

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Vaccination de volontaires sains avec le vaccin contre la fièvre
jaune afin de caractériser la réponse immunitaire protectrice**

Par

René Therrien

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M. Sc.)
en microbiologie et immunologie

Avril 2008

© René Therrien, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Vaccination de volontaires sains avec le vaccin contre la fièvre
jaune afin de caractériser la réponse immunitaire protectrice**

présenté par :
René Therrien

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Thibodeau, Ph. D.
président-rapporteur

Rafick-Pierre Sékaly, Ph. D.
directeur de recherche

Silvia Vidal, Ph. D.
membre du jury

Résumé en français et mots clés

Le vaccin contre la fièvre jaune YF17D, offrant une protection exceptionnelle approchant 100%, est un parfait modèle d'étude des corrélats de protection immunitaires, notions essentielles pour le développement de nouveaux vaccins. Vingt volontaires se sont fait vacciner avec le YF17D et ont donné de leur sang avant et jusqu'à un an après la vaccination. Grâce à des études de transcription par puces à ADN sur ces échantillons, l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans une vaste gamme de mécanismes immunologiques a été observée dès la troisième journée après vaccination. Ces gènes incluent ceux induits par les interférons, ceux des récepteurs de type Toll, du système du complément, des macrophages, des cellules tueuses naturelles (NK), des cellules auxiliaires (T_{H1} et T_{H2}), ainsi que des lymphocytes B. La participation de tous les lymphocytes, dont les T_H , les cellules cytotoxiques (CTL), les NK et les B, a été confirmée par cytométrie de flux deux semaines après vaccination. Des analyses aux niveaux transcriptionnel et protéique ont démontré que cette participation de plusieurs cellules de diverses lignées s'accompagne d'une réponse de lymphocytes auxiliaires et cytotoxiques spécifiques au YF17D. Celles-ci sont variables en force et en amplitude selon les individus, mais une constante se démarque de l'analyse : la réponse immunitaire est polyfonctionnelle, impliquant une réponse à la fois T_{H1} et T_{H2} . Des analyses de transcription ont permis de ressortir l'importance de STAT1, de IRF7 et de ETS2 dans la réponse initiale au vaccin, celle de STAT1 et de IRF1 dans la stimulation de PBMC du jour 365, celle des gènes reliés aux interférons et à l'inflammasome dans le contrôle de la virémie et celle des gènes rattachés à l'IL-2 et à l'activation des cellules T et B dans une large réponse T auxiliaire. Cette caractérisation de la réponse protectrice induite par le YF17D constitue une base solide de connaissances qui contribuera à l'élaboration rationnelle de futurs vaccins contre le VIH, l'hépatite C ou le cancer.

Mots clés

Corrélats de protection immunitaire, fièvre jaune, vaccin, cellules T, T_{H1}/T_{H2}

Résumé en anglais et mots clés

Knowledge about correlates of immune protection necessary to develop successful new vaccines is still insufficient. Protecting approximately 100 % of all vaccinated people, the yellow fever vaccine YF17D is a perfect model to study correlates of immune protection. Here, twenty volunteers were vaccinated with YF17D and followed for up to one year thereafter. Gene array analysis of blood cell gene expression showed variation as early as three days after vaccination. The modulated genes included interferon-induced genes, as well as genes associated with toll-like receptors, complement cascade, macrophages, natural killer (NK) cells, T helper (T_H)1 and T_H2 cells, and B lymphocytes. The involvement of all lymphocytes, including T_H, cytotoxic T lymphocytes (CTL), NK and B cells, at day 14 was confirmed by FACS. Analyses at the transcription and protein levels showed that antigen-specific T_H and CTL cells were induced by the vaccine. This T cell response was variable in strength and in amplitude among volunteers; however, almost all volunteers mounted a polyfunctional T_H1/T_H2 response. Gene array and gene set enrichment analyses also showed the involvement of numerous important genes. STAT1, IRF7 and ETS2, which are major transcription factors in the initiation of immune responses, were involved one week following vaccination. STAT1, IRF1 and their targets were strongly up-regulated in PBMC from day 365 after vaccination that were stimulated *ex-vivo* with YF17D-derived peptide pools. Gene signatures associated with control of viremia (including interferon-induced genes and inflammasome-related genes) and strong CD4⁺ response (including genes of the IL-2 induction pathway and T and B cell activation genes) were identified. Voluminous knowledge stems from this characterization of the immune response induced by YF17D, and this study will help in the rational design of vaccines against AIDS, HCV and cancer.

Key words:

Correlates of immune protection, yellow fever, vaccine, T cells, T_H1/T_H2

Table des matières

<i>Résumé en français et mots clés</i>	<i>iii</i>
<i>Résumé en anglais et mots clés</i>	<i>iv</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des documents informatiques</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>viii</i>
<i>Liste des sigles, abréviations et acronymes</i>	<i>ix</i>
1. Problématique	1
2. Introduction	5
2.1 Mécanismes impliqués dans les corrélats de protection immunitaires	6
2.1.1 Réponse immunitaire innée.....	7
2.1.1.1 Cellules dendritiques	7
2.1.1.2 Récepteurs de type Toll.....	8
2.1.1.3 Interaction entre les DC et les cellules T.....	9
2.1.2 Réponse immunitaire acquise.....	10
2.1.2.1 Lymphocytes T auxiliaires	10
2.1.2.2 Les T _{H1} et la réponse immunitaire cellulaire	12
2.1.2.3 Les T _{H2} et la réponse immunitaire humorale.....	13
2.1.2.4 Les lymphocytes T mémoires	14
2.1.3 Caractéristiques immunologiques associées à la résolution des maladies.....	15
2.2 Types de vaccins existant et leurs effets	16
2.2.1 Vaccins atténués.....	16
2.2.2 Vaccins inactivés et de protéines purifiées.....	17
2.2.2 Vaccins d'ADN recombinant	17
2.2.3 Vaccins de microorganismes recombinants	18
2.2.4 Adjuvants et leurs effets.....	18
2.3 Vaccins en développement	19
2.3.1 Vaccination contre le SIDA	20
2.3.1.1 Tentatives de vaccination antérieures	20
2.3.1.2 Importance des différentes facettes de l'immunologie dans la réponse au VIH.....	22
2.3.1.3 Corrélats de protection immunitaire contre le VIH.....	23
2.3.2 Vaccination contre l'hépatite C	25
2.3.2.1 La maladie et ses traitements	26
2.3.2.2 Tentatives de vaccination antérieures	27
2.3.2.3 Corrélats de protection immunitaire contre le HCV	28
2.3.3 Vaccination contre le cancer	29
2.3.3.1 Tentatives de vaccination antérieures	29
2.3.3.2 Mécanismes d'évasion tumorale.....	30
2.3.3.3 Antigènes ciblés par un vaccin contre le cancer	31
2.3.3.4 Corrélats de protection immunitaire contre le cancer.....	34
2.4 La fièvre jaune et son vaccin	35
2.4.1 La maladie de la fièvre jaune	35
2.4.1.1 Vecteurs du virus de la fièvre jaune.....	36
2.4.1.2 Symptômes de la maladie et traitements.....	37
2.4.1.3 Virologie moléculaire de la fièvre jaune	38

2.4.1.4	<i>Cycle de réplication du virus de la fièvre jaune</i>	39
2.4.1.5	<i>Réponse immunitaire induite par le virus de la fièvre jaune</i>	40
2.4.2	Le vaccin contre la fièvre jaune YF17D	41
2.4.2.1	<i>Différences moléculaires entre le YF17D et le virus sauvage</i>	41
2.4.2.2	<i>Effets secondaires du YF17D</i>	43
2.4.3	La réponse immunitaire induite par le YF17D	44
2.4.3.1	<i>Réponse immunitaire innée contre le YF17D</i>	44
2.4.3.2	<i>Réponse humorale contre le YF17D</i>	46
2.4.3.3	<i>Réponse cellulaire contre le YF17D</i>	46
2.5	Projet de recherche	48
2.5.1	Objectif, hypothèses et méthodes de recherche.....	48
2.5.2	Contribution de l'auteur.....	49
3.	Article scientifique	51
3.1	Corps du travail	54
3.2	Matériels et méthodes	63
3.2.1	Vaccination of human volunteers and blood collection	63
3.2.2	Gene array analysis of whole blood	64
3.2.3	Identification of transcription factors	65
3.2.4	Flow cytometric analysis of Ki67 ⁺ cells in various blood cell populations.....	66
3.2.5	Proliferation and cytokine secretion assays.....	66
3.2.6	Gene array on ex-vivo stimulated PBMC	67
3.2.7	Th1/Th2 profile assignment	67
3.2.8	CBA on supernatants from ex-vivo stimulated PBMC	67
3.3	Remerciements	68
3.4	Figures de l'article	69
3.5	Légendes des figures de l'article	84
3.6	Tableaux supplémentaires	90
3.7	Documents supplémentaires	94
3.8	Références de l'article	95
4.	Discussion	100
4.1	Le YF17D induit la transcription de gènes liés à l'immunité innée et acquise ..	101
4.2	Le YF17D induit une réponse T_{H1} et T_{H2} persistante	105
4.3	L'efficacité de l'immunité induite par le YF17D passe par STAT1 et IRF1	110
4.4	Signatures transcriptionnelles du contrôle de la virémie et d'une large réponse CD4⁺	112
4.5	Corrélat de protection immunitaire contre la fièvre jaune	114
5.	Conclusion	116
Recommandations	118	
Annexes	119	
Références	121	

Liste des tableaux

Tableau I.	Mutations observées entre le YF17D et la souche virale sauvage	42
Supplementary Table I.	The humoral immune response elicited by YF vaccination is variable	90
Supplementary Table II.	Comparison of Th profiles determined by gene microarray or CBA	91
Supplementary Table III.	Viremia following YF vaccination is variable.....	92
Supplementary Table IV.	Comprehensive list of the 20 volunteers enrolled in our study	93
Tableau d'annexe	Caractéristiques des volontaires utilisés pour les tests de Spearman	120

Liste des documents informatiques

Supplementary Document 1: YF17D vaccination regulates the transcription of numerous genes in total blood cells.

Supplementary Document 2: List of the modulated genes in PBMC from Day 3 (volunteer YF013) and Day 7 (volunteer YF019) stimulated with selected YF17D-derived immunostimulatory pools (spreadsheet a), and from Day 365 (YF003, YF011, YF016, YF019, YF02020.) cells stimulated once (PNRS) or twice (PP) with immunostimulatory pools.

Supplementary Document 3: Lists of genes selected to make up the “TLR-associated and IFN-induced genes”, “complement-associated genes”, macrophage-associated genes”, “NK cell-associated genes”, “Th1/Th2-associated genes” and “B cell-associated genes” gene sets used for Figures 1d, e, f, g, h and i, respectively.

Supplementary Document 4. Gene signatures associated with a strong CD4+ response and control of viremia following YF17D vaccination.

