E. Détection *ex vivo* des lymphocytes T cytotoxiques

• SOLUTIONS A PREPARER

Milieu α -MEM complet (réactifs Gibco)

500 mL milieu α -MEM
+50 mL SVF (10% final)
+4 mL pénicilline / streptomycine (PAN Biotech, 80U/mL et 80 μ g/mL final)
+5 mL L-glutamine (2mM final)
+5 mL Hepes (10mM final)
+5 mL Sodium Pyruvate (1mM final)
+5 mL d'acides aminés non essentiels (1X final)
+0,5 mL β -mercaptoethanol (50 μ M final)

Milieu DMEM ou RPMI complet pour les cellules cibles (réactifs Gibco)

500 mL milieu DMEM ou RPMI
+50 mL SVF (10% final)
+4 mL pénicilline / streptomycine (PAN Biotech, 100 U/mL et 100 μ g/mL final)
+5 mL L-glutamine (2mM final)

A noter, pour les CEM, il est préférable d'ajouter également des acides aminés non essentiels, de l'hépès et du sodium pyruvate (mêmes quantités que pour le milieu α -MEM).

• MODE OPERATOIRE

• J1 : Mise en culture

1/ Broyage des rates

Récupérer les rates dans boîte de Pétri ou tubes contenant 5 à 10 mL de α MEM complet

Broyer dans boîte de Pétri à l'aide d'un piston de seringue

Transférer les cellules dans un tube

Rincer la boîte avec 5 à 10 mL de milieu

Laisser décanter

Transférer dans un autre tube

Numérer les splénocytes au microscope ou au cytomètre

Centrifuger (5 minutes, 1500 tours/min. soit 450g)

2/ Mise en culture

Plaque 24 puits : Prévoir au minimum 3 puits/souris/peptide à tester. Ajuster en fonction du nombre de cellules effectrices nécessaires à J7.

Reprendre les cellules en α MEM complet à $20 \cdot 10^6$ cellules/mL.

Déposer 500 μ L/puits soit $10 \cdot 10^6$ cellules / puits.

Ajouter 500 μ L/puits de la solution « peptide + IL-2 » suivante :

Peptide

Concentration initiale - 10 mM

Concentration de la solution à préparer - 20 μ M (dilution = 1/500)

Concentration finale peptide - 5 μ M

IL2 (Peprtech)

Concentration initiale - 10 000 U/ml

Concentration de la solution à préparer - 20 U/ml (dilution = 1/500)

Concentration finale IL2 - 5 U/ml

Incuber 1h30 à 37°C

Ajouter 1 mL de α MEM complet.

Incuber 5 jours à 37°C

• J5 ou J6 : Restimulation

Prévoir une restimulation à $5 \cdot 10^6$ cellules/puits et prévoir de récupérer environ 80 à $100 \cdot 10^6$ cellules/rate. A partir de là, prévoir le nombre suffisant de souris naïves pour la restimulation

1/ Irradiation des rates

Broyer les rates comme à J0. Plusieurs rates (max 5) peuvent être mises dans un seul tube 50 mL. Mettre 10 mL de milieu/rate.

Récupérer les cellules dans un tube après décantation.

Faire irradier les cellules : irradiation à au moins 30 Greys (à ce jour (Avril 2008), irradiation à 200%, 1950 secondes, sur

irradiateur ENS Lyon avec source à 0,66 grey/min).

Centrifuger les cellules (5 minutes, 1500 tours/min soit 450g)

Resuspendre les cellules en α MEM complet (compter environ 10 mL de milieu/rate)

Numérer au microscope ou au cytomètre

2/ Mise en culture

Ajuster le volume de α MEM complet pour être à 5.10^6 cellules/mL.

Répartir les cellules en tubes : 1 tube pour chaque peptide de restimulation.

Ajouter dans chaque tube le peptide spécifique et l'IL2 à raison de :

Peptide - 10 μ M final (dilution au 1/1000 de la solution initiale à 10mM)

IL2 - 10U/mL final (dilution au 1/1000 de la solution initiale à 10000 U/mL)

Incuber les splénocytes irradiés +peptide+IL2 1h30 à 37°C en tubes.

Enlever 1 mL dans chaque puits des plaques 24 puits.

Ajouter 1mL/puits de (splénocytes irradiés +peptide+IL2) soit 5.10^6 cellules/puits.

Concentration finale peptide - 5 μ M

Concentration finale IL2 - 5U/mL

3/ Cellules cibles

Passer les cellules cibles pour les amplifier suffisamment pour J7

- **J7 ou J8 : Test CTL**

1/ Cellules cibles (EL4 S3- Rob HHD ou CEMB7B7Kd)

Numérer les cibles.

Il faut 50000 cibles / puits.

Prévoir des puits contrôles (cibles seules chargées ou non avec les différents peptides, 4 puits par type de cibles) en début de 1^{ère} et fin de dernière plaque

En fonction du nombre de souris et de peptides, compter le nombre de cellules nécessaires / type de cibles, multiplier par 2 (car risque de perte au cours du marquage et des lavages)

Préparer autant de tubes que de types de cibles (prévoir aussi des cibles non

chargées) (ATTENTION maximum 4.10^6 cellules par tube, si plus de cellules nécessaire répartir dans 2 ou plusieurs tubes).

Centrifuger (5 minutes, 1500 tours/min. soit 450g)

Reprendre dans 500 μ L de milieu RPMI ou DMEM complet.

Charger les cellules en suspension avec les peptides d'intérêt : 100 μ M final soit 5 μ l de peptide à 10mM dans 500 μ L de suspension cellulaire.

Incuber au moins 1H à 37°C

2/ Cellules effectrices (splénocytes de souris)

Récolter les cellules à la P1000

Ajuster le volume pour avoir un volume équivalent dans tous les tubes.

Numérer les cellules.

Préparer une suspension à 5.10^6 cellules/mL (nécessité $7,5.10^5$ cellules/souris/peptide).

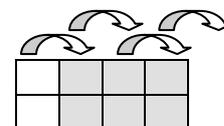
Déposer les cellules effectrices en plaque 96 puits à fond U et les diluer comme suit (prévoir sur une plaque séparée des puits contrôles contenant les cibles seules, les effectrices seules et les cibles chargées ou non avec les effectrices pour effectuer les réglages) :

Déposer 100 μ L/puits de milieu α MEM complet dans les puits contrôles (cibles seules) et les puits des ratios 3,3/1 ; 1/1 ; 0,3/1

Déposer 150 μ L de cellules effectrices dans les puits correspondant aux ratios 10/1.

Ce qui correspond à $7,5.10^5$ cellules/puits

Diluer les cellules effectrices au 1/3 (3 dilutions en série de 50 μ L dans 150 μ l total) sur toutes les lignes. Reste 100 μ L/puits.



150 μ L cellules effectrices

Les ratios E/T testés ainsi seront :

10/1, 3,3/1, 1/1, 0,3/1

Ajouter les cibles 100µL/puit

Mettre à 37°C pendant 4h.

3/ Marquage des cellules cibles au CFSE

Rajouter 500µL/tube de milieu RPMI ou DMEM complet.

Ajouter le CFSE (Invitrogen, dilution 1/10 de la solution mère de CFSE (5mM) dans PBS 1X puis ajouter 20 µL de solution diluée dans 1 mL de milieu contenant les cellules). Concentration finale CFSE : 10µM

Incuber précisément 10 minutes à 37°C, au bain marie

Arrêter la réaction avec du milieu RPMI ou DMEM complet froid (+4°C).

Centrifuger (5 minutes 1500 tours/min. soit 450g).

Laver 2 fois avec le milieu.

Reprendre les cellules dans du milieu MEMα complet et les numérer.

Ajuster la concentration à 5.10^5 cellules/mL.

Distribuer 100 µL soit 50000 cibles dans chaque puits.

Incubation 4H à 37°C.

Après cette incubation, garder les plaques à +4°C jusqu'à la lecture au cytomètre.

4/ Lecture des résultats (cytomètre, FACS Calibur, BD, passeur de plaques)

Réglages / Analyses

Ajouter du d'iode propinium (PI, Sigma, dilution au 1/100^e de la solution mère (10mg/mL), puis ajouter 10µL/puits) dans les puits de la plaque de réglages, transférer dans des tubes FACS contenant 200 µL de milieu MEMα complet. Effectuer les réglages en mode tube.

Le marquage CFSE sera lu en FL1 et le marquage PI en FL3 (peut aussi être lu en FL2 mais meilleure lecture en FL3).

Document acquisition/analyse type :

Sur un doc Cell Quest Pro faire :

-un dot plot FSC/SSC sur lequel définir une gate comprenant la majorité de la population de cellules cibles d'intérêt sans les débris (seuil environ 200/200). Attention il faut prévoir une gate un peu large la morphologie des cellules cibles changeant lorsqu'il y a une forte lyse (diminution FSC, augmentation SSC).

-un 2^{ème} dot plot avec FL1 (CFSE) et FL3 (PI). Restreindre ce dot plot aux cellules incluses dans G1. Définir 2 régions sur ce dot plot. Une région R2 pour les cellules CFSE + et PI+ (correspondant aux cellules cibles lysées, cadran supérieur droit). Une région R3 pour les cellules CFSE+ et PI- (cellules cibles non lysées, cadran inférieur droit).