Liste des figures

Figure 1.	Cycles de transmission du virus de la fièvre jaune.....	36
Figure 2.	Cycle de réplication du virus de la fièvre jaune	40
Figure 3.	Corrélat de protection d'une réponse immunitaire efficace contre un vaccin comme suggérés par l'étude	115

Figures d'articles

Figure 1.	Vaccination with YF17D induces early gene transcription.....	69
Figure 2.	Yellow fever vaccine 17D induces multifunctional responses.....	72
Figure 3.	Heatmap of the transcriptional network of differentially expressed genes as inferred by gene set enrichment analysis on <i>ex-vivo</i> stimulated PBMC	75
Figure 4.	Gene signatures associated with a strong CD4 ⁺ T cell response and control of viremia following YF17D vaccination	76

Figures supplémentaires

Figure 1.	Transcriptional network of differentially expressed genes following YF17D vaccination, as inferred by gene set enrichment analysis	77
Figure 2.	Analysis of Ki67 expression in different subsets of PBMC	78
Figure 3.	YF-specific CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cell responses following YF17D vaccination are variable.....	80
Figure 4.	The mixed Th1/Th2 antigen-specific response induced by YF17D vaccination is persistent	82
Figure 5.	Schematic representation of the 22 YF17D-derived peptide pools used in this study	82
Figure 6.	Segregation of vaccinated volunteers according to two clinical parameters: strength of the CD4 ⁺ response at Day 60, as measured by proliferative response to YF17D peptide pools, and highest viremia.....	83
Figure d'annexe.	The mixed T _{H1} /T _{H2} antigen-specific response induced by YF17D vaccination is persistent (version avec IL-5)	120

Liste des sigles, abréviations et acronymes

ADN	Acide désoxyribonucléique
APC	Cellule présentatrice d'antigène, <i>Antigen presenting cell</i>
ARN	Acide ribonucléique
CD	Antigène de différenciation, <i>Cluster of differentiation</i>
cDC	Cellule dendritique conventionnelle, ou myéloïde
CBA	Essai en cytométrie par billes, <i>Cytometric Bead Array</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CTL	Lymphocyte T cytotoxique, <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DC	Cellule dendritique, <i>dendritic cell</i>
EBV	virus d'Epstein-Barr
FACS	Cytomètre de flux, <i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
HLA	CMH chez l'humain, <i>human leukocyte antigen</i>
IFN-	Interféron
IL-	Interleukine
ISG	Gène induit par les interférons, <i>interferon stimulated gene</i>
kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
NF-	Facteur de transcription nucléaire, <i>Nuclear factor</i>
NK	Cellule tueuse naturelle, <i>Natural killer cell</i>
PBMC	Cellules mononucléaires du sang périphérique, <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïdes
PCR	Réaction de polymérase en chaîne, <i>Polymerase chain reaction</i>
RE	Réticulum endoplasmique
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
T _{CM}	Lymphocytes T mémoire centrale
TCR	Récepteur de la cellule T, <i>T cell receptor</i>
T _{EM}	Lymphocytes T mémoire effecteur
T _H	Lymphocytes T auxiliaire, <i>T helper cell</i>
T _{H1}	Lymphocytes T auxiliaire de type 1
T _{H2}	Lymphocytes T auxiliaire de type 2
TLR	Récepteur de type Toll, <i>Toll like receptor</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale, <i>Tumor necrosis factor</i>
Treg	Lymphocytes T régulateurs
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

À Joriane et Valérie, mes amours

et

À ceux qui ont cru indéfectiblement en moi

1. Problématique

En ce début de millénaire, les efforts investis à la découverte de remèdes contre des maladies sont inégalés dans l'histoire de l'humanité. Tant dans le monde universitaire que dans le domaine privé, des ressources toujours plus importantes sont investies pour vaincre les fléaux d'aujourd'hui, comme le SIDA, l'hépatite C ou le cancer. Or les médicaments, souvent onéreux, ne sont accessibles qu'aux mieux nantis de la planète, alors que certaines de ces maladies sévissent particulièrement dans les pays en voie de développement et affligent des populations qui n'ont tout simplement pas les moyens de s'offrir des traitements de base.

Le développement de vaccins constitue une alternative à ces thérapies ciblant trop peu de gens. Permanente et peu coûteuse, la vaccination peut être autant prophylactique, donc capable de prémunir une personne contre une future infection, que thérapeutique, et guérir un patient d'une maladie. Depuis l'immense succès du vaccin contre la variole, qui éradiqua celle-ci en 1979¹, plusieurs autres vaccins ont été développés. Que ce soit contre la fièvre jaune, la poliomyélite, le tétanos ou les hépatites A et B, la conception de vaccins efficaces ne semblait pas avoir de limites. Pourtant, les méthodes originales de création de vaccin n'ont pas eu de succès contre certaines maladies qui sévissent encore aujourd'hui.

Parmi les causes de ces échecs, la plus importante est notre manque de connaissances dans le fonctionnement de la réponse immunitaire protectrice et permanente. En ne reproduisant pas certaines caractéristiques essentielles pour un vaccin efficace, les derniers développés empiriquement étaient voués à l'échec. De cette élaboration aléatoire de vaccins, méthode originale aujourd'hui désuète, il est maintenant nécessaire de conceptualiser rationnellement les prochains vaccins. Les caractéristiques que devront avoir ces vaccins sont appelées **corrélats de protection immunitaire**, qui se définissent par **ce qui est stimulé par les vaccins efficaces et qui est garant de la protection accordée par ceux-ci**².

L'étude des corrélats étant encore à ses débuts, très peu de caractéristiques immunologiques sont définies comme de réels corrélats de protection. De ce nombre, on peut identifier la quantité d'anticorps spécifiques au pathogène, la persistance des cellules productrices d'anticorps, le nombre de cellules T spécifiques au pathogène et productrices d'IFN- γ et d'IL-2². Or, il est plausible qu'il existe d'autres caractéristiques de l'immunité, qui ont probablement un impact sur la protection immunitaire efficace. En effet, les derniers vaccins qui tentaient de reproduire les corrélats connus ont échoué.

Il va donc de soi que la compréhension des différents mécanismes qui régissent les réponses immunitaires est primordiale pour identifier ces corrélats. Les nombreuses découvertes récentes dans toutes les branches de l'immunologie, de la réponse innée à celle acquise, pourraient s'avérer essentielles dans l'obtention d'une protection efficace contre un pathogène. Cependant, chacun de ces mécanismes ne constitue pas toujours un corrélat de protection, puisqu'une réponse immunitaire n'est pas nécessairement protectrice. Trop peu d'études encore s'intéressent sur l'interaction entre tous ces mécanismes et sur leur importance intégrée dans une réponse immunitaire protectrice chez l'être humain.

Aussi, en s'attardant aux vaccins qui ont échoué ainsi qu'au cheminement normal des maladies sans remède et en définissant les propriétés immunologiques qu'induisent ou non ces réponses immunitaires, il devient possible d'orienter les recherches des corrélats de protection et de pousser plus loin les investigations en s'assurant que les prochains vaccins offrent davantage que les précédents. Toutefois, connaître ce qui n'est pas suffisant apporte peu de réponses à ce qui manque aux vaccins inefficaces.

C'est pourquoi l'approche reconnue pour définir les corrélats de protection immunitaire consiste à caractériser les réponses immunitaires protectrices induites par les vaccins efficaces. Cela permet de mieux comprendre l'importance des interactions entre les différents acteurs de l'immunité à l'échelle des cellules, des protéines et des gènes. Cela permet de travailler avec l'être humain, alors que les essais *in vitro* ou *in vivo* chez d'autres mammifères, essais adaptés à l'approfondissement d'un aspect particulier de

l'immunologie, ne permettent pas d'intégrer tous les paramètres interdépendants retrouvés spécifiquement chez l'humain.

Le vaccin contre la fièvre jaune, ou YF17D, est un modèle d'étude de choix. Il est l'un des meilleurs vaccins à ce jour, en protégeant près de 100 % des gens vaccinés³. Depuis sa création dans les années 1930, peu d'analyses se sont attardées à l'effet qu'avait ce vaccin atténué sur des facettes pourtant critiques de l'immunité. Dans cette étude, vingt volontaires se sont fait vacciner avec le YF17D et ont donné de leur sang avant et périodiquement après leur vaccination, afin de caractériser dans une étude cinétique approfondie la réponse immunitaire protectrice induite par celui-ci.

Cette étude se penche sur différents aspects de l'immunologie encore peu compris. Leur importance relative dans une réponse protectrice chez l'être humain n'étant pas encore déterminée précisément, les principaux acteurs cellulaires de la réponse immunitaire ainsi que divers aspects de la réponse innée ont été caractérisés dans une étude générale du transcriptôme à partir du sang des volontaires après vaccination. Des analyses cellulaires, protéiques et de l'expression génique ont permis de définir l'implication de l'ampleur des réponses cytotoxiques et auxiliaires des cellules T, ainsi que leur phénotype. Finalement, les patrons d'expression génique ont été examinés pour établir des caractéristiques d'une mémoire à long terme, celles définissant un contrôle de la virémie et celles précédant une large réponse auxiliaire.

Ce travail présente des innovations importantes dans la recherche des corrélats de protections. Les expériences utilisent les meilleures technologies disponibles et scrutent tous les mécanismes de l'immunologie connus à ce jour. Les résultats permettront de mieux définir les corrélats de protections immunitaires et, en combinant les observations faites lors de travaux similaires sur d'autres vaccins protecteurs, établiront un modèle pour l'élaboration de futurs vaccins.

2. Introduction

2.1 Mécanismes impliqués dans les corrélats de protection immunitaires

Parmi toutes les interventions médicales, la vaccination est la plus efficace et s'inscrit parmi les moins coûteuses⁴. En plus d'offrir une protection à long terme, les vaccins sont disponibles dans tous les pays, même les plus défavorisés, contrairement aux thérapies médicamenteuses qui demandent davantage d'investissement en matériel ou en personnel. De plus, des maladies mortelles, comme le SIDA, l'hépatite C ou le cancer, sévissent chez des individus qui n'ont pas les moyens de s'offrir des traitements. Ainsi, le développement de vaccins contre ces maladies doit être grandement encouragé.

Afin d'être efficaces, les futurs vaccins doivent être conçus en respectant deux principaux critères. D'une part, il faut s'assurer que les risques associés à la prise du vaccin sont minimes. D'autre part, la qualité de la protection apportée par celui-ci doit être suffisante. Ce dernier critère repose sur nos connaissances de l'immunologie et de ses mécanismes de protection, soit les corrélats de protections immunitaires. Ces corrélats se définissent par ce qui est stimulé par les vaccins et qui est responsable des effets protecteurs de ceux-ci. Si elle est bien identifiée, cette signature caractéristique d'une protection efficace contre les pathogènes permettra de discriminer une bonne réponse immunitaire protectrice d'une non-protectrice, et idéalement, un vaccin potentiellement bienfaiteur d'un inefficace².

Les deux corrélats de protections immunitaires les plus connus sont un grand nombre d'anticorps spécifiques à un pathogène et la persistance des plasmocytes producteurs d'anticorps⁵. En effet, l'apparition après la vaccination d'anticorps neutralisant est la seule mesure de protection connue pour tous les vaccins disponibles aujourd'hui⁶. Cependant, pour faire face au SIDA et à d'autres maladies, la réponse immunitaire humorale médiée par les anticorps n'est peut-être pas efficace seule, et il devient nécessaire de mesurer la protection immunitaire avec d'autres paramètres⁷. C'est pourquoi affiner nos connaissances des corrélats de protections immunitaires est important. Bien que l'étude des corrélats soit récente, il est aujourd'hui reconnu qu'un vaccin efficace, en plus de générer suffisamment d'anticorps, doit stimuler une réponse

immunitaire cellulaire de qualité, générant un grand nombre de lymphocytes fonctionnels, persistants et spécifiques^{2,5,6,8}. Nos connaissances à ce sujet demeurent cependant embryonnaires et nécessitent d'être approfondies pour développer des vaccins efficaces.

2.1.1 Réponse immunitaire innée

Pour parfaire nos connaissances des corrélats de protections immunitaires, il est essentiel d'étudier les mécanismes qui sous-tendent la réponse immunitaire. En maîtrisant les détails des interactions entre les différentes cellules de l'immunité et le devenir de celles-ci, il est possible d'identifier les événements clefs qui sont essentiels à une bonne protection. Ceux-ci deviennent alors des cibles à atteindre pour l'élaboration d'un futur vaccin.

2.1.1.1 Cellules dendritiques

La réponse immunitaire peut être définie par deux grands mécanismes interdépendants. Entre autres, la réponse immunitaire innée est responsable de l'élimination immédiate de pathogènes, alors que la réponse immunitaire acquise est responsable de la mémoire immunitaire et de la protection adaptative qu'elle confère contre une maladie. Cette dernière, qui inclut les réponses humorale et cellulaire, est sans contredit d'une importance capitale pour répondre à un vaccin et acquérir une protection à vie^{2,5,6,8}. Sa force et sa qualité sont cependant directement liées à la réponse immunitaire innée⁹⁻¹³. En effet, le site d'invasion d'un pathogène ou d'un vaccin, souvent les tissus périphériques, n'est presque jamais le lieu où résident les lymphocytes naïfs, garants de la réponse immunitaire acquise et situés majoritairement dans les organes lymphoïdes. Pourtant, ce sont ces cellules qui ont le potentiel de constituer la mémoire immunitaire, tant humorale que cellulaire. Il existe un type de cellule qui réside dans les tissus périphériques et qui peut ramener des antigènes de pathogènes aux organes lymphoïdes. Ce sont les cellules dendritiques (DC). Aucun autre type de cellule présentatrice

d'antigène (APC) n'a été décrit comme ayant cette caractéristique migratoire¹⁴. Les DC migrent relativement rapidement. Par exemple, suivant une vaccination contre la variole, les DC se retrouvent aux nœuds lymphatiques des souris, et ce, 6 heures après l'injection du vaccin¹⁵.

Une DC immature peut reconnaître une infection par ses récepteurs spécifiques aux pathogènes et s'activer. Plusieurs stimuli complémentaires propres aux sites d'infections peuvent induire la maturation des DC, dont des chimiokines, le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interleukine (IL) 1¹⁶⁻¹⁸. Une fois activées, les DC produisent alors la protéine CCR7, essentielle pour migrer dans un nœud lymphatique, où la DC présentera aux lymphocytes T les antigènes recueillis au site d'infection. C'est alors que s'amorcent la réponse immunitaire acquise et les processus qui mèneront à la mémoire immunitaire. Ainsi, les DC font le pont entre la réponse immunitaire innée et acquise et déterminent les caractéristiques qu'aura cette réponse immunitaire acquise^{10,19-21}.

2.1.1.2 Récepteurs de type Toll

Les cellules dendritiques sont équipées de récepteurs pouvant reconnaître des molécules provenant de pathogènes, dont les récepteurs de type Toll (TLR). La famille des TLR comprend 11 récepteurs exprimés chez les mammifères, chacun d'eux reconnaissant des molécules particulières. La plupart sont à la surface des cellules, alors que d'autres sont intracellulaires (TLR3, 7 et 9)^{10,19,20}. Parmi les mieux caractérisés, le TLR2 reconnaît le zymosane de la paroi cellulaire des levures nocives²², le TLR3 reconnaît l'ARN double brins de certains virus²³⁻²⁵, le TLR4 reconnaît les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négative comme *E. coli*²⁶, les TLR7 et 8 reconnaissent les ARN simple brin de certains virus²⁷⁻²⁹ et le TLR9 reconnaît l'ADN déméthylé aux motifs CpG des bactéries et des virus³⁰⁻³³. Par exemple, les virus n'ayant qu'un seul brin d'ARN comme le VIH, le parechovirus humain de type 1 et le virus Cocksackie de type B, stimulent le TLR 8^{28,34,35}. La découverte des TLR est encore récente³⁶ et beaucoup de détails entourant leurs fonctionnement restent à éclaircir. Par exemple, le TLR9 ne semble pas seulement reconnaître les motifs CpG déméthylés, ou du moins certains détails

essentiels des mécanismes de reconnaissance de ces motifs sont encore inconnus. En effet, le virus de la maladie de Newcastle, un virus à simple brin d'ARN, stimule, en plus du TLR7, le TLR9³⁷. De plus, l'hémozoïne des parasites causant la malaria peut également stimuler le TLR9³⁸. Le signal induit par les TLR est supporté par des protéines adaptatrices intracellulaires essentielles. La plus commune, MyD88, transmet le signal intracellulaire de l'activation de tous les TLR à l'exception du TLR3^{23,39,40}. La protéine adaptatrice TIRAP est associée aux TLR2 et 4^{40,41}, alors que TRIF se combine seulement avec les TLR3 et 4⁴¹⁻⁴⁴.

Les TLR sont exprimés à différents niveaux selon le type de cellule, entre autre chez les DC. Deux types de DC sont primordiaux : celles provenant de la différenciation des monocytes, les DC conventionnelles (cDC), et celles provenant des cellules lymphoïdes, les DC plasmacytoïdes (pDC)¹⁴. Elles se distinguent entre autres par les protéines produites. Les cDC portent majoritairement les TLR3 et 8, ainsi qu'un peu des TLR2 et 4. De leur côté, les pDC ont davantage les TLR7 et 9⁴⁵. D'autres caractéristiques différencient les pDC des cDC. En culture, les pDC produisent beaucoup des cytokines IL-4, -5 et -10 alors que les cDC produisent surtout de l'IFN- γ ⁴⁶⁻⁴⁸.

2.1.1.3 Interaction entre les DC et les cellules T

Les cellules T naïves, via leur récepteur de cellule T (TCR), reconnaissent l'antigène du pathogène présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'APC. Plusieurs caractéristiques de l'interaction entre les deux cellules, organisée sous forme de synapse immunologique⁴⁹⁻⁵¹, sont capitales pour que la cellule T puisse bien réagir à l'antigène. La complexité de l'interaction entre les deux cellules comprend des signaux costimulateurs sous forme de cytokines sécrétées localement et de liaisons co-récepteur-co-ligand entre les deux cellules. La durée de l'interaction peut varier, ce qui a un effet direct sur la cellule T. *In vitro*, cette interaction doit être d'environ 20 heures pour que la cellule T naïve puisse proliférer^{49,52}. Par contre, ces durées ne sont pas nécessairement celles que l'on peut observer *in vivo*. Par exemple, les DC présentant les antigènes du

vaccin contre la variole ne sont détectables dans les ganglions lymphatiques de la souris que quelques heures tout au plus⁵³.

Ainsi, la qualité de la réponse immunitaire se définit dès les premiers contacts entre les pathogènes et les cellules de l'immunité innée. Les paramètres influençant la fonctionnalité de ces cellules, dont leurs TLR, leurs mécanismes intracellulaires ou leur sécrétion de cytokines, sont tous candidats à être des corrélats de protection, puisqu'ils sont à l'amont d'une protection immunitaire. Cependant, il est possible que la participation de certains de ces acteurs ne soit pas essentielle à une protection complète et il est important de le valider en caractérisant la réponse à un vaccin protecteur.

2.1.2 Réponse immunitaire acquise

La réponse immunitaire acquise est directement responsable de la protection induite par un vaccin. Elle comprend la participation de plusieurs types de lymphocytes. Les lymphocytes T se divisent en deux groupes principaux d'une importance capitale dans le domaine des corrélats de protection. Il s'agit des lymphocytes T auxiliaires (T_H) et des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les premières portent la protéine CD4 à leur surface et peuvent s'abréger $CD4^+$, alors que les CTL expriment la protéine CD8 et sont désignés comme $CD8^+$. Les CTL, constituant le centre de la réponse cellulaire, peuvent lyser les cellules présentant des antigènes inconnus, comme celles infectées par un virus, alors que les T_H soutiennent les CTL et les lymphocytes B, responsables de la réponse humorale et de la production d'anticorps.

2.1.2.1 Lymphocytes T auxiliaires

Les lymphocytes T auxiliaires s'activent alors qu'une APC présente un antigène, un peptide de 10 à 18 acides aminés, à l'aide de son CMH de classe II, que le TCR de la T_H reconnaît⁵. Les cellules T activées peuvent alors proliférer, se différencier et devenir fonctionnelles^{54,55}. Les cellules activées par les DC sont alors aptes à réagir si elles

rencontrent une nouvelle fois l'antigène dans une concentration suffisante et dans un contexte favorable⁵⁶.

En plus de promouvoir et de maintenir la réponse immunitaire⁵⁷⁻⁶², les T_H ont le potentiel d'orchestrer la réponse immunitaire et son orientation en sécrétant des cytokines particulières aux cellules avec lesquelles elles interagissent. La réponse immunitaire humorale sera avantagée si ces cytokines sont l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, alors qu'une réponse cellulaire est favorisée par les cytokines IL-12, IL-2 et l'IFN- γ ^{6,63}. Les T_H impliquées dans une réponse cellulaire ou dans la réponse humorale s'abrègent respectivement T_{H1} ou T_{H2}⁶. En plus des cytokines qui différencient les T_{H1} des T_{H2}, un patron d'expression génique permet de départager les deux types de cellules⁶⁴⁻⁶⁷, en commençant par TBX21 (T-bet) et GATA-3, des facteurs de transcriptions associés aux T_{H1} et T_{H2} respectivement⁶⁸⁻⁷¹. Effectivement, T-bet et GATA-3 peuvent modifier les histones des gènes codant pour IFN- γ et IL-4, T-bet favorisant la transcription d'IFN- γ et GATA-3 celle d'IL-4⁷². Parmi chacune de ces deux populations, il existe une certaine hétérogénéité dans les cytokines produites⁷³⁻⁷⁵.

Plusieurs facteurs pouvant orienter les T_H naïves soit en T_{H1} ou en T_{H2} ont été suggérés. La quantité et la durée de la stimulation antigénique⁴⁹, le type de cellules présentatrices d'antigènes⁷⁶ et le site où a lieu la présentation de l'antigène⁷⁷ ont possiblement un impact, mais le type de cytokines reçues par les T_H naïves est certainement le facteur le plus important⁷⁷. Par exemple, si la T_H naïve est en présence d'IL-12⁷⁸, d'IFN- γ ^{70,79,80} ou d'IFN- α ⁸¹, elle aura une forte tendance à s'orienter T_{H1}, alors que si les cytokines IL-10⁸² ou IL-27⁸³ sont présentes, la voie T_{H1} sera découragée.

Les DC sont en grande partie responsables de cette sécrétion de cytokines particulières. Selon le TLR qui aura activé la DC, celle-ci influencera différemment le phénotype de la cellule T qu'elle rencontrera⁸⁴. L'activation des TLR 7, 8 ou 9 induit la production de IL-12 chez les cDC^{31,85} et de l'IFN- α chez les pDC^{86,87}. L'activation de ces TLR, combinée à une présentation d'antigène, mène à une réponse principalement T_{H1} et au développement des lymphocytes T cytotoxiques de la réponse cellulaire^{88,89}. D'autre

part, la stimulation du TLR2 amène une production d'IL-10 et induit une réponse T_{H2} ⁹⁰⁻⁹⁵. Malgré l'expression hétérogène des différents TLR chez les différents types de DC, tant les cDC que les pDC peuvent induire un phénotype T_{H1} ou T_{H2} ⁹⁶. Aujourd'hui, l'étude des TLR est dynamique et il est donc prudent de ne pas séparer les TLR en sous-groupes immuables, soit T_{H1} ou T_{H2} . En effet, il a été démontré que le TLR2 était impliqué dans les T_{H1} chez la souris, et que son activation stimulait la production d'IFN- γ ⁹⁷, alors que ce TLR était connu pour favoriser la voie T_{H2} ⁹⁰⁻⁹⁵.

2.1.2.2 Les T_{H1} et la réponse immunitaire cellulaire

Les T_{H1} ont comme première fonction de seconder les CTL et d'assurer la réponse cellulaire. Pour s'activer, les CTL doivent recevoir des signaux distincts, dont l'antigène, des costimulations et des cytokines comme l'IL-12 ou de l'interféron de type 1, comprenant l'IFN- α et β ⁹⁸⁻¹⁰⁰. La durée de la stimulation via le TCR n'influence pas la fonctionnalité, mais le degré de prolifération qu'auront les CTL¹⁰¹. Après une stimulation efficace, une cellule CD8⁺ naïve prolifère pour accroître sa population au mieux de 50 000 fois¹⁰². Plusieurs de ces cellules effectrices non-mémoires s'activeront pour éliminer l'antigène. Par la suite, cette population décroît à 5 ou 10 %¹⁰³ de son pic et les dernières cellules se différencient en cellules mémoires qui peuvent persister toute une vie^{104,105}. Chez l'être humain, une mémoire cellulaire peut durer plus de 50 ans¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. En revanche, sans l'aide des T_{H1} , les CTL deviennent dysfonctionnelles, incapables à éliminer une première infection, ou à constituer une mémoire immunitaire cellulaire pour prévenir une seconde infection⁵⁸⁻⁶².

Les CTL reconnaissent les cellules infectées par l'intermédiaire de peptides de 8 à 11 acides aminés⁵ provenant de l'agent infectieux présentés par le CMH de classe I des cellules infectées. Une liaison se crée alors entre le TCR du CTL et le complexe peptide/CMH I de la cellule infectée. Cette interaction peut durer de quelques minutes à une heure¹¹⁰⁻¹¹², puis les CTL lysent la cellule infectée en sécrétant des perforines, des granzymes et le ligand de Fas, provoquant ainsi la mort de la cellule par nécrose ou par

apoptose. D'ailleurs, les $CD8^+$ sont considérées comme efficaces lorsqu'elles ont le potentiel de sécréter de la perforine¹¹³, ce qui constitue un corrélat de protection cellulaire. Les CTL produisent aussi des molécules antivirales, comme l'IFN- γ et le TNF, inhibant ainsi la réplication des virus⁶.