Un seuil en FL1 pourra aussi être défini (à environ 10^2) pour éviter que les cellules effectrices avec une forte autofluorescence ne « bavent » dans R2 ou R3

Définir également une gate G2 correspondant à R2 + R3 qui correspond au nombre total de cellules cibles analysées et définir de compter 10 000 évènements dans cette gate.

Pour faire tous ces réglages, passer des cellules cibles seules non chargées, chargées, des cellules effectrices seules (pour vérifier qu'elles ne débordent pas dans R2 ou R3), puis un mélange de cibles non chargées + cellules effectrices et cellules chargées + effectrices pour s'assurer que tout est OK (attention il se peut qu'il y ait des changements de morphologie important entre cibles seules et mélange).

Une fois les réglages effectués (à la fin des 4h d'incubation à 37°C) :

Ajouter le PI (dilution au 1/100^e de la solution mère de PI (10mg/mL), puis ajouter 10µL/puits) dans les puits des plaques à analyser.

Puis ajouter 40µL/puits de milieu pour atteindre 250µL/puits (volume nécessaire pour passer avec le passeur de plaques sur le cytomètre).

Passer les échantillons au FACS en mode plaques (standard).

Paramètres du passeur :
volume prélevé : 200 µL
vitesse : 3µL/seconde
nombre de mix : 2

Temps estimé : 1h-1h30 par plaque.

5/ Analyse des résultats

Ouvrir Cell Quest (BD) puis le document d'acquisition/analyse

Ajuster les différentes gates, en faisant défiler les fichiers correspondant aux différents puits et aux différentes plaques afin de trouver les meilleurs paramètres pour l'ensemble des puits de l'ensemble des plaques.

Pour chacune des plaques, utiliser la fonction « batch » pour extraire les données sous forme d'un fichier Excel.

Calcul de la lyse spontanée par type de cellules cibles

Valeurs obtenues au niveau des puits contrôles avec cellules cibles seules dans du milieu

Lyse spontanée = nb cibles mortes/nb cibles totales (mortes + vivantes)X100

Calcul de la lyse

Pour chaque puits contenant des effectrices et des cibles, calculer le pourcentage de lyse :

% lyse = nb cibles mortes/nb total cibles (vivantes + mortes) X100

Puis retrancher la lyse spontanée moyenne des cellules cibles correspondant à chaque condition

La lyse obtenue avec les cellules cibles non chargées sera qualifiée de **lyse non spécifique**.

Calcul de la lyse spécifique

Pour chaque ratio/peptide/souris

Lyse spécifique = lyse obtenue avec les cibles chargées – lyse non spécifique

Seuil de positivité :

La lyse spécifique est considérée comme positive si elle est supérieure à 20% **et** supérieure au moins de 10% à celle observée dans les mêmes conditions pour la souris contrôle négatif.

F. Epreuve alternative à *Listéria monocytogenes*

• SOLUTIONS A PREPARER

PBS/Triton 0,1% stérile

Ajouter 500 µL de Triton 100X (Sigma) pour 500 mL de PBS
Filtrer à 0,22 µm avant utilisation.

BHI gélose/kanamycine

Dans une bouteille de 500 mL,
- peser 15,6g de poudre BHI agar (Fluko)
- ajouter 300 mL d'eau déionisée (milliRo)
- chauffer au micro-onde (environ 3min), jusqu'à obtenir une solution limpide
- faire stériliser la solution

Pour couler la gélose en boites de pétri, refaire chauffer au micro-onde (en mode décongélation).

Répartir la solution en falcon 50 mL et ajouter 150 µL de kanamycine (Invitrogen) lorsque sa température a baissé et que l'on peut tenir le tube à pleine main. Couler ensuite environ 10 mL de solution par boite de pétri et répartir.

Conservation des boites à l'envers à 4°C pendant environ 10 jours.

• MODE OPERATOIRE

1/ Généralités

- La manipulation de la *Listeria monocytogenes* se fait sous la hotte prévue à cet effet et toujours avec des cônes à filtres. Le manipulateur doit porter une deuxième paire de gants, une seconde blouse et des manchettes. Tout le matériel doit être décontaminé dans la javel avant d'être jeté ou nettoyé. Les surnageants sont jetés dans la javel et décontaminés pendant 24h. Pour plus de détails, se reporter aux procédures. Indiquer grâce au panneau sur la porte si des manipulations sont en cours.

- Les différents stocks de *Listeria* exprimant la protéine NS3 sont dans les boites glycérols Laurence à -80°C : Tubes notés A, B, C, D, E et F (20 µL de glycérol dans 2 mL BHI/kanamycine 30µg/mL), tous sont vérifiés pour l'expression de NS3

- Les souris immunisées avec le protocole d'intérêt sont challengées 15 jours après la dernière immunisation. D'autres souris peuvent être utilisées comme témoin positif si elles sont immunisées avec une injection de *Listeria* à 0,1LD50, 15 jours avant le challenge.

2/ Obtention des colonies

A partir du glycérol ou d'un bouillon, étaler directement la bactérie sur une gélose BHI. Laisser à température ambiante 2 à 3 jours jusqu'à l'apparition des colonies.

Conservation des géloses au frigo pendant 1 mois ensuite renouveler la culture.

3/ Immunisation des souris

- J-1 Remise en suspension des bactéries

Ensemencer 2 ou 3 colonies isolées avec l'oese dans 2 mL de BHI bouillon (Biomérieux) + 6 µL kanamycine (30µg/mL final)

Laisser une nuit sous agitation à température ambiante

- J0 Préparation de la solution à injecter

Mesurer la DO à 600nm et appliquer la formule suivante :

$$\text{Titre en cfu/ mL} \approx 1,3 \cdot 10^9 \times \text{DO} - 0,13 \cdot 10^9$$

Cette formule est applicable pour $0,9 < \text{DO} < 1,7$.

Le bouillon est ensuite dilué en PBS pour obtenir la concentration désirée pour réaliser une immunisation ou le challenge des souris à raison de 100µL par souris à injecter.

- Doses

C57Bl6 : 1LD50 = $9 \cdot 10^7$ cfu

Dose challenge : 1 LD50

Dose immunisation pour témoin positif : 0,1 LD50

- **Injection** : par voie intraveineuse rétro-orbitale aux souris préalablement anesthésiées avec un mélange Kétamine-xylazine (préparation selon les recommandations du PBES, Lyon)

- **Titration de la solution injectée (le jour de l'injection)**

Dilutions en série (10^{-1} à 10^{-7}) : 100µL dans 900µL de PBS/Triton 0,1%

Plater sur BHI gélose/kanamycine, 100µL des dilutions d'intérêts :

- pour un challenge, dilutions 10^{-6} et 10^{-7} pour souris C57Bl6

- pour une immunisation, dilutions 10^{-5} et 10^{-6} pour souris C57Bl6

Etalement avec billes de verre stériles.

Incubation des boites 2 à 3 jours à TA

Numération du nombre de colonies sur la boite pour déterminer la dose réelle injectée à chaque souris.

3/ Titration du Taux bactérien résiduel

- **48h après le challenge** :

Pré-peser des tubes eppendorfs (4 tubes/souris)

Sacrifier les souris et prélever 2 échantillons de rate et 2 échantillons de foie en eppendorfs (Prélèvement de morceaux <1/4 de la rate et <1/8 du foie)

Peser à nouveau les tubes + échantillons, afin de déduire le poids des échantillons.

Ajouter 100 µL de PBS/Triton 0,1% par tube.

Congélation des échantillons à -20°C

- **Traitement des organes**

Décongeler les échantillons et les broyer avec le broyeur.

Rincer l'embout avec 900 µL de PBS/Triton 0,1% : volume final pour titration de 1 mL

Une fois décongelés, les organes ne peuvent être recongelés. Ils peuvent être conservés à 4°C mais les titres seront augmentés car la *Listeria* pousse à cette température.

Variable en fonction de la santé des souris lors du sacrifice.

- Souris témoin négatif ou non immunisées : $10^{-2, -3, -4}$ et 10^{-5}

- Souris immunisées : $10^{-1, -2, -3}$ et 10^{-4}

- Souris contrôles positifs (TC-LNS3 immunisées) : pur, $10^{-1, -2}$

Procéder aux dilutions en série : 100 µL dans 900 µL de PBS/Triton 0,1% (les cônes sont changés à chaque dilution)

Plater sur BHI gélose/kanamycine, 100 µL des dilutions choisies pour chaque groupe (simplicite : 1 boîte/dilution)

Etalement avec billes de verre stériles réutilisables.

Incubation 2 à 3 jours à température ambiante.

Numération du nombre de colonies sur les boites

Calcul du titre avec le plus grand nombre de colonies numérables (entre 50 et 500 maximum par boite) avec une dilution correcte (cohérente)

Expression des résultats : **log (cfu/mg)**.

Si les résultats ne sont pas satisfaisants, une titration du 2^e échantillon de l'organe est réalisée.