Puisque les cellules infectées peuvent présenter les protéines des pathogènes qui l'infectent, la réponse T_{H1} peut cibler des épitopes non structuraux, contrairement à la réponse humorale qui n'est efficace que contre les protéines externes des pathogènes⁵. Cependant, comme les haplotypes du CMH varient d'un individu à l'autre en raison de leur polymorphisme, une réponse cellulaire contre un vaccin peut être différente tout autant. Alors qu'un haplotype de CMH peut reconnaître parfaitement un peptide, un autre haplotype peut ne pas nécessairement s'y lier⁶. Ainsi, l'efficacité des vaccins stimulant des CTL est variable d'un individu à l'autre⁵. De plus, l'activation d'une réponse cellulaire peut prendre quelques jours suite à une infection d'une cellule, alors que les anticorps ne nécessitent pas d'activation lors d'une seconde infection et sont efficaces pour prévenir une infection⁶. Cette réponse tardive lie la réponse cellulaire au contrôle des infections chroniques.

2.1.2.3 Les T_{H2} et la réponse immunitaire humorale

De leur côté, les T_{H2} sont essentielles à la réponse humorale, qui est causée par les anticorps et les cellules productrices d'anticorps, les plasmocytes, et leurs précurseurs, les cellules B. Ces dernières, lorsqu'elles sont activées par la reconnaissance d'un antigène et stimulées par une T_{H2} , se multiplient et se différencient en plasmocytes¹¹⁴⁻¹¹⁶. Les anticorps produits par les plasmocytes ont un effet direct sur les pathogènes, puisqu'ils peuvent neutraliser les toxines et bloquer directement la prolifération de l'agent infectieux⁵. D'ailleurs, la quantité d'anticorps neutralisants est la meilleure mesure pour évaluer l'efficacité de la réponse humorale, et constitue le corrélat de protection humorale des vaccins impliquant les cellules B⁵.

Après le pic de prolifération des cellules T, situé entre 7 et 10 jours suivant le début de la division cellulaire, 90 % des nouvelles cellules meurent par apoptose^{54,55}. Par exemple, chez les souris infectées par le virus de l'hépatite C (HCV), plus de 90 % des cellules générées par la réponse au virus mourront par apoptose au moment où le nombre de virus dans le sang diminuera. Une sous-population de ces cellules spécifiques au virus ayant de grandes quantités de récepteurs d'IL-7 survivent à cette sélection et se différencient en cellules mémoires qui perdureront dans le temps¹¹⁷.

2.1.2.4 Les lymphocytes T mémoires

Les cellules mémoires T_H et CTL survivant après le pic de prolifération se divisent au moins en deux populations de cellules T mémoires : les cellules mémoires centrales (T_{CM}) et les cellules effectrices mémoires (T_{EM})¹¹⁸. Parmi les cellules auxiliaires, on retrouve majoritairement des T_{CM}, alors que chez les cellules cytotoxiques, les T_{EM} sont en plus grand nombre¹¹⁹. Les T_{CM} se distinguent des T_{EM} entre autres par leur expression de CCR7, ce qui les concentre dans les tissus lymphatiques^{117,120}. Les T_{EM} ne possèdent pas cette molécule et migrent dans les régions en inflammation et dans les tissus périphériques^{118,121,122}. En plus, les T_{CM} produisent de l'IL-2 et répondent bien à l'IL-7 et à l'IL-15, cytokines essentielles à la survie cellulaire^{107-109,117,120,123,124}. En général, les T_{EM} vivent moins longtemps que les T_{CM}, mais réagissent rapidement à la restimulation avec l'antigène, sans proliférer autant que les T_{CM}. En effet, elles sont porteuses de molécules effectrices, comme la perforine lorsqu'elles sont CD8⁺¹²⁵. Ce sont les T_{CM} qui sont davantage aptes à proliférer grandement suite à une restimulation, pour régénérer leur population ainsi que celle des T_{EM}⁵⁶. Les cellules mémoires portent la protéine CD45RO, sauf pour celles du sous-groupe CD8⁺ T_{EM}, les T_{EMRA}, qui portent à la place CD45RA¹²⁵. Ces cellules, désignées mémoire terminale, ont sensiblement le même phénotype que les T_{EM}, mais ont un potentiel encore plus grand de sécrétion de perforines et sont promptes à l'apoptose^{126,127}. Les T_{CM} sont considérées comme les cellules responsables de la mémoire immunitaire. Elles sont capables de se renouveler constamment et de générer des cellules effectrices lorsque nécessaire. D'ailleurs, des T_{EM}

et des T_{CM} spécifiques contre le tétanos peuvent être retrouvées chez l'humain 10 ans après une vaccination¹¹⁸.

Parmi les $T_H T_{CM}$, certaines sont déjà différenciées en pré- T_{H1} ou en pré- T_{H2} , identifiées par CXCR3 et CCR4¹²⁶. Par contre, lorsque ces T_{CM} sont en présence d'IL-12 ou d'IL-4, soit un environnement T_{H1} ou T_{H2} , elles sont capables de changer de phénotypes pour se conformer aux interleukines¹²⁵. De leur côté, les $T_H T_{EM}$ sont soit T_{H1} ou T_{H2} , mais peuvent aussi exprimer des cytokines du groupe T_H opposé si leur environnement y est propice¹²⁸.

2.1.3 Caractéristiques immunologiques associées à la résolution des maladies

La quantité et le type de cellules mémoire $CD8^+$ spécifiques à un pathogène retrouvé dans le sang d'un individu permettent d'estimer l'état d'une infection. Lorsque l'infection est terminée, si l'antigène persiste en grande quantité, ou en petite quantité, les cellules $CD8^+$ mémoires seront majoritairement T_{CM} , T_{EM} ou T_{EMRA} respectivement^{129,130}.

D'ailleurs, les infections causées par le virus de l'hépatite B (HBV) sont contrôlées par une réponse comprenant tant les lymphocytes B que les T, et parmi ceux-ci, autant des CTL que des T_{H1} ont été observés. Les épitopes ciblés par tous ces types de cellules sont nombreux, incluant autant des protéines de l'enveloppe que des protéines intracapside¹³¹⁻¹³⁸. En effet, une bonne production d'anticorps neutralisants contre l'enveloppe du virus est un excellent indicateur d'élimination du virus, alors qu'une absence ou une faible réponse de cellules T prédit la persistance du pathogène et une évolution chronique de la maladie^{131,139,140}. Les fonctions effectrices de ces cellules se retrouvent alors inefficaces et elles n'ont pas de potentiel de prolifération. Dans ce cas, il y aurait une trop grande activité de cellules T régulatrices (Treg), des lymphocytes capables de tempérer et de désactiver d'autres cellules T. Chez ces patients, des Treg ciblant les cellules spécifiques au HBV pourraient permettre la progression de la maladie vers la phase chronique¹⁴⁰⁻¹⁴².

Ainsi, une réponse pluricellulaire et variée est reliée à une résolution de la maladie. Il en va de même avec les vaccins contre la variole et contre l'hépatite A, qui stimulent la réponse immunitaire innée via les TLR et les cellules tueuses naturelles (NK), en plus de générer tant les cellules T_{H1} que les cellules T_{H2} ¹⁴³⁻¹⁴⁶.

Plusieurs modèles relatifs au système immunitaire décrits précédemment ont été élaborés à partir de conclusions d'études basées sur des essais *in vitro* ou de tests sur des souris. Or, ces modèles peuvent comporter des biais significatifs lorsque transposés à l'être humain. C'est pourquoi il est pertinent d'étudier chez l'humain l'effet des vaccins existants, reconnus sécuritaires et protecteurs, et d'en analyser les corrélats de protections.

2.2 Types de vaccins existant et leurs effets

Plusieurs formes de vaccins ont vu le jour au travers l'histoire de la médecine. Des vaccins composés de pathogènes atténués non purifiés à la génération de vaccin d'ADN en passant par ceux composés de protéines synthétisées, le type de vaccin injecté influence le type de réaction immunitaire stimulée^{2,5}.

2.2.1 Vaccins atténués

Les premiers vaccins ont été développés à partir d'un agent infectieux par une série de passages dans des animaux ou des cultures cellulaires. Ces vaccins atténués, comme celui contre la fièvre jaune ou contre la variole, sont dangereux à mettre sur pied, surtout lorsqu'il s'agit de virus ayant un grand pouvoir de mutation, ce qui peut engendrer une réversion vers la virulence. De plus, avec cette méthode, il n'est pas possible de générer un vaccin contre les cancers qui ne sont pas déclenchés par un pathogène. À cause du danger que représente cette forme de développement de vaccin, cette méthode est donc obsolète aujourd'hui¹⁴⁷. Malgré cela, d'excellents vaccins ont été mis sur pied de cette façon, comme le YF17D, et représentent de parfaits modèles d'étude de la réponse

immunitaire protectrice de l'humain, puisqu'ils génèrent une solide réponse immunitaire complète et persistante en stimulant T_H , CTL et anticorps, comme une infection naturelle se résolvant par la guérison.

2.2.2 Vaccins inactivés et de protéines purifiées

Les virus chimiquement ou physiquement inactivés ont été utilisés pour développer des vaccins contre l'influenza et la polio. Seulement, la réponse immunitaire offerte n'est ciblée que sur un nombre limité de protéines par rapport aux divers variants possibles de ces virus au fort pouvoir mutagène. En plus, la durée de la protection de ces vaccins est courte. Les vaccins de protéines purifiées produites à partir d'ADN recombinant sont plus sécuritaires que les précédents, et c'est de cette façon que le vaccin contre l'hépatite B a été développé. Encore une fois cependant, la réponse immunitaire ne cible que les protéines présentes. Généralement, les vaccins fabriqués à partir de protéines purifiées ou de virus tués stimulent les T_H et la production d'anticorps. Ces vaccins, appelés vaccins de type lymphocytes B, sont connus pour prévenir les infections^{2,5,147}.

2.2.2 Vaccins d'ADN recombinant

De nouveaux types d'immunisation sont étudiés. Les premiers, les vaccins composés d'ADN recombinant, ont l'avantage de permettre le développement d'une réponse cellulaire^{148,149}. En plus d'être sécuritaires, ces plasmides peuvent contenir les protéines spécifiques que l'on souhaite cibler¹⁴⁷. Ces vaccins, désignés vaccin de type lymphocytes T, sont connus pour contrôler les infections chroniques. Dans l'élaboration de futurs vaccins, un vaccin générant des anticorps couplé avec un vaccin stimulant une réponse cellulaire, comme un vaccin d'ADN recombinant combiné à un vaccin contenant des protéines purifiées, serait une combinaison prometteuse pour s'assurer de la fiabilité de la protection^{2,5,147}.

2.2.3 Vaccins de microorganismes recombinants

Les microorganismes recombinants sont un autre type de nouveaux vaccins prometteurs. En partant de vaccins vivants atténués déjà protecteurs, on peut y inclure quelques gènes d'un autre organisme pour que ce dernier soit aussi reconnu par le système immunitaire¹⁴⁷. En revanche, l'utilisation de ces vecteurs chez population déjà en contact avec une forme de ce vaccin est rendue difficile par le fait que les individus déjà immunisés contre la souche originale du vecteur peuvent répondre inefficacement contre le nouveau vaccin¹⁵⁰. Les vecteurs les plus souvent étudiés proviennent des versions atténuées de la vaccine, de la variole aviaire et des adénovirus⁵⁶. 45% des États-Uniens et 90% des gens dans les pays en voie de développement ont déjà une mémoire immunitaire contre l'adénovirus Ad5^{151,152}, alors que tous ceux qui ont déjà eu un vaccin contre la variole, dont les campagnes de vaccination ont cessé dans les années 1970, ont une mémoire immunitaire contre la vaccine modifiée Ankara (MVA)¹⁵³. La MVA a le potentiel de générer une réponse d'IFN de type 1 dans les cellules infectées¹⁵⁴, et les adénovirus stimulent chez l'humain les DC et la production d'IL-6, d'IL-12 et d'interféron de type 1¹⁵⁵, en plus de générer chez la souris des CTL après 7 à 10 jours¹⁵⁶.