G. ELISA pour la détection des anticorps anti-NS3 et anti-HBsAg

• SOLUTIONS A PREPARER

Coating Buffer (+4°C)

0,45 g Azide Sodium (Sigma)
+ 50 mL PBS 10X
compléter à 500 mL d'eau déminéralisée
Ajuster à pH 9,5 en utilisant HCl 12N (Prolabo) et/ou NaOH 2N (Merck)

PBS 1X

Diluer 10 fois PBS 10X dans de l'eau déminéralisée

Solution de Lavage PBS1X/Tween 0,1%

1000 mL PBS 1X
+ 1 mL Tween 20

Solution de Saturation

3 g BSA (Sigma)
+ 100 mL PBS 1X

Solution de Dilution PBS1X/1%BSA

(+4°C)
1 g BSA
+ 100 mL PBS 1X

Solution Révélation OPD

1 tablette OPD (Sigma)
+ 1 tablette urée
+ 20 mL eau déminéralisée
bien vortexer et utiliser dans l'heure

Solution Stop HCl à 0,8M

670 µL d'HCl stock à 37% (d=1,19 ; 12N)
compléter à 10 mL d'eau déminéralisée
Alternative: Solution Stop H₂SO₄ (Acide sulfurique)
100 µL à 0,8M ou 50 µL à 1,8M

• MODE OPERATOIRE

J-1 : Coating

Coater les plaques avec 100 µL à 1µg/mL de NS3 hel ou HBsAg
Incubation 1 nuit à +4°C

J1 : Saturation

Faire 3 lavages
Satuer les puits avec 200 µL de Solution de Saturation

Incubation 2h – 37°C

Faire 3 lavages

Test

Dans plaque polypropylène à part, réaliser des dilutions en série des sera
Transférer 100µL/puits dans plaque MAXISORP (Nunc)
Incubation 1h – 37°C
Faire 3 lavages

Conjugué couplé à la peroxydase

Diluer au 1/1000 les anticorps de rat anti-IgG1 ou -IgG2a de souris (BD Biosciences) OU au 1/2000 l'anticorps de chèvre anti-IgGtotal de souris (Dako) dans la Solution de Dilution
Déposer 100µL/puits
Incubation 1h – 37°C
Faire 3 lavages

Révélation : sous la hotte chimique

Ajouter 100µL/puits de Solution de Révélation
Laisser développer autant que nécessaire la coloration dans l'obscurité et à température ambiante (de 5 à 20 minutes en moyenne)
Ajouter 100µL/puits de Solution Stop
Lire à 492nm

Analyse :

L'absorbance du pré-bleed d'une souris et d'une dilution donnée doit être retranchée à chacune des autres absorbances obtenues pour cette souris à la même dilution.

Seuil de positivité

Est égal à 3 fois la moyenne de toutes les absorbances des pré-bleed de l'expérience.

H. Analyses statistiques

Applicable aux protocoles :

- Annexes B et C. ELISpot IFN γ murin splénocytes, ganglions lymphatiques et rates,
- Annexe D. Marquage intracellulaire des lymphocytes CD4+ et CD8+ sécrétant de l'IFN γ ,
- Annexe F. Epreuve alternative à *Listéria monocytogenes*,
- Annexe G. ELISA pour la détection des anticorps anti-NS3 et anti-HBsAg.

Analyse Statistique (Logiciel Statistica 8, StatSoft)

Dans colonne Var1 mettre nom du groupe
(ex : aaaa, bbbb...)

Dans colonne Var2 mettre les données brutes

Sélectionner : Statistiques > Tests Non Paramétriques > Comparaison de plusieurs échantillons indépendants (groupes)

Définir les variables (Var1 : indépendante, Var2 : dépendante) > Synthèse : ANOVA de Kruskal-Wallis

Si des groupes sont significativement différents ($p < 0.05$), procéder à l'analyse 2 à 2

Sélectionner : Statistiques > Tests Non Paramétriques > Comparaison de deux échantillons indépendants (groupes)

Définir variables (Var1 : indépendante, Var2 : dépendante) > entrer les 2 groupes à comparer (ex : a vs b, c vs e...) > faire le Test U de Mann-Whitney

**Article 2 : Vaccination against hepatitis B and C: towards
therapeutic application**

(publié au journal International Reviews of Immunology)

Références bibliographiques

1. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. NIH Consensus State Sci Statements 2002; **19**:1-46.
2. Abramson N, Melton B. Leukocytosis: basics of clinical assessment. Am Fam Physician 2000; **62**:2053-60.
3. Agger EM, Rosenkrands I, Hansen J *et al*. Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): a versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements. PLoS ONE 2008; **3**:e3116.
4. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine 2007.
5. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine 2007; **25**:3752-62.
6. Ahlen G, Soderholm J, Tjelle T *et al*. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. J Immunol 2007; **179**:4741-53.
7. Aiyar N, Disa J, Ao Z *et al*. Lysophosphatidylcholine induces inflammatory activation of human coronary artery smooth muscle cells. Mol Cell Biochem 2007; **295**:113-20.
8. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006; **124**:783-801.
9. Al-Bader T, Christodoulides M, Heckels JE, Holloway J, Semper AE, Friedmann PS. Activation of human dendritic cells is modulated by components of the outer membranes of *Neisseria meningitidis*. Infect Immun 2003; **71**:5590-7.
10. Alving CR. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. Vaccine 2002; **20 Suppl 3**:S56-64.
11. Andersen CS, Agger EM, Rosenkrands I *et al*. A simple mycobacterial monomycolated glycerol lipid has potent immunostimulatory activity. J Immunol 2009; **182**:424-32.
12. Angel J, Chaperot L, Molens JP *et al*. Virosome-mediated delivery of tumor antigen to plasmacytoid dendritic cells. Vaccine 2007; **25**:3913-21.
13. Angelov GS, Tomkowiak M, Marcais A, Leverrier Y, Marvel J. Flt3 ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells in vivo. J Immunol 2005; **175**:189-95.
14. Anonymous. A case of junk science, conflict and hype. Nat Immunol 2008; **9**:1317.
15. Artl A, Marsche G, Lestavel S, Sattler W, Malle E. Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; **20**:763-72.
16. Aspinall R, Del Giudice G, Effros RB, Grubeck-Loebenstien B, Sambhara S. Challenges for vaccination in the elderly. Immun Ageing 2007; **4**:9.

17. Badiee A, Jaafari MR, Khamesipour A *et al.* The role of liposome charge on immune response generated in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63). *Exp Parasitol* 2009; **121**:362-9.
18. Baldrige JR, Barry RA, Hinrichs DJ. Expression of systemic protection and delayed-type hypersensitivity to *Listeria monocytogenes* is mediated by different T-cell subsets. *Infect Immun* 1990; **58**:654-8.
19. Baldwin SL, Bertholet S, Kahn M *et al.* Intradermal immunization improves protective efficacy of a novel TB vaccine candidate. *Vaccine* 2009; **27**:3063-71.
20. Banchereau J, Briere F, Caux C *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**:767-811.
21. Banzhoff A, Gasparini R, Laghi-Pasini F *et al.* MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults. *PLoS ONE* 2009; **4**:e4384.
22. Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* 2008; **455**:613-9.
23. Barouch DH, Letvin NL, Seder RA. The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimizing cellular immune responses. *Immunol Rev* 2004; **202**:266-74.
24. Barr TA, Carlring J, Heath AW. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine* 2006; **24**:3399-407.
25. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003; **197**:633-42.
26. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:15-27.
27. Baudner BC, Ronconi V, Casini D *et al.* MF59 Emulsion Is an Effective Delivery System for a Synthetic TLR4 Agonist (E6020). *Pharm Res* 2009.
28. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; **15**:74-80.
29. Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines--US perspective. *Vaccine* 2002; **20 Suppl 3**:S18-23.
30. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* 2006; **126**:15-24.
31. Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol* 2008; **38**:918-21.
32. Belshe RB, Edwards KM, Vesikari T *et al.* Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N Engl J Med* 2007; **356**:685-96.
33. Berthold I, Pombo ML, Wagner L, Arciniega JL. Immunogenicity in mice of anthrax recombinant protective antigen in the presence of aluminum adjuvants. *Vaccine* 2005; **23**:1993-9.
34. Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; **87**:1439-49.

35. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 1986; **233**:652-4.
36. Betts MR, Nason MC, West SM *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 2006; **107**:4781-9.
37. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 2004; **40**:845-59.
38. Bitsaktsis C, Rawool DB, Li Y, Kurkure NV, Iglesias B, Gosselin EJ. Differential requirements for protection against mucosal challenge with *Francisella tularensis* in the presence versus absence of cholera toxin B and inactivated *F. tularensis*. *J Immunol* 2009; **182**:4899-909.
39. Bolhassani A, Rafati S. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2008; **7**:1185-99.
40. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb)* 2003; **83**:98-106.
41. Boulant S, Becchi M, Penin F, Lavergne JP. Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem* 2003; **278**:45785-92.
42. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005; **436**:946-52.
43. Brennan FR, Dougan G. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine* 2005; **23**:3210-22.
44. Brewer JM. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett* 2006; **102**:10-5.
45. Buckland BC. The process development challenge for a new vaccine. *Nat Med* 2005; **11**:S16-9.
46. Bungener L, Huckriede A, de Mare A, de Vries-Idema J, Wilschut J, Daemen T. Virosome-mediated delivery of protein antigens in vivo: efficient induction of class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte activity. *Vaccine* 2005; **23**:1232-41.
47. Bungener L, Serre K, Bijl L *et al.* Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells. *Vaccine* 2002; **20**:2287-95.
48. Cabana VG, Siegel JN, Sabesan SM. Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1989; **30**:39-49.
49. Cabrera R, Tu Z, Xu Y *et al.* An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; **40**:1062-71.
50. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008; **112**:461-9.
51. Cardona PJ, Asensio JG, Arbues A *et al.* Extended safety studies of the attenuated live tuberculosis vaccine SO2 based on phoP mutant. *Vaccine* 2009; **27**:2499-505.
52. Casella CR, Mitchell TC. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**:3231-40.

53. Chan A, Hong DL, Atzberger A *et al.* CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 2007; **179**:89-94.
54. Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007; **85**:16-23.
55. Chang M, Shi Y, Nail SL *et al.* Degree of antigen adsorption in the vaccine or interstitial fluid and its effect on the antibody response in rabbits. *Vaccine* 2001; **19**:2884-9.
56. Chattopadhyay PK, Hogerkorp CM, Roederer M. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology* 2008; **125**:441-9.
57. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009; **6**:15-25.
58. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 2005; **433**:834-41.
59. Chen G, Li J, Qiang X *et al.* Suppression of HMGB1 release by stearyl lysophosphatidylcholine:an additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis. *J Lipid Res* 2005; **46**:623-7.
60. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 2005; **309**:581-5.
61. Christensen D, Korsholm KS, Rosenkrands I, Lindenstrom T, Andersen P, Agger EM. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:785-96.
62. Cleghorn F, Reitz M, Popovic M, Gallo R. Human immunodeficiency viruses. In: Mandell G. *BJDR*, ed. *Principles and practice of infectious diseases*. Elsevier, 2005
63. Clinical Trial.gov. Optimizing Hepatitis B Vaccine Response Through the Use of a Topical Immune Modulator. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00175435?term=resiquimod&rank=7>. 6. Reprint: 2008.
64. ClinicalTrials.gov. Broad Spectrum HPV Vaccine Dose Escalation Study. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00851643?term=ISCOMATRIX&rank=4>. 5. Reprint: 2009.
65. ClinicalTrials.gov. An Extended Follow up of a RTS,S/AS01E Malaria Vaccine Trial (MAL059). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00872963?term=RTS%2CS&phase=2&rank=1>. 5. Reprint: 2009.
66. ClinicalTrials.gov. Phase 1 Safety and Immunogenicity Study in Healthy Adults of VAX125, a Recombinant HA-Flagellin Influenza Vaccine. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00730457?term=vaxinnate&rank=1>. 5. Reprint: 2009.
67. ClinicalTrials.gov. An Investigational Combination Vaccine Given to People Who Are Not Infected With HIV.

- <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00027365?term=adjuvant&id=NIAID&rank=28>.
6.
Reprint: 2008.
68. ClinicalTrials.gov . Safety of and Immune Response to an HIV Vaccine (VRC-HIVDNA009-00-VP) Administered With Interleukin-2/Immunoglobulin (IL-2/Ig) DNA Adjuvant in Uninfected Adults.
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00069030?term=healthy&cond=HIV&intr=IL-&rank=4>. 6.
Reprint: 2009.
 69. Connell TD. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by type I and type II heat-labile enterotoxins. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:821-34.
 70. Cooper, C. L., Angel, J. B., Seguin, I., Davis, H. L., and Cameron, D. W. CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years. *Clin Infect Dis* 46(8), 1310-4. 2008.
 71. Coutant F, Agaugue S, Perrin-Cocon L, Andre P, Lotteau V. Sensing environmental lipids by dendritic cell modulates its function. *J Immunol* 2004; **172**:54-60.
 72. Coutant F, Perrin-Cocon L, Agaugue S, Delair T, Andre P, Lotteau V. Mature dendritic cell generation promoted by lysophosphatidylcholine. *J Immunol* 2002; **169**:1688-95.
 73. Cox JC, Coulter AR. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997; **15**:248-56.
 74. Cristillo AD, Galmin L, Restrepo S *et al*. HIV-1 Env vaccine comprised of electroporated DNA and protein co-administered with Talabostat. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **370**:22-6.
 75. Cristillo AD, Wang S, Caskey MS *et al*. Preclinical evaluation of cellular immune responses elicited by a polyvalent DNA prime/protein boost HIV-1 vaccine. *Virology* 2006; **346**:151-68.
 76. Croset M, Brossard N, Polette A, Lagarde M. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J* 2000; **345 Pt 1**:61-7.
 77. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J Immunol* 2009; **182**:3335-41.
 78. Cui Z, Baizer L, Mumper RJ. Intradermal immunization with novel plasmid DNA-coated nanoparticles via a needle-free injection device. *J Biotechnol* 2003; **102**:105-15.
 79. Cumberbatch M, Kimber I. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology* 1995; **84**:31-5.
 80. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S *et al*. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull World Health Organ* 2007; **85**:719-26.
 81. De Becker G, Moulin V, Pajak B *et al*. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Int Immunol* 2000; **12**:807-15.

82. De Gregorio E, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery. *Eur J Immunol* 2008; **38**:2068-71.
83. de Mare A, Bungener LB, Regts J *et al.* The effect of pre-existing immunity on the capacity of influenza virosomes to induce cytotoxic T lymphocyte activity. *Vaccine* 2008; **26**:2314-21.
84. Drane D, Gittleson C, Boyle J, Maraskovsky E. ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:761-72.
85. Drane D, Gittleson C, Boyle J, Maraskovsky E. ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:761-72.
86. Dreux M, Cosset FL. HCV and lipoproteins: is oxLDL an Achilles' heel of the Trojan horse? *Hepatology* 2006; **43**:903-5.
87. Drummond M, Chevat C, Lothgren M. Do we fully understand the economic value of vaccines? *Vaccine* 2007; **25**:5945-57.
88. Du Clos TW, Mold C, Stump RF. Identification of a polypeptide sequence that mediates nuclear localization of the acute phase protein C-reactive protein. *J Immunol* 1990; **145**:3869-75.
89. Dudek T, Knipe DM. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology* 2006; **344**:230-9.
90. Dupuis M, McDonald DM, Ott G. Distribution of adjuvant MF59 and antigen gD2 after intramuscular injection in mice. *Vaccine* 1999; **18**:434-9.
91. Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**:71-99.
92. Dustin ML, Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* 1991; **9**:27-66.
93. Duvall MG, Jaye A, Dong T *et al.* Maintenance of HIV-specific CD4+ T cell help distinguishes HIV-2 from HIV-1 infection. *J Immunol* 2006; **176** :6973-81.
94. Ekong EE, Okenu DN, Mania-Pramanik J *et al.* A *Vibrio cholerae* ghost-based subunit vaccine induces cross-protective chlamydial immunity that is enhanced by CTA2B, the nontoxic derivative of cholera toxin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; **55**:280-91.
95. European Association For The Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; **50**:227-42.
96. Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines* 2003; **2**:219-29.
97. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006; **20**:123-37.
98. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2006; **13**:143-57.
99. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper

- T cells: lineage and location. *Immunity* 2009; **30**:324-35.
100. FDA / CBER. Liste exhaustive des vaccins, adjuvés ou pas, commercialisés aux Etats-Unis.
Reprint: 2009.
 101. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ *et al.* CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003; **101**:3052-7.
 102. Fehr T, Bachmann MF, Bucher E *et al.* Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies. *J Exp Med* 1997; **185**:1785-92.
 103. Fong LG, Fong TA, Cooper AD. Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 beta mRNA expression in mouse macrophages by oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1991; **32**:1899-910.
 104. Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**:38-46.
 105. Fournillier A, Gerossier E, Evlashev A *et al.* An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine* 2007; **25**:7339-53.
 106. Franchi L, Nunez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 2008; **38**:2085-9.
 107. Frasch SC, Zemski-Berry K, Murphy RC, Borregaard N, Henson PM, Bratton DL. Lysophospholipids of different classes mobilize neutrophil secretory vesicles and induce redundant signaling through G2A. *J Immunol* 2007; **178**:6540-8.
 108. Gagliardi MC, Sallusto F, Marinaro M, Langenkamp A, Lanzavecchia A, De Magistris MT. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur J Immunol* 2000; **30**:2394-403.
 109. Garcon N, Chomez P, Van Mechelen M. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:723-39.
 110. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N *et al.* Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* 2008; **205**:3119-31.
 111. Gavin AL, Hoebe K, Duong B *et al.* Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 2006; **314**:1936-8.
 112. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:465-79.
 113. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; **19**:71-82.
 114. Gendaszewska-Darmach E. Lysophosphatidic acids, cyclic phosphatidic acids and autotaxin as promising targets in therapies of cancer and other diseases. *Acta Biochim Pol* 2008; **55**:227-40.
 115. Glass RI, Parashar UD, Bresee JS *et al.* Rotavirus vaccines: current prospects and

- future challenges. *Lancet* 2006; **368**:323-32.
116. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. Immunological Notes XVII.-XXIV. *J Pathol Bacteriol* 1926; **29**:31-40.
 117. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. Immunological Notes XVII.-XXIV. *J Pathol Bacteriol* 1926; **29**:31-40.
 118. Goepfert PA, Tomaras GD, Horton H *et al.* Durable HIV-1 antibody and T-cell responses elicited by an adjuvanted multi-protein recombinant vaccine in uninfected human volunteers. *Vaccine* 2007; **25**:510-8.
 119. Gomez CE, Najera JL, Krupa M, Esteban M. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* 2008; **8**:97-120.
 120. Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; **16**:561-80.
 121. Graham BS, Koup RA, Roederer M *et al.* Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *J Infect Dis* 2006; **194**:1650-60.
 122. Grandea AG 3rd, Van Kaer L. Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol* 2001; **22**:194-9.
 123. Greenland JR, Letvin NL. Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine* 2007; **25**:3731-41.
 124. Gross CP, Sepkowitz KA. The myth of the medical breakthrough: smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. *Int J Infect Dis* 1998; **3**:54-60.
 125. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 2006; **12**:289-95.
 126. Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**:821-52.
 127. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; **32**:155-72.
 128. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine* 1995; **13**:1263-76.
 129. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* 2007; **5**:505-17.
 130. Haberland ME, Reynolds JA. Interaction of L-alpha-palmitoyl lysophosphatidylcholine with the AI polypeptide of high density lipoprotein. *J Biol Chem* 1975; **250**:6636-9.
 131. Hahn BH, Grossman J, Ansell BJ, Skaggs BJ, McMahon M. Altered lipoprotein metabolism in chronic inflammatory states: proinflammatory high-density lipoprotein and accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; **10**:213.