2.2.4 Adjuvants et leurs effets

Des adjuvants peuvent être combinés avec un vaccin pour renforcer la réponse immunitaire¹⁵⁷. Ils deviennent très intéressants lorsqu'il est envisagé de les jumeler avec les nouvelles générations de vaccins d'ADN recombinant ou de protéines purifiées, qui autrement sont trop peu immunogènes. En agissant tôt dans la réponse immunitaire, les adjuvants influencent entre autres l'orientation que prendront les T_H ¹⁵⁸. Lors du développement de futurs vaccins, le choix de l'adjuvant permettra, en considérant le type de vaccin, de générer une réponse à la fois T_{H1} et T_{H2} .

Le seul adjuvant utilisé chez l'humain autorisé dans les vaccins commerciaux aux États-Unis est composé de sel minéral d'aluminium, l'hydroxyde d'aluminium, souvent appelé

Alum. Connu pour n'occasionner que peu d'effets secondaires, l'Alum dirige la réponse immunitaire dans une voie T_{H2} et aide au développement d'anticorps¹⁵⁹.

Le lipide A monophosphorylé (MPL) est un adjuvant encore au banc d'essais aux États-Unis. Toutefois, certains pays d'Europe ainsi que le Canada l'ont autorisé lorsqu'il est utilisé avec certains vaccins¹⁶⁰. Il provient d'une purification du LPS de la salmonelle et stimule chez l'être humain la synthèse et la sécrétion d'IL-2 et d'interféron- γ ^{161,162}. Il est possible qu'il interagisse avec le TLR4 des cellules dendritiques pour orienter la réponse immunitaire.

D'autres variantes d'adjuvants sont en développement. L'un d'eux, de l'ADN non méthylé aux motifs CpG, caractéristique propre à l'ADN bactérien, est immunostimulateur et active le TLR9¹⁶³. L'ajout de cette molécule comme adjuvant a donc une influence T_{H1} et augmente la réponse vis-à-vis l'antigène auquel il est couplé¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. La saponine, ainsi que ses variantes purifiées comme QS21, ont aussi un effet sur le système immunitaire. En s'intercalant dans les membranes des cellules et par une suite de mécanismes inconnus, la saponine stimule la production d'IL-2 et d'IFN- γ et oriente la réponse T_{H1} ^{167,168}. Dans certains tests avec QS21 couplé avec des protéines du VIH, l'ajout de cet adjuvant a augmenté le potentiel de prolifération de certains lymphocytes T, mais pas des CTL¹⁶⁹. Il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances dans ce domaine pour expliquer le fonctionnement des adjuvants, car ces molécules seront très utiles pour concevoir des vaccins protecteurs ou thérapeutiques qui généreront des réponses immunitaires définies par les corrélats de protection immunitaire.

2.3 Vaccins en développement

Plusieurs tentatives de développement de vaccins ont malheureusement échoué. Malgré cela, ces échecs peuvent être étudiés pour déterminer les propriétés qu'avaient ou n'avaient pas ces vaccins ainsi que les caractéristiques de la réponse immunitaire induite par ceux-ci. Il devient alors possible de mieux cerner les corrélats de protection

immunitaire. Le SIDA, l'hépatite C et le cancer sont trois maladies sans vaccin qui sont d'excellents exemples pour élucider ces caractéristiques. En effet, en s'attardant seulement aux réponses immunitaires protectrices, on ne peut distinguer les facteurs essentiels d'une réponse protectrice des effets communs d'une réponse non-protectrice.

2.3.1 Vaccination contre le SIDA

Le SIDA est une maladie virale sans précédent qui a affecté depuis sa découverte plus de 60 millions de gens et qui en a tué 20 millions¹⁷⁰. Chaque jour, il est estimé qu'il y a plus de 15 000 infections de VIH à travers le monde⁶. La majorité des individus aux prises avec le VIH sont dans des pays où il n'est pas possible d'avoir accès aux traitements onéreux contre le SIDA. Il est donc urgent de développer un traitement abordable ou un vaccin¹⁷⁰. La progression de la maladie est caractérisée par de hauts niveaux d'activation de cellules immunitaires et d'apoptose de cellules T¹⁷¹. En effet, une grande activation des cellules T est le meilleur indice de prédiction de la progression de la maladie^{172,173}.

2.3.1.1 Tentatives de vaccination antérieures

Plusieurs tentatives de développement de vaccins le VIH ont échoué¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Un premier test de vaccination avec un VIH avec plusieurs délétions génétiques s'est présenté comme concluant à court terme, mais les singes et les vaccinés ont tous développé le SIDA par la suite¹⁷⁷, probablement à cause du pouvoir de mutation élevé du VIH¹⁷⁸. Cette caractéristique décourage l'utilisation de l'atténuation pour produire un vaccin contre le VIH, car de cette façon, il est possible de générer des vaccins susceptibles de redevenir infectieux. D'autres alternatives ont été envisagées, mais malheureusement, les essais pour développer un vaccin avec des protéines synthétisées générant des anticorps neutralisant efficacement le VIH ont échoué^{7,147}. Après plusieurs échecs à tenter de produire un vaccin induisant des anticorps et bloquant l'infection, il a été ensuite envisagé de mettre sur pied un vaccin stimulant des lymphocytes T cytotoxiques, dans le but de réduire les symptômes de la maladie et les risques de transmission^{5,179-182}. D'autre

part, aucun vaccin antiviral jusqu'à aujourd'hui n'est connu pour éliminer complètement le risque d'une éventuelle infection. Les vaccins ont comme propriété de limiter la réplication virale et ainsi limiter ou enrayer les symptômes pouvant être causés par le virus et aussi diminuer la transmission de celui-ci⁶.

Plusieurs avenues ont été envisagées pour élaborer un vaccin recombinant contre le VIH. Dans un premier temps, même si quelques essais ont été effectués¹⁸³⁻¹⁹², le virus de la vaccine ne semble pas une bonne alternative, puisqu'il est mortel chez les gens immunosupprimés, dont ceux qui ont le SIDA¹⁹³. Cela rendrait impossible l'utilisation à grande échelle du vaccin dans les régions endémiques pour le VIH. Des variantes modifiées génétiquement de ce vaccin et de d'autres virus proches de la vaccine ont donné naissance à des virus-vecteurs sécuritaires, soit la MVA, la variole du canari et la variole aviaire. Après avoir inséré certaines protéines du VIH dans ces vecteurs, ces vaccins se sont révélés être immunostimulants dans les essais chez les primates non humains^{194,195}. Seulement, le vaccin développé à partir de la variole du canari ne s'est pas révélé aussi efficace pour l'être humain, ne générant des CTL spécifiques que dans un peu plus de la moitié des volontaires¹⁹⁶. D'autres tests, utilisant des plasmides recombinants, ont généré chez les primates une réponse inefficace qui diminue la réplication du virus sans l'empêcher^{180,197}.

Le dernier vaccin visant à générer une réponse cellulaire développé par la compagnie Merck à partir d'un adénovirus s'est avéré inefficace à protéger les êtres humains. De surcroît, ceux ayant déjà une immunité contre l'adénovirus utilisé dans le vaccin recombinant ont été davantage infectés par le VIH durant la période d'étude¹⁹⁸. Les tests qui avaient été utilisés pour vérifier l'efficacité du vaccin chez l'humain se résumaient à vérifier si les cellules impliquées pouvaient sécréter de l'IFN- γ ¹⁹⁸, ce qui n'est manifestement pas suffisant.

On estime que la difficulté à créer un vaccin contre le VIH vient principalement de sa grande capacité à muter^{199,200} et de l'importance que doit prendre la réponse cellulaire pour contrôler la virémie¹⁴⁷. Comme de fait, la reproduction du VIH est imprécise et il

est estimé que son haut taux de mutation génère un milliard de nouvelles particules virales par jour. La réponse immunitaire spécifique doit donc avoir un très large spectre d'action pour atteindre tous les virions^{147,199}. Ces perpétuelles mutations sont grandement responsables de la déficience de la réponse humorale²⁰¹⁻²⁰³ et cellulaires^{204,205}, car les anticorps neutralisant et les CTL n'arrivent pas à reconnaître les protéines changeantes du VIH et celui-ci parvient toujours à se répliquer¹⁴⁷. De plus, l'enveloppe du VIH a plusieurs propriétés qui lui permettent de se soustraire aux anticorps spécifiques. L'étude tridimensionnelle des épitopes mutant très peu du VIH, qui pourraient être ciblés par les anticorps, a révélé que ces cibles étaient cachées par d'autres séquences de peptides qui mutent grandement, formant un obstacle physique aux anticorps¹⁷⁰. Ces difficultés et les précédents échecs d'élaboration de vaccin contre le VIH rendent obsolètes les traditionnelles méthodes de production de vaccin, et incitent les chercheurs à concevoir un vaccin rationnellement en s'assurant qu'il induit les corrélats de protection immunitaire les mieux définis¹⁷⁰.

2.3.1.2 Importance des différentes facettes de l'immunologie dans la réponse au VIH

La possibilité de mettre sur pied un vaccin protecteur contre le VIH reste tout de même envisageable. *In vitro*, les anticorps monoclonaux peuvent bloquer le processus d'infection cellulaire du VIH²⁰⁶. Chez les singes, de hauts taux d'anticorps produisent une résistance contre l'infection du VIH^{183-192,207-211}. Or, cette concentration n'est jamais atteinte chez les individus infectés. Il est toutefois envisageable qu'un jour il soit possible d'élaborer un vaccin protecteur générant une multitude d'anticorps ciblant un grand nombre d'antigènes viraux^{194,212}. D'ailleurs, seuls les anticorps peuvent neutraliser un virion avant que celui-ci puisse infecter une cellule et ainsi protéger contre une infection⁶. Cependant, lorsque des anticorps anti-VIH sont administrés aux singes une journée après l'infection avec le VIH, ceux-ci développent tardivement la maladie et ne sont pas protégés. Les anticorps sont donc aptes à empêcher l'infection du VIH, mais pas à éliminer entièrement une virémie déjà présente²¹³. Un vaccin thérapeutique ne devra donc pas se limiter à une réponse humorale forte.

D'un autre côté, les singes recevant des vaccins recombinants ou des vaccins-plasmides ciblant le VIH ont développé une bonne réponse cellulaire qui leur procurait un contrôle partiel du virus²¹⁴⁻²²⁶. D'ailleurs, une bonne réponse de CTL spécifiques contre le VIH est le meilleur corrélat de protection chez les singes²²⁷. En plus, *in vitro*, les CTL sont capables de limiter la réplication du VIH dans les cellules hôtes auxiliaires grâce à leur cytotoxicité et leur sécrétion de chimiokines^{228,229}. D'ailleurs, le haut niveau de CTL spécifiques au VIH dans le sang des individus infectés, coïncidant avec la diminution de la virémie²³⁰, est un bon pronostic pour leur santé²³¹. Chez les individus ayant une infection chronique au VIH, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques se trouvent dysfonctionnels, produisant moins de cytokines et ayant une moins grande capacité à proliférer^{2,113,232-236}, contrairement aux patients contrôlant leur virémie, chez qui leurs lymphocytes cytotoxiques spécifiques au VIH ont un phénotype semblable à ceux spécifiques au CMV²³⁷, considérés comme fonctionnels. Le contrôle de la maladie et la réponse à un vaccin thérapeutique nécessitent donc une réponse cellulaire de qualité.

S'il est estimé qu'une réponse protectrice contre le VIH devra idéalement inclure une réponse cellulaire et humorale, il est moins évident que l'efficacité des T_H contrôle la réplication virale⁶. Même s'il est connu que certains CD4⁺ peuvent directement lyser des cellules infectées par le VIH²³⁸, les T_H sont la cible de réplication de ce virus. Une prolifération massive de ces cellules pourrait bien désavantager le virus comme lui offrir encore plus de sites de réplication⁶. Chez les gens infectés par le VIH, la population de CD4⁺ spécifiques au VIH capable de proliférer suite à une stimulation diminue avec le temps, alors que la population de CD4⁺ spécifiques au VIH sécrétant de l'IFN- γ reste abondante²³⁹. Ainsi, le problème ne réside pas dans la perte de CD4⁺ spécifiques au VIH, mais plutôt dans la fonction de ces cellules².