132. Halperin SA. Lyme disease vaccine. *Can J Infect Dis* 2000; **11**:132-4.
133. Han CY, Chiba T, Campbell JS *et al.* Reciprocal and coordinate regulation of serum amyloid A versus apolipoprotein A-I and paraoxonase-1 by inflammation in murine hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**:1806-13.
134. Han KH, Hong KH, Ko J *et al.* Lysophosphatidylcholine up-regulates CXCR4 chemokine receptor expression in human CD4 T cells. *J Leukoc Biol* 2004; **76**:195-202.
135. Hansen B, Sokolovska A, HogenEsch H, Hem SL. Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. *Vaccine* 2007; **25**:6618-24.
136. Haut LH, Ertl HC. Obstacles to the successful development of an efficacious T cell-inducing HIV-1 vaccine. *J Leukoc Biol* 2009.
137. He JS, Ostergaard HL. CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules. *J Immunol* 2007; **179**:2339-48.
138. Heeney JL, Plotkin SA. Immunological correlates of protection from HIV infection and disease. *Nat Immunol* 2006; **7**:1281-4.
139. Heeney JL, Plotkin SA. Immunological correlates of protection from HIV infection and disease. *Nat Immunol* 2006; **7**:1281-4.
140. Heimlich JM, Regnier FE, White JL, Hem SL. The in vitro displacement of adsorbed model antigens from aluminium-containing adjuvants by interstitial proteins. *Vaccine* 1999; **17** :2873-81.
141. Hem SL, Hogenesch H. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:685-98.
142. Higgins DA, Carlson JR, Van Nest G. MF59 adjuvant enhances the immunogenicity of influenza vaccine in both young and old mice. *Vaccine* 1996; **14**:478-84.
143. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 2000; **165**:618-22.
144. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:644-58.
145. Houghton M, Abrignani S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* 2005; **436**:961-6.
146. Hu H, Huang X, Tao L, Huang Y, Cui BA, Wang H. Comparative analysis of the immunogenicity of SARS-CoV nucleocapsid DNA vaccine administered with different routes in mouse model. *Vaccine* 2009; **27**:1758-63.
147. Hu J, Chen Z, Gu J *et al.* Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, *Plasmodium falciparum* AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. *PLoS ONE* 2008; **3**:e1952.
148. Hughes AL, Piontkivska H. Functional diversification of the toll-like receptor gene family. *Immunogenetics* 2008; **60**:249-56.

149. Inchauspe G, Bach G, Martin P, Bonnefoy JY. Vaccination against hepatitis B and C: towards therapeutic application. *Int Rev Immunol* 2009; **28**:7-19.
150. Ishizaka ST, Hawkins LD. E6020: a synthetic Toll-like receptor 4 agonist as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:773-84.
151. Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E *et al.* Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol* 2002; **168**:926-32.
152. Issaka S, Alassane D, Ruth D *et al.* A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. *Vaccine* 2009; **27**:3090-8. Reprint: 2009.
153. Jensen PE. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 2007; **8**:1041-8.
154. John TJ, Samuel R. Herd immunity and herd effect: new insights and definitions. *Eur J Epidemiol* 2000; **16**:601-6.
155. Johnson CL, Gale M Jr. CARD games between virus and host get a new player. *Trends Immunol* 2006; **27**:1-4.
156. Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 2004; **116**:299-311.
157. Kabarowski JH. G2A and LPC: Regulatory functions in immunity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009.
158. Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity* 2007; **27**:393-405.
159. Kang SM, Compans RW. Host responses from innate to adaptive immunity after vaccination: molecular and cellular events. *Mol Cells* 2009; **27**:5-14.
160. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007; **13**:552-9.
161. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1751**:119-39.
162. Kenney RT, Edelman R. Survey of human-use adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2003; **2**:167-88.
163. Kenny EF, O'Neill LA. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine* 2008; **43**:342-9.
164. Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J Immunol* 1991; **146**:431-7.
165. Khajuria A, Gupta A, Malik F *et al.* A new vaccine adjuvant (BOS 2000) a potent enhancer mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with HBsAg. *Vaccine* 2007; **25**:4586-94.
166. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C *et al.* CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 2007; **13**:46-53.

167. Kiertscher SM, Roth MD. Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 1996; **59**:208-18.
168. Kim OS, Lee CS, Joe EH, Jou I. Oxidized low density lipoprotein suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglia: oxidative stress acts through control of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **342**:9-18.
169. Kim SH, Oh HK, Ryu CJ, Park SY, Hong HJ. In vivo hepatitis B virus-neutralizing activity of an anti-HBsAg humanized antibody in chimpanzees. *Exp Mol Med* 2008; **40**:145-9.
170. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* 2008; **26**:741-66.
171. Kinuta M, Takei K. Utilization of liposomes in vesicular transport studies. *Cell Struct Funct* 2002; **27**:63-9.
172. Klein Klouwenberg P, Bont L. Neonatal and infantile immune responses to encapsulated bacteria and conjugate vaccines. *Clin Dev Immunol* 2008; **2008**:628963.
173. Klugman KP. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines and their effect on carriage and antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; **1**:85-91.
174. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; **30**:620-50.
175. Kohl J. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol* 2001; **38**:175-87.
176. Kool M, Petrilli V, De Smedt T *et al*. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 2008; **181**:3755-9.
177. Kool M, Soullie T, van Nimwegen M *et al*. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008; **205**:869-82.
178. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**:485-517.
179. Kornbluth RS, Stone GW. Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants. *J Leukoc Biol* 2006; **80**:1084-102.
180. Kotloff KL, Pasetti MF, Barry EM *et al*. Deletion in the *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. *J Infect Dis* 2004; **190**:1745-54.
181. Kruzel ML, Harari Y, Mailman D, Actor JK, Zimecki M. Differential effects of prophylactic, concurrent and therapeutic lactoferrin treatment on LPS-induced inflammatory responses in mice. *Clin Exp Immunol* 2002; **130**:25-31.
182. Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* 2008; **14**:86-92.

183. Kwissa M, Kasturi SP, Pulendran B. The science of adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:673-84.
184. La Du BN, Aviram M, Billecke S *et al.* On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999; **119-120**:379-88.
185. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**:23-9.
186. Lau GK, Suri D, Liang R *et al.* Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002; **122**:614-24.
187. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004; **14**:277-87.
188. Launay O, Grabar S, Bloch F *et al.* Effect of sublingual administration of interferon-alpha on the immune response to influenza vaccination in institutionalized elderly individuals. *Vaccine* 2008; **26**:4073-9.
189. Lavanchy D. Chronic viral hepatitis as a public health issue in the world. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; **22**:991-1008.
190. Lavillette D, Morice Y, Germanidis G *et al.* Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; **79**:6023-34.
191. Leavy, O., Tufet, M., and Bradbrook, S. Innate immunity : sensing and signaling. Latz, E. and Fitzgerald, K. 2008. *Nature Reviews Immunology*, Nature publishing group. Reprint: Poster.
192. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; **337**:1733-45.
193. Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 2005; **17**:313-8.
194. Leroux-Roels I, Borkowski A, Vanwolleghe T *et al.* Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; **370**:580-9.
195. Levie K, Leroux-Roels I, Hoppenbrouwers K *et al.* An adjuvanted, low-dose, pandemic influenza A (H5N1) vaccine candidate is safe, immunogenic, and induces cross-reactive immune responses in healthy adults. *J Infect Dis* 2008; **198**:642-9.
196. Li Y, Kandimalla ER, Yu D, Agrawal S. Oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs augment potent Th1 immune responses to HBsAg in mice. *Int Immunopharmacol* 2005; **5**:981-91.
197. Lindblad EB. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. *Vaccine* 2004; **22**:3658-68.
198. Lindblad EB. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. *Vaccine* 2004; **22**:3658-68.
199. Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D *et al.* Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 2004; **5**:1243-50.