2.3.1.3 *Corrélat de protection immunitaire contre le VIH*

Plusieurs caractéristiques cellulaires ont été observées et permettent maintenant de mieux comprendre les mécanismes qui mènent à une protection contre le VIH. Chez les individus ayant une infection chronique au VIH menant au SIDA, les cellules T tant

CD4⁺ que CD8⁺ spécifiques au VIH sécrètent de l'IFN- γ ^{8,130}, alors que chez les individus avec des infections virales maîtrisées, comme EBV, CMV ou VIH, les mêmes cellules spécifiques sécrètent à la fois de l'IFN- γ et de l'IL-2⁸. Cette sécrétion double est considérée comme un corrélat de protection contre le VIH.

D'autre part, des prostituées Africaines ont été à plusieurs reprises en contact avec le VIH sans pour autant en être infectées^{240,241}. Ces personnes ont développé une bonne réponse cellulaire, mais au mieux une faible réponse humorale contre le VIH²⁴⁰⁻²⁴². Les CTL de ces individus peuvent répondre à une stimulation *in vitro* avec des peptides du VIH^{243,244}. Une réponse cellulaire de qualité semble pouvoir prévenir l'apparition du SIDA et la multiplication du VIH.

Une autre population attire l'attention des recherches pour développer un vaccin contre le SIDA. Les individus qui contrôlent leur infection et ne développent pas le SIDA sans prendre de médicaments sont étudiés pour connaître les caractéristiques de leur système immunitaire qui leur permettent de maîtriser la réplication du VIH²⁴⁵⁻²⁴⁸. Le phénotype des cellules T de ces gens s'apparente à celui des cellules spécifiques au CMV ou au EBV, qui arrivent à contenir la réplication de ces virus et l'apparition de leur maladie respective². Les CD4⁺ de ces individus sont aptes à proliférer après restimulation²⁴⁹ et plusieurs CD8⁺ spécifiques à divers épitopes du VIH ont été retrouvés²⁵⁰, constituant une réponse cellulaire large et protectrice contre la maladie. Après les échecs de développement d'un vaccin induisant des anticorps bloquant l'infection, une nouvelle stratégie consiste à développer un vaccin stimulant des lymphocytes T cytotoxiques pour réduire les symptômes de la maladie et les risques de transmission, en reproduisant la réponse immunitaire de ces contrôleurs de la réplication du VIH^{251,252}. La diminution du taux de transmission du virus est probable avec ce type de vaccin, puisque la transmission du VIH est déjà relativement inefficace^{253,254}.

Idéalement, un vaccin thérapeutique ou protégeant contre le VIH générerait une bonne variété d'anticorps neutralisants et une réponse cellulaire solide le plus tôt possible, puisque plus le virus a la possibilité de se répliquer, plus il existe différents variants

D'un autre côté, les singes recevant des vaccins recombinants ou des vaccins-plasmides ciblant le VIH ont développé une bonne réponse cellulaire qui leur procurait un contrôle partiel du virus²¹⁴⁻²²⁶. D'ailleurs, une bonne réponse de CTL spécifiques contre le VIH est le meilleur corrélat de protection chez les singes²²⁷. En plus, *in vitro*, les CTL sont capables de limiter la réplication du VIH dans les cellules hôtes auxiliaires grâce à leur cytotoxicité et leur sécrétion de chimiokines^{228,229}. D'ailleurs, le haut niveau de CTL spécifiques au VIH dans le sang des individus infectés, coïncidant avec la diminution de la virémie²³⁰, est un bon pronostic pour leur santé²³¹. Chez les individus ayant une infection chronique au VIH, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques se trouvent dysfonctionnels, produisant moins de cytokines et ayant une moins grande capacité à proliférer^{2,113,232-236}, contrairement aux patients contrôlant leur virémie, chez qui leurs lymphocytes cytotoxiques spécifiques au VIH ont un phénotype semblable à ceux spécifiques au CMV²³⁷, considérés comme fonctionnels. Le contrôle de la maladie et la réponse à un vaccin thérapeutique nécessitent donc une réponse cellulaire de qualité.

S'il est estimé qu'une réponse protectrice contre le VIH devra idéalement inclure une réponse cellulaire et humorale, il est moins évident que l'efficacité des T_H contrôle la réplication virale⁶. Même s'il est connu que certains CD4⁺ peuvent directement lyser des cellules infectées par le VIH²³⁸, les T_H sont la cible de réplication de ce virus. Une prolifération massive de ces cellules pourrait bien désavantager le virus comme lui offrir encore plus de sites de réplication⁶. Chez les gens infectés par le VIH, la population de CD4⁺ spécifiques au VIH capable de proliférer suite à une stimulation diminue avec le temps, alors que la population de CD4⁺ spécifiques au VIH sécrétant de l'IFN- γ reste abondante²³⁹. Ainsi, le problème ne réside pas dans la perte de CD4⁺ spécifiques au VIH, mais plutôt dans la fonction de ces cellules².

2.3.1.3 *Corrélat de protection immunitaire contre le VIH*

Plusieurs caractéristiques cellulaires ont été observées et permettent maintenant de mieux comprendre les mécanismes qui mènent à une protection contre le VIH. Chez les individus ayant une infection chronique au VIH menant au SIDA, les cellules T tant

CD4⁺ que CD8⁺ spécifiques au VIH sécrètent de l'IFN- γ ^{8,130}, alors que chez les individus avec des infections virales maîtrisées, comme EBV, CMV ou VIH, les mêmes cellules spécifiques sécrètent à la fois de l'IFN- γ et de l'IL-2⁸. Cette sécrétion double est considérée comme un corrélat de protection contre le VIH.

D'autre part, des prostituées Africaines ont été à plusieurs reprises en contact avec le VIH sans pour autant en être infectées^{240,241}. Ces personnes ont développé une bonne réponse cellulaire, mais au mieux une faible réponse humorale contre le VIH²⁴⁰⁻²⁴². Les CTL de ces individus peuvent répondre à une stimulation *in vitro* avec des peptides du VIH^{243,244}. Une réponse cellulaire de qualité semble pouvoir prévenir l'apparition du SIDA et la multiplication du VIH.

Une autre population attire l'attention des recherches pour développer un vaccin contre le SIDA. Les individus qui contrôlent leur infection et ne développent pas le SIDA sans prendre de médicaments sont étudiés pour connaître les caractéristiques de leur système immunitaire qui leur permettent de maîtriser la réplication du VIH²⁴⁵⁻²⁴⁸. Le phénotype des cellules T de ces gens s'apparente à celui des cellules spécifiques au CMV ou au EBV, qui arrivent à contenir la réplication de ces virus et l'apparition de leur maladie respective². Les CD4⁺ de ces individus sont aptes à proliférer après restimulation²⁴⁹ et plusieurs CD8⁺ spécifiques à divers épitopes du VIH ont été retrouvés²⁵⁰, constituant une réponse cellulaire large et protectrice contre la maladie. Après les échecs de développement d'un vaccin induisant des anticorps bloquant l'infection, une nouvelle stratégie consiste à développer un vaccin stimulant des lymphocytes T cytotoxiques pour réduire les symptômes de la maladie et les risques de transmission, en reproduisant la réponse immunitaire de ces contrôleurs de la réplication du VIH^{251,252}. La diminution du taux de transmission du virus est probable avec ce type de vaccin, puisque la transmission du VIH est déjà relativement inefficace^{253,254}.

Idéalement, un vaccin thérapeutique ou protégeant contre le VIH générerait une bonne variété d'anticorps neutralisants et une réponse cellulaire solide le plus tôt possible, puisque plus le virus a la possibilité de se répliquer, plus il existe différents variants

pouvant échapper au système immunitaire. Aussi, plus le VIH se multiplie, plus il a la possibilité de se localiser dans des lieux difficilement atteignables pour le système immunitaire, comme dans le système nerveux⁶. En plus de développer une réponse rapidement, les réponses humorale et cellulaire devront être toutes deux efficaces, puisque lors de la première infection, le VIH se transmet sous forme de virions seuls, qui peuvent être neutralisés par des anticorps, et par l'entremise de cellules infectées de virus, visées par la réponse cellulaire¹⁴⁷. La population de lymphocytes T doit être polyfonctionnelle et produire de l'IL-2, en plus d'avoir des récepteurs (CMH) avec une haute affinité contre la majorité des formes prédominantes du virus et de ses mutations¹⁷⁰. En effet, la quantité seule des T_H ou des CTL spécifiques au VIH ne corrèle ni avec la charge virale ni avec le pronostic des patients¹⁷⁰. Il faut donc s'assurer de la bonne qualité des cellules générées par un vaccin.

Ces caractéristiques potentiellement nécessaires à une protection contre le VIH devront être validées dans la caractérisation de la réponse immunitaire induite par un vaccin protecteur avant d'être considérées comme des corrélats de protection immunitaires. À ces probables corrélats définis par l'étude des tentatives de vaccination contre le VIH, d'autres caractéristiques sont à ajouter pour élaborer un vaccin complet et protecteur, et c'est dans l'étude de la virologie, de la génétique et de l'immunologie qu'il sera possible de trouver les réponses¹⁹⁷.

2.3.2 Vaccination contre l'hépatite C

À ce jour, plus de 180 millions de personnes à travers le monde sont chroniquement infectées par le virus de l'hépatite C (HCV)²⁵⁵. Quatre-vingts pour cent des gens développant une infection aiguë au HCV ne se débarrassent pas du virus et subiront toute leur vie une infection chronique de l'HCV, malgré les médicaments disponibles. De ce nombre, un sur cinq développera une cirrhose du foie qui peut dégénérer en cancer du foie^{255,256}. L'hépatite C est donc un problème mondial qui requiert un vaccin le plus rapidement possible. Au travers l'étude de cette maladie et des tentatives de

vaccinations contre cette maladie, quelques découvertes permettent de mieux comprendre les corrélats de protection immunitaire.

2.3.2.1 La maladie et ses traitements

Lors d'une infection chronique à l'HCV, une réponse humorale seule comprenant de hauts taux d'anticorps neutralisant ne parvient pas à éliminer le virus²⁵⁷. Chez ceux atteints de l'hépatite C qui s'en sortent sans réponse cellulaire grandement efficace, la quantité d'anticorps spécifiques contre le HCV tend à diminuer avec le temps jusqu'à devenir indétectable²⁵⁸, ce qui laisse supposer qu'ils ne sont pas immunisés contre une réinfection. Ces observations suggèrent que la mise au point d'un vaccin efficace contre le HCV nécessitera l'induction d'une réponse cellulaire forte.

Le virus de l'hépatite C, comme d'autres virus, induit chez les personnes infectées la production d'interféron α et β , protéines aux propriétés antivirales. Le HCV a cependant la particularité de réduire cette production d'interféron de type 1 en entravant la signalisation intracellulaire du TLR3²⁵⁹⁻²⁶¹, ce qui avantage la prolifération du virus. D'ailleurs, la première thérapie mise sur pied pour traiter l'hépatite C consiste à l'administration d'interféron. Sans elle, les patients ont peu de chances de se débarrasser du virus²⁶². Chez les chimpanzés, lors d'une infection aiguë avec le HCV, une bonne expression des gènes stimulés par les interférons (ISG) est un pronostic d'élimination complète du virus²⁶³. Les mécanismes par lesquels le HCV arrive à réguler la production d'IFN sont nombreux²⁶². Par exemple, il induit la production d'IL-8 en activant des facteurs de transcriptions comme NF κ B, ce qui atténue directement la production des ISG²⁶⁴. Il induit aussi l'expression des SOCS1 et 3, bloquant la voie de signalisation intracellulaire JAK-STAT menant à la transcription des ISG²⁶⁵. De plus, certaines des protéines du HCV sont aptes à cliver TRIF, molécule essentielle à la signalisation du TLR3²⁶⁶.

C'est au travers des études de thérapie pour l'hépatite C qu'une molécule antivirale a démontré du potentiel. CPG10101, un agoniste du TLR9, a été donné à des gens ayant le

HCV en même temps que la thérapie classique. Il se trouve que ces volontaires ont répondu dans une proportion de 86 % alors que 60 % de ceux qui n'avaient que la thérapie classique ont répondu²⁶⁷. Il serait intéressant de développer un vaccin contre l'hépatite C en s'assurant qu'il induit l'activation du TLR9, augmentant possiblement son efficacité. D'ailleurs, chez des individus infectés par le HCV, les pDC se sont avérées fonctionnelles et peuvent être une cible pour de futurs médicaments contre la maladie²⁶⁸.

2.3.2.2 Tentatives de vaccination antérieures

Plusieurs vaccins ont été testés depuis la découverte du HCV. Le premier est un vaccin recombinant contenant les glycoprotéines E1 et E2 du HCV²⁶⁹. Les chimpanzés chez qui le vaccin a été testé ont développé des anticorps neutralisants contre la protéine E2 du HCV²⁷⁰. Ce vaccin a été testé chez l'humain, mais seuls 60 % d'entre eux ont développé les mêmes anticorps. Les études sur ce vaccin ne sont pas terminées et aucune donnée significative n'a été rapportée à propos de la réponse cellulaire. Vu la faible efficacité du vaccin, il pourrait être utilisé comme vaccin thérapeutique se combinant à une thérapie standard¹⁴².

Un deuxième type de vaccin a été mis sur pied avec la protéine recombinante E1. Chez les chimpanzés, ce vaccin a atténué les dommages que le HCV cause au foie sans guérir les animaux. En effet, il était toujours possible de détecter des virus dans le sang des singes, alors que les dissections du foie, site privilégié habituel du virus, ne révélaient aucune trace de virus¹⁴². Le vaccin a été testé chez des gens aux prises avec le HCV, chez qui une diminution de l'inflammation du foie a pu être observée. Des anticorps neutralisants ont été retrouvés, et les cellules T étaient aptes à proliférer. Malgré cela, le vaccin n'a aucun effet sur la virémie des patients ni sur le devenir de la maladie^{142,271}, indiquant que ces caractéristiques seules sont insuffisantes pour apporter une protection contre le HCV.

Un vaccin recombinant, cette fois ciblant des protéines non structurales du HCV, a permis la protection de 4 chimpanzés sur 5 après l'inoculation du virus. Des CTL

spécifiques tant dans le sang que dans le foie ont été retrouvés, renforçant l'hypothèse que les CTL sont aptes à prévenir la réplication du virus. Toutefois, les taux de survie et d'élimination complète du virus sans vaccin sont plus élevés chez les chimpanzés que chez l'humain, ce qui explique que deux des cinq chimpanzés non vaccinés ont éliminé complètement le virus. Il est donc possible que le vaccin soit moins efficace que supposé^{142,255}, vu le petit nombre de singes testés. Lors de restimulation avec des peptides de HCV, des cellules CD8⁺ se sont révélées être productrices d'IL-2²⁷², aptes à proliférer et à sécréter de l'IFN- γ après l'immunisation²⁵⁵, ce qui est encourageant.

Finalement, une autre tentative visant quatre protéines non structurales du HCV à l'aide du vecteur atténué MVA a été testée chez la souris. Il induit tant des T_H que des CTL chez le modèle murin, mais ce prototype de vaccin est très récent. Aucun test sur les primates n'a encore été effectué¹⁴².

2.3.2.3 Corrélats de protection immunitaire contre le HCV

Malheureusement, les dernières études sur les singes et les humains se sont attardées au mieux à la spécificité, à la production d'IFN- γ et au potentiel de prolifération des lymphocytes. Or, il se trouve que ces paramètres, quoique importants, ne sont pas suffisants pour protéger un individu. Alors que les TLR et les ISG semblent importants dans la résolution de la maladie, il serait intéressant de définir leur importance dans un vaccin. La caractérisation des phénotypes mémoires des lymphocytes, une évaluation de la qualité de la réponse innée, la vérification de la durabilité des cellules mémoires et l'analyse des différentes voies de signalisations reliées à l'immunité seraient des indices supplémentaires pour identifier de nouveaux corrélats de protections.

2.3.3 Vaccination contre le cancer

Au Canada comme au Québec, la première cause de mortalité est aujourd'hui le cancer, devançant les maladies du coeur²⁷³. Les traitements associés à cette maladie ne sont malheureusement pas efficaces à tout coup, en plus d'être longs, incommodants pour le patient et extrêmement coûteux. Ailleurs dans le monde, trop peu de gens peuvent se permettre une thérapie contre cette maladie, et il devient de plus en plus nécessaire de développer un vaccin contre le cancer.

2.3.3.1 Tentatives de vaccination antérieures

Malheureusement, la majorité des tentatives de vaccination ayant pour but de générer des cellules T spécifiques contre les tumeurs ont échoué soit en produisant trop peu de ces cellules²⁷⁴⁻²⁷⁶ ou pas du tout²⁷⁷⁻²⁸⁰. Le nombre de cellules générées est important, mais leur fonctionnalité reste primordiale. En effet, un vaccin prototype constitué de grandes quantités d'épitopes cancéreux a permis de produire plusieurs lymphocytes spécifiques, mais ils étaient quiescents et inefficaces^{281,282}. De plus, la localisation de ces cellules est cruciale, puisqu'un essai a généré d'excellents lymphocytes T spécifiques et fonctionnels dans le sang, mais pas dans les tumeurs des gens ayant des mélanomes²⁸³. Ces précédents échecs peuvent cependant servir à mieux définir les corrélats de protection immunitaire.

Il n'est pas démontré hors de tout doute qu'il existe une réponse spontanée et efficace de cellules T contre les tumeurs chez l'être humain²⁸⁴. Cependant, des T_H spécifiques aux tumeurs existent naturellement contre les antigènes de la maladie²⁸⁵⁻²⁸⁸ et il y a dans certains cas une accumulation de CTL pouvant reconnaître des antigènes cancéreux dans les tumeurs²⁸⁹⁻²⁹⁹, dont l'antigène tumoral Mage-C2, dans le cas de mélanomes³⁰⁰. Ces cellules sont beaucoup plus fréquentes dans le sang des patients atteints du cancer que chez des individus sains, qui ont des CTL de phénotype naïf, alors que les CTL des individus malades ont un phénotype mémoire effecteur³⁰¹. Il a été démontré que de ces

CTL, certaines ont un potentiel de sécrétion d'IFN- γ ³⁰², mais peu d'autres études décrivent le phénotype ou la fonctionnalité de ces lymphocytes infiltrés dans les tumeurs. Or, les CTL qui ciblent naturellement les cellules cancéreuses n'arrivent visiblement pas à éliminer la maladie chez les patients atteints. La vaccination visant à vaincre un cancer aura comme objectif d'amplifier grandement des populations de CTL spécifiques contre les cellules tumorales et de rendre ces mêmes CTL fonctionnelles et efficaces.

Il est encourageant d'observer qu'il y a une corrélation entre le degré d'infiltration tumorale de cellules T et la survie des patients atteints de mélanomes ou d'adénocarcinomes primaires³⁰³⁻³⁰⁶. Des observations similaires ont été faites avec le cancer de l'œsophage, du colon et des ovaires³⁰⁷⁻³⁰⁹. De plus, les CTL infiltrés dans les tumeurs des gens qui survivent au cancer ont des niveaux plus élevés d'IFN- γ , de MDC (*macrophage-derived chemokine*) et de SLC (*secondary lymphoid-tissue chemokine*) que ceux des patients qui ne guérissent pas du cancer³¹⁰. En revanche, cette corrélation n'est pas retrouvée chez les individus aux prises avec un mélanome ou un adénocarcinome avancé de stade 4, même si les cellules T sont spécifiques aux cellules cancéreuses^{306,311}. C'est pourquoi on ne peut conclure que l'infiltration de CTL dans les tumeurs est à elle seule l'explication d'une bonne réponse contre un cancer, puisque le moment de cette infiltration, soit à un stade primaire ou avancé de la maladie, est capital pour un bon pronostic.

2.3.3.2 Mécanismes d'évasion tumorale

L'échec des CTL infiltrant des tumeurs avancées s'expliquerait par le fait que ces lymphocytes entrent dans une phase d'anergie, devenant dysfonctionnels²⁸⁴. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer ce phénomène. D'abord, certains acides aminés tumoraux essentiels à la reconnaissance des CTL peuvent muter²⁸⁴ ou même cesser d'être exposés³¹², entre autres à cause de la perte d'expression du CMH de classe I^{313,314}. Pourtant, 90% des cellules cancéreuses provenant d'une tumeur résistante aux

CTL sont capables de stimuler *in vitro* des CTL et sont sensibles à la lyse cellulaire induite par ceux-ci²⁸⁴. Cette anergie semble localisée aux tumeurs³¹⁵. En effet, les CTL inertes situées dans ces tumeurs ne peuvent exprimer CD25, CD69 ou CD137, marqueurs d'activation, après stimulation *in situ*, alors que les CTL d'organes sains le peuvent³¹⁵.

Deux autres mécanismes autres que des mutations peuvent expliquer cette anergie. Premièrement, il est possible que les cellules tumorales influencent directement l'activité des CTL. Plusieurs protéines exprimées par les tumeurs sont candidates pour expliquer cette anergie. TGF- β ³¹⁶, IDO^{315,317}, galectin-1³¹⁸ et B7-H1³¹⁹ ont toutes un potentiel d'inhiber la réponse des cellules T ou de stimuler leur apoptose. Deuxièmement, des Treg entretenus dans des tumeurs pourraient expliquer en partie l'anergie des CTL et des T_H. En effet, après avoir vacciné des volontaires avec des peptides Melan-A couplés à des oligonucléotides CpG, des CTL spécifiques dont le phénotype était similaire à des CTL antiviraux efficaces ont été retrouvées dans le sang, mais pas dans les tumeurs. Celles-ci ont continué à croître, et une grande quantité de Treg plus actifs que normal y ont été retrouvés²⁸³. Un vaccin thérapeutique devra générer des lymphocytes au phénotype efficace qui ne tomberont pas en anergie dans les tumeurs, comme cela peut-être le cas avec le cancer ou d'autres maladies¹⁴⁰⁻¹⁴².

2.3.3.3 Antigènes ciblés par un vaccin contre le cancer

Pour élaborer un vaccin contre un cancer, il faut commencer par cibler un ou des antigènes spécifiques. Le nombre et les caractéristiques de ces antigènes peuvent influencer l'efficacité d'un vaccin. Il se trouve que les cellules cancéreuses humaines présentent divers types d'antigènes distinctifs aux tumeurs qui peuvent être reconnus par les lymphocytes T. Ces antigènes, qui idéalement pourraient être ciblés par une réponse immunitaire induite par un vaccin, sont générés naturellement de deux façons différentes : soit qu'ils proviennent de nouvelles mutations permettant à l'antigène de s'ancrer dans le CMH ou en générant de nouveaux épitopes³²⁰, ou soit qu'un gène habituellement silencieux s'exprime anormalement²⁸⁴.

Plusieurs mutations ponctuelles sont reliées à l'apparition de caractéristiques oncogéniques. Par exemple, la cycline-dépendante kinase CDK4 est couramment mutée dans les mélanomes^{321,322}. Ces nouveaux antigènes sont donc spécifiques aux tumeurs, donc probablement non tolérés par le système immunitaire. Cependant, ces antigènes sont habituellement spécifiques à une seule tumeur, et pas nécessairement partagés entre toutes les tumeurs et encore moins entre tous les patients d'un même type de cancer. Cette caractéristique rend peu probable la réussite d'un vaccin à grande échelle visant ces antigènes, même si des lymphocytes T spécifiques capables d'infiltrer des tumeurs ont été détectés³²³. Malgré tout, on fonde de grands espoirs sur une forme mutée de B-RAF qui se retrouve dans plus de 60 % des mélanomes et qui peut être reconnue par des cellules T auxiliaires^{324,325}.

Parmi les gènes habituellement silencieux, mais exprimés dans les tumeurs, les plus connus font partie de la famille d'antigènes codant pour les mélanomes (MAGE)³²⁶⁻³²⁸, correspondant à des gènes exprimés par les cellules germinales mâles. Puisque ces dernières n'expriment pas de CMH à leur surface, ils ne présentent pas leurs protéines aux cellules T³²⁹, et ainsi, les cellules tumorales sont les seules à pouvoir présenter les protéines MAGE. Il existe d'autres familles de gènes similaires spécifiques aux tumeurs, dont les BAGE³³⁰, GAGE³³¹, LAGE/NY-ESO-1^{332,333} et la famille SSX^{334,335}. Cependant, il n'est pas encore démontré que les lymphocytes T peuvent reconnaître ces antigènes et éliminer complètement une tumeur²⁸⁴. En effet, sur 45 patients d'une étude, seulement 2 ont développé des CTL spécifiques contre l'épitope MAGE-3.A1^{291,292}. Chez sept volontaires qui ont subi une régression de la taille de leur tumeur suite à une vaccination contre MAGE-3A1, deux d'entre eux avaient une réponse spécifique de CTL^{336,337}. Beaucoup d'autres vaccinations ont été tentées avec ces antigènes^{294,324,338-348} et globalement, très peu de CD4⁺ ou de CD8⁺ spécifiques ont pu être générés. Aucun CD8⁺ spécifique sécrétant de l'IFN- γ n'a été détecté, et très peu d'anticorps contre les tumeurs ont été retrouvés chez seulement un patient sur un total de 24 étudiés. Par contre, l'utilisation de l'adjuvant AS02B couplé au vaccin a élevé le score à 24/24. Somme toute, sur 111 patients recevant MAGE-3.A1 avec des adjuvants, 8 ont récupéré

de la maladie, et 12 autres ont vu leurs tumeurs réduire de taille^{336,344,345,349}, ce qui reste malheureusement très peu. Ainsi, générer des T_H et des CTL spécifiques sécrétant de l'IFN- γ n'est pas suffisant pour apporter à un vaccin une valeur thérapeutique ou pour définir les corrélats de protection immunitaire.