200. Liniger M, Zuniga A, Morin TN *et al.* Recombinant measles viruses expressing single or multiple antigens of human immunodeficiency virus (HIV-1) induce cellular and humoral immune responses. *Vaccine* 2009.
201. Logvinoff C, Major ME, Oldach D *et al.* Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:10149-54.
202. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**:346-51.
203. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005; **6**:1182-90.
204. Ma R, Du JL, Huang J, Wu CY. Additive effects of CpG ODN and R-848 as adjuvants on augmenting immune responses to HBsAg vaccination. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **361**:537-42.
205. Maassab HF, Bryant ML. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev Med Virol* 1999; **9**:237-44.
206. Mackowiak PA. Concepts of fever. *Arch Intern Med* 1998; **158**:1870-81.
207. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:287-93.
208. Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC *et al.* Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 2000; **6**:207-10.
209. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 2007; **316**:1628-32.
210. Matousek MP, Nedrud JG, Harding CV. Distinct effects of recombinant cholera toxin B subunit and holotoxin on different stages of class II MHC antigen processing and presentation by macrophages. *J Immunol* 1996; **156**:4137-45.
211. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993; **92**:1004-8.
212. McVernon J, Mitchison NA, Moxon ER. T helper cells and efficacy of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccination. *Lancet Infect Dis* 2004; **4**:40-3.
213. Mehta D. Lysophosphatidylcholine: an enigmatic lysolipid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; **289**:L174-5.
214. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004; **172**:2731-8.
215. Mettens P, Dubois PM, Demoitie MA *et al.* Improved T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in mice and monkeys induced by a novel formulation of RTS,S vaccine antigen. *Vaccine* 2008; **26**:1072-82.
216. Miller MJ, Safrina O, Parker I, Cahalan MD. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med* 2004; **200**:847-56.
217. Mischler R, Metcalfe IC. Inflexal V a trivalent virosome subunit influenza vaccine:

- production. *Vaccine* 2002; **20 Suppl 5**:B17-23.
218. Miyanohara A, Toh-e A, Nozaki C, Hamada F, Ohtomo N, Matsubara K. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**:1-5.
 219. Mohamadzadeh M, Duong T, Sandwick SJ, Hoover T, Klaenhammer TR. Dendritic cell targeting of Bacillus anthracis protective antigen expressed by Lactobacillus acidophilus protects mice from lethal challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**:4331-6.
 220. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:235-45.
 221. Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, HogenEsch H, Robinson JP, Hem SL. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* 2005; **23**:1588-95.
 222. Moreira AL, Wang J, Sarno EN, Kaplan G. Thalidomide protects mice against LPS-induced shock. *Braz J Med Biol Res* 1997; **30**:1199-207.
 223. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 2004; **430**:242-9.
 224. Morris SK, Moss WJ, Halsey N. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine use and effectiveness. *Lancet Infect Dis* 2008; **8**:435-43.
 225. Mosca F, Tritto E, Muzzi A *et al*. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:10501-6.
 226. Moser C, Amacker M, Kammer AR, Rasi S, Westerfeld N, Zurbriggen R. Influenza virosomes as a combined vaccine carrier and adjuvant system for prophylactic and therapeutic immunizations. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:711-21.
 227. Moser C, Metcalfe IC, Viret JF. Virosomal adjuvanted antigen delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 2003; **2**:189-96.
 228. Moser C, Metcalfe IC, Viret JF. Virosomal adjuvanted antigen delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 2003; **2**:189-96.
 229. Mullen GE, Ellis RD, Miura K *et al*. Phase 1 trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909: an asexual blood-stage vaccine for Plasmodium falciparum malaria. *PLoS ONE* 2008; **3**:e2940.
 230. Murch O, Collin M, Sepodes B, Foster SJ, Mota-Filipe H, Thiemermann C. Lysophosphatidylcholine reduces the organ injury and dysfunction in rodent models of gram-negative and gram-positive shock. *Br J Pharmacol* 2006; **148**:769-77.
 231. Nakamoto N, Cho H, Shaked A *et al*. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* 2009; **5**:e1000313.
 232. Netea MG, Joosten LA, Keuter M *et al*. Circulating lipoproteins are a crucial component of host defense against invasive Salmonella typhimurium infection. *PLoS ONE* 2009; **4**:e4237.
 233. Ng PM, Le Saux A, Lee CM *et al*. C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. *EMBO J* 2007; **26**:3431-40.

234. Nichol KL, Treanor JJ. Vaccines for seasonal and pandemic influenza. *J Infect Dis* 2006; **194 Suppl 2**:S111-8.
235. NIH. Phase I Study of the Safety and Immunogenicity of AMA1-C1/Alhydrogel + CPG 7909, an Asexual Blood Stage Vaccine for Plasmodium Falciparum Malaria. http://clinicalstudies.info.nih.gov/cgi/wais/bold032001.pl?B_07-I-0083.html@adjuvant. 5. Reprint: 2009.
236. NIH. gB/MF59 Vaccine in Preventing CMV Infection in Healthy Adolescent Females. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00133497?term=MF59&rank=10>. 5. Reprint: 2009.
237. Nolan T, Richmond PC, Formica NT *et al.* Safety and immunogenicity of a prototype adjuvanted inactivated split-virus influenza A (H5N1) vaccine in infants and children. *Vaccine* 2008; **26**:6383-91.
238. O'Hagan DT. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:699-710.
239. Ogutu BR, Apollo OJ, McKinney D *et al.* Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS ONE* 2009; **4**:e4708.
240. Okitsu SL, Silvie O, Westerfeld N *et al.* A virosomal malaria peptide vaccine elicits a long-lasting sporozoite-inhibitory antibody response in a phase 1a clinical trial. *PLoS ONE* 2007; **2**:e1278.
241. Otten GR, Schaefer M, Doe B *et al.* Enhanced potency of plasmid DNA microparticle human immunodeficiency virus vaccines in rhesus macaques by using a priming-boosting regimen with recombinant proteins. *J Virol* 2005; **79**:8189-200.
242. Ozaki H, Ishii K, Arai H, Kume N, Kita T. Lysophosphatidylcholine activates mitogen-activated protein kinases by a tyrosine kinase-dependent pathway in bovine aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 1999; **143**:261-6.
243. Palma E, Cho MJ. Improved systemic pharmacokinetics, biodistribution, and antitumor activity of CpG oligodeoxynucleotides complexed to endogenous antibodies in vivo. *J Control Release* 2007; **120**:95-103.
244. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; **113**:153-62.
245. Pantophlet R, Burton DR. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol* 2006; **24**:739-69.
246. Pedra JH, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**:10-6.
247. Pedra JH, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**:10-6.
248. Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol* 2008; **45**:963-70.

249. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; **39**:5-19.
250. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; **39**:5-19.
251. Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm* 2008; **364**:272-80.
252. Perrillo R. Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B. *Hepatology* 2009; **49**:S103-11.
253. Perrin-Cocon L, Agaogue S, Coutant F *et al*. Lysophosphatidylcholine is a natural adjuvant that initiates cellular immune responses. *Vaccine* 2006; **24**:1254-63.
254. Perrin-Cocon L, Coutant F, Agaogue S, Deforges S, Andre P, Lotteau V. Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte. *J Immunol* 2001; **167**:3785-91.
255. Persing DH, Coler RN, Lacy MJ *et al*. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol* 2002; **10**:S32-7.
256. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; **45**:529-38.
257. Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E *et al*. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:6025-30.
258. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 2004; **82**:488-96.
259. Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ *et al*. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* 1997; **176**:924-32.
260. Plotkin SA. Vaccines, vaccination, and vaccinology. *J Infect Dis* 2003; **187**:1349-59.
261. Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nat Med* 2005; **11**:S5-11.
262. Podda A, Del Giudice G. MF59-adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile. *Expert Rev Vaccines* 2003; **2**:197-203.
263. Poland GA, Jacobson RM. Clinical practice: prevention of hepatitis B with the hepatitis B vaccine. *N Engl J Med* 2004; **351**:2832-8.
264. Poltl-Frank F, Zurbriggen R, Helg A *et al*. Use of reconstituted influenza virus virosomes as an immunopotentiating delivery system for a peptide-based vaccine. *Clin Exp Immunol* 1999; **117**:496-503.
265. Poole CD, Conway P, Reynolds A, Currie CJ. The association between C-reactive protein and the likelihood of progression to joint replacement in people with rheumatoid arthritis: a retrospective observational study. *BMC Musculoskelet Disord* 2008; **9**:146.

266. Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; **124**:849-63.
267. Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; **124**:849-63.
268. Querec T, Bennouna S, Alkan S *et al.* Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med* 2006; **203**:413-24.
269. Quintilio W, Kubrusly FS, Iourtov D *et al.* Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. *Vaccine* 2009.
270. Qureshi N, Mascagni P, Ribic E, Takayama K. Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* R595. Purification of the dimethyl derivative by high performance liquid chromatography and complete structural determination. *J Biol Chem* 1985; **260**:5271-8.
271. Qureshi N, Takayama K, Ribic E. Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 1982; **257**:11808-15.
272. Ragupathi G, Yeung KS, Leung PC *et al.* Evaluation of widely consumed botanicals as immunological adjuvants. *Vaccine* 2008; **26**:4860-5.
273. Rakoto-Andrianarivelo M, Gumedde N, Jegouic S *et al.* Reemergence of recombinant vaccine-derived poliovirus outbreak in Madagascar. *J Infect Dis* 2008; **197**:1427-35.
274. Rappuoli R. Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nat Biotechnol* 2007; **25**:1361-6.
275. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 2009; **30**:23-32.
276. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:215-29.
277. Reyes-Sandoval A, Harty JT, Todryk SM. Viral vector vaccines make memory T cells against malaria. *Immunology* 2007; **121**:158-65.
278. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* 2009; **323**:1304-7.
279. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2005; **18**:21-5.
280. Riedmann EM, Kyd JM, Cripps AW, Lubitz W. Bacterial ghosts as adjuvant particles. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:241-53.
281. Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem* 2001; **47**:403-11.
282. Roestenberg M, Remarque E, de Jonge E *et al.* Safety and immunogenicity of a recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1 malaria vaccine adjuvanted with Alhydrogel, Montanide ISA 720 or AS02. *PLoS ONE* 2008; **3**:e3960.
283. Rogan D, Babiuk LA. Novel vaccines from biotechnology. *Rev Sci Tech* 2005;

- 24**:159-74.
284. Romero Mendez IZ, Shi Y, HogenEsch H, Hem SL. Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 2007; **25**:825-33.
285. Roy P, Noad R. Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Hum Vaccin* 2008; **4**:5-12.
286. Ruby J, Rehani K, Martin M. *Treponema denticola* activates mitogen-activated protein kinase signal pathways through Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2007; **75**:5763-8.
287. Ryborg AK, Deleuran B, Sogaard H, Kragballe K. Intracutaneous injection of lysophosphatidylcholine induces skin inflammation and accumulation of leukocytes. *Acta Derm Venereol* 2000; **80**:242-6.
288. Saha DC, Barua RS, Astiz ME, Rackow EC, Eales-Reynolds LJ. Monophosphoryl lipid A stimulated up-regulation of reactive oxygen intermediates in human monocytes in vitro. *J Leukoc Biol* 2001; **70**:381-5.
289. Sakurai F, Terada T, Maruyama M *et al.* Therapeutic effect of intravenous delivery of lipoplexes containing the interferon-beta gene and poly I: poly C in a murine lung metastasis model. *Cancer Gene Ther* 2003; **10**:661-8.
290. SALK JE, KRECH U, YOUNGNER JS, BENNETT BL, LEWIS LJ, BAZELEY PL. Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines. *Am J Public Health Nations Health* 1954; **44**:563-70.
291. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; **179**:1109-18.
292. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P *et al.* Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; **28**:2760-9.
293. Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 2006; **176**:5153-9.
294. Santiago AE, Cole LE, Franco A, Vogel SN, Levine MM, Barry EM. Characterization of rationally attenuated *Francisella tularensis* vaccine strains that harbor deletions in the *guaA* and *guaB* genes. *Vaccine* 2009; **27**:2426-36.
295. Schijns V. Unraveling "the immunologist's dirty little secret". In: Schijns V. OD, ed. *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. Elsevier, 2006
Reprint: 2006.
296. Schim van der Loeff MF, Jaffar S, Aveika AA *et al.* Mortality of HIV-1, HIV-2 and HIV-1/HIV-2 dually infected patients in a clinic-based cohort in The Gambia. *AIDS* 2002; **16**:1775-83.
297. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999; **283**:857-60.
298. Schreurs MW, Eggert AA, de Boer AJ, Figdor CG, Adema GJ. Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*

- 1999; **29**:2835-41.
299. Schultz DR, Harrington WJ Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 2003; **32**:345-69.
300. Schultze V, D'Agosto V, Wack A, Novicki D, Zorn J, Hennig R. Safety of MF59 adjuvant. *Vaccine* 2008; **26**:3209-22.
301. Schumacher R, Amacker M, Neuhaus D *et al*. Efficient induction of tumoricidal cytotoxic T lymphocytes by HLA-A0201 restricted, melanoma associated, L(27)Melan-A/MART-1(26-35) peptide encapsulated into virosomes in vitro. *Vaccine* 2005; **23**:5572-82.
302. Segura E, Villadangos JA. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**:105-10.
303. Sela M, Arnon R, Schechter B. Therapeutic vaccines: realities of today and hopes for the future. *Drug Discov Today* 2002; **7**:664-73.
304. Seubert A, Monaci E, Pizza M, O'Hagan DT, Wack A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *J Immunol* 2008; **180**:5402-12.
305. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**:19-30.
306. Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 2004; **58**:391-424.
307. Shumilina E. V. , Khromova Y. L. , Shchipunov Y. A. The effect of lysophosphatidylcholine and phosphatidylglycerol on lecithin polymer-like micelles. *Colloid Journal* 2006; **68**:241-7.
308. Siegrist C-A. Vaccine immunology. In: Stanley A. Plotkin WAOPAO, ed. *Vaccines*. Elsevier, 2008
Reprint: 2008.
309. Silverstein RL. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med* 2009; **76 Suppl 2**:S27-30.
310. Simon BE, Cornell KA, Clark TR, Chou S, Rosen HR, Barry RA. DNA vaccination protects mice against challenge with *Listeria monocytogenes* expressing the hepatitis C virus NS3 protein. *Infect Immun* 2003; **71**:6372-80.
311. Simon J. ER. Clinical evaluation of adjuvants. In: Schijns V. OD, ed. *Immunopotentiators in modern vaccines*. Elsevier, 2006
Reprint: 2006.
312. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res* 2002; **19**:715-28.
313. Smyk-Pearson S, Tester IA, Lezotte D, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Rosen HR. Differential antigenic hierarchy associated with spontaneous recovery from hepatitis C virus infection: implications for vaccine design. *J Infect Dis* 2006; **194**:454-63.
314. Sokal EM, Hoppenbrouwers K, Vandermeulen C *et al*. Recombinant gp350 vaccine

- for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J Infect Dis* 2007; **196**:1749-53.
315. Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 2007; **25**:4575-85.
 316. Sosnik A, Chiappetta DA, Carcaboso AM. Drug delivery systems in HIV pharmacotherapy: What has been done and the challenges standing ahead. *J Control Release* 2009.
 317. Spearman P, Kalams S, Elizaga M *et al.* Safety and immunogenicity of a CTL multiepitope peptide vaccine for HIV with or without GM-CSF in a phase I trial. *Vaccine* 2009; **27**:243-9.
 318. Sprengers D, van der Molen RG, Kusters JG *et al.* Analysis of intrahepatic HBV-specific cytotoxic T-cells during and after acute HBV infection in humans. *J Hepatol* 2006; **45**:182-9.
 319. Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein. *Trans Assoc Am Physicians* 1992; **105**:44-63.
 320. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; **272**:20963-6.
 321. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**:3883-7.
 322. Steinbrecher UP, Pritchard PH. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res* 1989; **30**:305-15.
 323. Steinman RM. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity* 2008; **29**:319-24.
 324. Stephens DS. Vaccines for the unvaccinated: protecting the herd. *J Infect Dis* 2008; **197**:643-5.
 325. Stoll-Keller F, Barth H, Fafi-Kremer S, Zeisel MB, Baumert TF. Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress. *Expert Rev Vaccines* 2009; **8**:333-45.
 326. Subbaiah PV, Chen CH, Bagdade JD, Albers JJ. Substrate specificity of plasma lysolecithin acyltransferase and the molecular species of lecithin formed by the reaction. *J Biol Chem* 1985; **260**:5308-14.
 327. Sugiyama S, Kugiyama K, Ogata N *et al.* Biphasic regulation of transcription factor nuclear factor-kappaB activity in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine through protein kinase C-mediated pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**:568-76.
 328. Sun HX, Wang H, Xu HS, Ni Y. Novel polysaccharide adjuvant from the roots of *Actinidia eriantha* with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine* 2009.

329. Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 2009; **27**:1787-96.
330. Sun Y, Lee JH, Kim NH *et al.* Lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in H19-7 hippocampal progenitor cells is enhanced by the upregulation of Fas Ligand. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1791**:61-8.
331. Tacket C. SD. Cholera Vaccines. In: Stanley A. Plotkin WAOPAO, ed. *Vaccines*. Elsevier, 2008
Reprint: 2008.
332. Takada H, Galanos C. Enhancement of endotoxin lethality and generation of anaphylactoid reactions by lipopolysaccharides in muramyl-dipeptide-treated mice. *Infect Immun* 1987; **55**:409-13.
333. Takahara N, Kashiwagi A, Maegawa H, Shigeta Y. Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells. *Metabolism* 1996; **45**:559-64.
334. Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol* 2000; **165**:5780-7.
335. Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* 65, 787-800 (1937). *Rev Med Virol* 2000; **10**:6-16; discussion 3-5.
336. Thimme R, Wieland S, Steiger C *et al.* CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; **77**:68-76.
337. Thomas D. RSLS . Non-A, non-B viral hepatitis and hepatitis C. In: Mandell G. BJDR, ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier, 2005
338. Thompson FM, Porter DW, Okitsu SL *et al.* Evidence of blood stage efficacy with a virosomal malaria vaccine in a phase IIa clinical trial. *PLoS ONE* 2008; **3**:e1493.
339. Tiemi Shio M, Eisenbarth SC, Savaria M *et al.* Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog* 2009; **5**:e1000559.
340. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**:975-1028.
341. Tsuji M, Zavala F. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of Plasmodium. *Trends Parasitol* 2003; **19**:88-93.
342. Tsurudome M, Gluck R, Graf R, Falchetto R, Schaller U, Brunner J. Lipid interactions of the hemagglutinin HA2 NH2-terminal segment during influenza virus-induced membrane fusion. *J Biol Chem* 1992; **267**:20225-32.
343. Ulmer JB, Valley U, Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat Biotechnol* 2006; **24**:1377-83.
344. Ulmer JB, Wahren B, Liu MA. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med* 2006; **12**:216-22.
345. Urbani S, Boni C, Amadei B *et al.* Acute phase HBV-specific T cell responses

- associated with HBV persistence after HBV/HCV coinfection. *Hepatology* 2005; **41**:826-31.
346. Vajo Z, Kosa L, Visontay I, Jankovics M, Jankovics I. Inactivated whole virus influenza A (H5N1) vaccine. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**:807-8.
 347. Valensi JP, Carlson JR, Van Nest GA. Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. *J Immunol* 1994; **153**:4029-39.
 348. van Gisbergen KP, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol* 2005; **26**:626-31.
 349. van Kooyk Y. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans* 2008; **36**:1478-81.
 350. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC *et al.* Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995; **96**:2758-67.
 351. van Oosten M, van Amersfoort ES, van Berkel TJ, Kuiper J. Scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide and lipoteichoic acid to liver endothelial and Kupffer cells. *J Endotoxin Res* 2001; **7**:381-4.
 352. Vanden Broeck D, Horvath C, De Wolf MJ. *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**:1771-5.
 353. Vangasseri DP, Cui Z, Chen W, Hokey DA, Falo LD Jr, Huang L. Immunostimulation of dendritic cells by cationic liposomes. *Mol Membr Biol* 2006; **23**:385-95.
 354. Vermout S. DMLBMB. Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Annale de médecine vétérinaire* 2003; **147**:393-401.
Reprint: 2003.
 355. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:523-32.
 356. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**:543-55.
 357. Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004; **306**:1517-9.
 358. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; **9**:503-10.
 359. Vogel F. HS. Immunologic adjuvants. In: Stanley A. Plotkin WAOPAO, ed. *Vaccines*. Elsevier, 2008
Reprint: 2008.
 360. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv* 2003; **3**:466-77.
 361. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* 2001; **38**:189-97.

362. Volanakis JE, Wirtz KW. Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature* 1979; **281**:155-7.
363. von Hahn T, Yoon JC, Alter H *et al.* Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 2007; **132**:667-78.
364. Wakita T, Pietschmann T, Kato T *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; **11**:791-6.
365. Walzer T, Blery M, Chaix J *et al.* Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:3384-9.
366. Wang HB, Weller PF. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. *J Leukoc Biol* 2008; **83**:817-21.
367. Wang X, Zhang Z, Zhang S *et al.* B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 2008; **38**:3226-36.
368. Wang Z, Choi MK, Ban T *et al.* Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:5477-82.
369. Watarai H, Sekine E, Inoue S, Nakagawa R, Kaisho T, Taniguchi M. PDC-TREM, a plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, is responsible for augmented production of type I interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:2993-8.
370. Watts C, Zaru R, Prescott AR, Wallin RP, West MA. Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**:73-8.
371. Webster GJ, Reignat S, Brown D *et al.* Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 2004; **78**:5707-19.
372. Wei Z, McEvoy M, Razinkov V *et al.* Biophysical characterization of influenza virus subpopulations using field flow fractionation and multiangle light scattering: correlation of particle counts, size distribution and infectivity. *J Virol Methods* 2007; **144**:122-32.
373. Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 2003; **37**:577-89.
374. Weseslindtner L, Neumann-Haefelin C, Viazov S *et al.* Acute infection with a single hepatitis C virus strain in dialysis patients: Analysis of adaptive immune response and viral variability. *J Hepatol* 2009; **50**:693-704.
375. WHO. Hepatitis C. <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index.html>. 2002. 6.
376. Williams MA, Bevan MJ. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**:171-92.
377. Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology* 2006; **44**:521-6.
378. Wilschut J. Influenza vaccines: the virosome concept. *Immunol Lett* 2009; **122**:118-

- 21.
379. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; **88**:1785-92.
380. Wu L, Dakic A. Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol* 2004; **1**:112-8.
381. Wu Y, Ellis RD, Shaffer D *et al*. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS ONE* 2008; **3**:e2636.
382. Xie Y, Sun HX, Li D. Platygodin D is a potent adjuvant of specific cellular and humoral immune responses against recombinant hepatitis B antigen. *Vaccine* 2009; **27**:757-64.
383. Yan, J. J., Jung, J. S., Lee, J. E., Lee, J., Huh, S. O., Kim, H. S., Jung, K. C., Cho, J. Y., Nam, J. S., Suh, H. W., Kim, Y. H. , and Song, D. K. Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med* 10(2), 161-7. 2004.
384. Zeisel MB, Fafi-Kremer S, Fofana I *et al*. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; **13**:4824-30.
385. Zembowicz A, Tang JL, Wu KK. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 1995; **270**:17006-10.
386. Zhang P, Zhong L, Struble EB *et al*. Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**:7537-41.
387. Zhong H, Shurin MR, Han B. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy for cancer. *Expert Rev Vaccines* 2007; **6**:333-45.
388. Zhu KJ, Cen JP, Lou JX *et al*. Imiquimod inhibits the differentiation but enhances the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2009; **9**:412-7.
389. Zhu Y, Lin JH, Liao HL, Verna L, Stemerman MB. Activation of ICAM-1 promoter by lysophosphatidylcholine: possible involvement of protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1345**:93-8.
390. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; **12**:121-7.
391. Zou GM, Tam YK. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* 2002; **13**:186-99.
392. Zwick MB, Burton DR. HIV-1 neutralization: mechanisms and relevance to vaccine design. *Curr HIV Res* 2007; **5**:608-24.

RESUME en français

La découverte d'adjuvants de vaccination est en pleine expansion dans un contexte réglementaire de plus en plus strict. L'objectif de ce travail de thèse a été de proposer un adjuvant hautement caractérisé de la famille de la lysophosphatidylcholine (LPC) pour un développement clinique. Il avait été précédemment montré que la LPC d'œuf de poule présentait des propriétés adjuvantes *in vitro* et *in vivo*. Cependant, il s'agit d'un mélange hétérogène d'espèces moléculaires de LPC peu exploitable en clinique. Nous avons donc cherché à 1/ cribler *in vitro* 5 différentes espèces moléculaires de LPC ayant des activités adjuvantes, et 2/ évaluer chez la souris l'aptitude des molécules sélectionnées à induire des réponses humorales et cellulaires.

Deux candidats, les LPC C16 :0 et C18 :0, induisent *in vitro* la maturation de cellules dendritiques humaines caractérisée par l'augmentation de l'expression des marqueurs de surface, la production de chimiokines pro-Th1 et l'engagement vers un profil Th1 de lymphocytes T CD4+. Chez la souris, l'injection i. v. des candidats induit une réponse inflammatoire transitoire et modérée au profil Th2 (IL-5, IL-6). De plus, ces espèces induisent une réponse humorale spécifique contre 3 antigènes viraux après injection s. c. ou i. m. (NS3 du VHC, HBsAg du VHB et gp120 du VIH), proche de celle obtenue avec l'alun et à des doses faibles supposées non toxiques. Dans ces modèles, en revanche, les LPC individuelles ne semblent pas induire de réponses cellulaires spécifiques.

L'ensemble de ces résultats ouvre d'intéressantes perspectives pour l'utilisation des LPC C16 :0 et C18 :0 en tant qu'adjuvants de vaccination de réponses immunitaires humorales.

TITRE en anglais

Description of single lysophosphatidylcholine species with adjuvant features as candidates for clinical development

RESUME en anglais

The evaluation of new vaccine adjuvants is growing fast in a stringent regulatory environment. The aim of this thesis project was to propose a highly defined adjuvant derived from the lysophosphatidylcholine (LPC) for clinical development. It has been previously shown that an egg-derived LPC has *in vitro* and *in vivo* adjuvant features. However, it is composed of a heterogeneous mixture of molecular species of LPC, thus precluding its clinical evaluation. Therefore, we decided to 1/ screen *in vitro* 5 single species of LPC for their adjuvant properties, and 2/ evaluate in the mouse model the ability of selected compounds to induce humoral and cellular responses.

Two candidates, the C16:0- and C18:0-LPC, induce *in vitro* maturation of human dendritic cells as defined by an upregulation of the expression of surface markers, production of pro-Th1 chemokines, and engagement of CD4+ T lymphocytes towards a Th1 profile. In mice, i. v. injection of both candidates triggers a transient and moderate inflammatory response with a Th2 profile (IL-5, IL-6). In addition, these species initiate specific humoral responses against 3 viral antigens following s. c. or i. m. injection (NS3 from HCV, HBsAg from HBV and gp120 from HIV), close to what is achieved with alum and at low doses expected to be safe in humans. In these models, however, single LPC do not mediate specific cellular responses.

Overall, these results open interesting perspectives for the single C16:0- and C18:0-LPC as vaccine adjuvants for the induction of humoral immune responses.

DISCIPLINE

Immunologie

MOTS-CLES

Adjuvant, lysophosphatidylcholine, vaccin, hépatite C, hépatite B, virus de l'immunodéficience acquise, développement clinique

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

TRANSGENE S.A., Département des Maladies Infectieuses, Centre d'Infectiologie, bâtiment Domilyon, 321 avenue Jean Jaurès, 69007 Lyon, France

INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, 69007, France