D'autres antigènes étudiés pour élaborer un vaccin sont codés par des gènes surexprimés dans les tumeurs²⁸⁴. Par exemple, les gènes PRAME, TÉLOMÉrase et SURVIVIN sont surexprimés dans les mélanomes et peuvent être les cibles de CTL efficaces³⁵⁰⁻³⁵⁴. Cependant, d'autres cellules expriment ces gènes et pourraient être la cible de ces mêmes CTL. Malgré cela, certains ont procédé à des tentatives de vaccination contre la télomérase, mais les CTL générés ne reconnaissaient pas les tumeurs présentant cette protéine^{355,356}.

Finalement, les derniers types d'antigènes considérés comme une cible potentielle pour un futur vaccin antitumoral sont les protéines provenant des gènes de différenciation présents chez les mélanomes, comme la tyrosinase, Melan-A/Mart-1, gp100/pMel17, TRP-1 et TRP2³⁵⁷⁻³⁶⁰. Les essais avec ces types de vaccins ont produit des résultats encourageants en éliminant quelques mélanomes de la peau. Contre toute attente, ces antigènes ne sont pas outre mesure tolérés par le système immunitaire, malgré que d'autres cellules normales du corps possèdent les mêmes antigènes^{361,362}. L'utilisation de l'adjuvant CpG couplé avec le vaccin Melan-A/Mart-1 augmente le nombre de patients qui développent des CTL spécifiques de 4/8 sans adjuvant à 8/8 avec l'adjuvant³⁶³. Malheureusement, les maladies ne se sont pas résolues malgré la présence de CTL spécifiques. Encore une fois, la quantité de CTL générées n'est pas suffisante pour arriver à développer un vaccin thérapeutique.

Une fois les antigènes ciblés et pour s'assurer de l'efficacité de cet antigène vaccinal, les travaux les plus récents se sont investis dans l'élaboration de peptides se liant solidement aux CMH²⁸⁴. Les protéines gp100³⁶⁴⁻³⁶⁷, Melan-A.A2³⁶⁸⁻³⁷² et NY-ESO-1^{373,374} ont été étudiées pour générer des peptides modifiés pour se fixer fortement aux CMH de classe

1. Il a été démontré *in vitro* que les CTL reconnaissent plus facilement ces peptides modifiés.

Une méta analyse de toutes les tentatives de vaccination a révélé que le taux de réussite clinique, tout antigène visé confondu, était de 2,6 %, sur un total de 444 patients^{339,341,375-384}. Ce pourcentage est tout de même plus élevé que les rémissions naturelles sans vaccination qui se situe entre 0,1 et 1 %³⁸⁵. L'apparition de CTL spécifiques est importante, mais pas suffisante pour guérir des gens du cancer.

D'autres tests ont apporté de l'information quant aux mécanismes qui peuvent venir à bout des tumeurs. Des individus souffrants de leucémie myéloïde chronique recevant un traitement d'IFN- α -2- β , 60 % d'entre eux ont bien répondu. 11 des 12 de ceux-ci ont développé des CTL ciblant un antigène tumoral (protéinase 3), alors qu'aucun des 7 patients qui n'ont pas guéri n'en a développé³¹⁰. L'effet d'IFN- α -2- β est probablement relié à la réponse des CTL.

2.3.3.4 *Corrélat de protection immunitaire contre le cancer*

Ainsi, un vaccin contre le cancer doit idéalement générer à la fois des CTL et les T_H spécifiques²⁸⁴. D'ailleurs, lorsque l'on injecte une forte quantité de CTL spécifiques aux tumeurs, 50 % des patients répondent cliniquement à ce transfert³⁸⁶. Une bonne réponse CTL anti-tumorale est associée avec le nombre de ces cellules, leur affinité pour les antigènes tumoraux³⁸⁷ et à la fonctionnalité de celles-ci. En effet, ces cellules devront avoir un profil de sécrétion plus large que seule la protéine IFN- γ . De plus, pour qu'un vaccin soit efficace, il faudra comprendre pourquoi il y a une anergie dans les tumeurs²⁸⁴. L'analyse de l'expression génique dans les tumeurs pourrait être une méthode pour comprendre ce qui s'y passe³⁸⁸. Il faudra cependant comparer ces résultats à une analyse de l'expression génique d'une bonne réponse immunitaire, comme celle induite par un vaccin protecteur.

2.4 La fièvre jaune et son vaccin

Le vaccin contre la fièvre jaune YF17D est un vaccin atténué parmi les plus protecteurs que l'humanité n'ait jamais développé. Depuis son développement, peu d'études se sont attardées au vaccin ou à la maladie. Aujourd'hui, dans un contexte d'étude des corrélats de protection, le YF17D s'offre comme un modèle d'étude idéal de l'immunologie humaine pour définir les corrélats de protection.

2.4.1 La maladie de la fièvre jaune

La fièvre jaune est une fièvre hémorragique virale souvent fatale, présente aujourd'hui en Afrique et en Amérique du sud, qui s'est inscrit dans l'histoire occidentale au moment des premières colonies sud-américaines. La première description de la fièvre jaune a été retrouvée dans un manuscrit maya, décrivant une épidémie provoquant des vomissements noirs au Yucatan en 1648³⁸⁹. Ce n'est cependant qu'en 1750 que le terme fièvre jaune a été utilisé pour la première fois à la Barbade, à cause de la jaunisse que provoquait la maladie. Par la suite, cette fièvre devint un problème majeur dans les colonies américaines et, probablement à cause du commerce d'esclaves, en Afrique³⁹⁰. Les moustiques *Aedes aegypti*, vecteurs de la maladie, voyagèrent avec les vaisseaux pour causer des épidémies majeures dans les grandes villes des États-Unis et de l'Europe³⁹¹⁻³⁹³. C'est à partir de la découverte du vecteur du virus vers 1900 que les épidémies ont diminué en fréquence, car de nombreuses précautions ont été prises pour enrayer les moustiques problématiques. Par la suite, la maladie s'est restreinte à l'Amérique du Sud et l'Afrique subsaharienne, là où il était impossible d'enrayer les moustiques vecteurs de la maladie³⁹⁴.

Aujourd'hui, malgré l'existence d'un vaccin efficace depuis 1936, la fièvre jaune est une maladie d'actualité qui est en recrudescence tant en Afrique qu'en Amérique du Sud, dû à un relâchement de la vaccination des populations des régions à risques³⁹⁵. On estime à

près de 200 000 le nombre de cas de fièvre jaune par année dans le monde, dont 90 % sont en Afrique³⁹⁵⁻³⁹⁸.

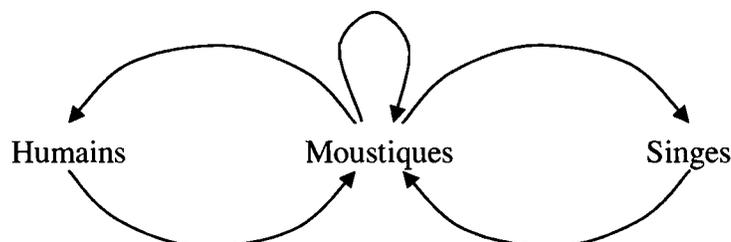


Figure 1. Cycles de transmission du virus de la fièvre jaune.

En zone urbaine, les moustiques vecteurs du virus transmettent ces derniers aux êtres humains, qui eux-mêmes servent de réservoir pour de futurs vecteurs. Dans les jungles, ce sont les singes qui constituent le réservoir de virus. La transmission transovariante intermoustique est particulièrement importante pour la survie du virus lors de longues périodes de sécheresse.

2.4.1.1 Vecteurs du virus de la fièvre jaune

Aedes aegypti n'est pas le seul vecteur du virus de la fièvre jaune. Plusieurs autres moustiques sont connus, soit *Haemagogus*, *Aedes africanus* et les espèces d'*Aedes* sylvestres africaines. *Aedes aegypti* se retrouve communément dans les villes, *Haemagogus* et *Aedes africanus* peuplent respectivement les jungles sud-américaines et africaines alors que les derniers ont pour habitat les savanes humides et forêts africaines. On dénombre de ces espèces, en Afrique de l'Ouest, *A. furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. africanus*, *A. opok*, *A. vittatus* et *A. metallicus*, alors qu'en Afrique de l'Est, on retrouve *A. africanus* et *A. simpsoni*^{399,400}. Les singes des jungles et les êtres humains des zones urbaines sont les deux sources où s'approvisionnent les moustiques en virus³⁹⁹, ce qui rend l'éradication de la maladie impossible puisqu'il n'est pas à notre portée d'immuniser tous les primates contre la fièvre jaune et d'enrayer le virus. La vaccination préventive à toutes les générations chez les populations à risque demeure le meilleur moyen pour faire face à cette maladie.

2.4.1.2 Symptômes de la maladie et traitements

La fièvre jaune est fulgurante et fatale. Elle fait partie des maladies les plus mortelles pour l'être humain⁴⁰¹. La progression de la maladie se distingue en trois étapes différentes : la période d'infection, la période de rémission et la période d'intoxication⁴⁰²⁻⁴⁰⁵. La première phase, qui dure de 3 à 4 jours, se caractérise par plusieurs symptômes, dont la fièvre, des maux de tête, la prostration, la photophobie, une douleur lubosacrée et dans les extrémités inférieures, une myalgie généralisée, une anorexie, des nausées et vomissements, de l'impatience, de l'irritabilité et du vertige³⁹⁹. La période de rémission, qui s'accompagne d'une diminution ou d'une disparition de la fièvre, est de courte durée et au maximum de 48 heures. Approximativement 15 % des personnes infectées développeront une jaunisse et entreront dans la phase d'intoxication. Les patients subissent alors un retour de la fièvre, des nausées et vomissements, en plus d'avoir des douleurs épigastriques, une bradycardie, et une prédisposition aux hémorragies. Plusieurs organes sont touchés et peuvent devenir dysfonctionnels, incluant le foie, les reins et le cœur³⁹⁹. La troisième phase est mortelle dans 20 à 50 % des cas⁴⁰¹. Par ces symptômes, on distingue deux propriétés propres au virus de la fièvre jaune : son viscérotropisme, c'est-à-dire son habileté à infecter le foie, la rate, le cœur et les reins, ainsi que son neurotropisme, à savoir sa capacité d'infecter le cerveau et de causer une encéphalite³⁹⁹.

Malheureusement, peu de traitements existent contre la fièvre jaune. On recommande les soins généraux de support pour les patients et il n'existe aucun traitement spécifique disponible sur le marché. Ces soins généraux incluent de maintenir l'alimentation du malade et prévenir l'hypoglycémie, traiter l'hypotension par administration de fluide, administrer de l'oxygène au besoin, etc⁴⁰². Chez les singes, l'injection d'IFN- γ diminue la virémie et la nécrose hépatique⁴⁰⁶, mais pour être efficace, il faut administrer l'interféron rapidement après l'infection initiale. Il est déjà trop tard 24 heures après la contamination⁴⁰⁷. Ce traitement s'avère donc impensable à dispenser dans des lieux reculés des jungles ou dans des villes sans système de santé exceptionnel.

2.4.1.3 Virologie moléculaire de la fièvre jaune

Le virus de la fièvre jaune est membre de la famille des flavivirus, qui inclue les virus de la dengue, de l'encéphalopathie japonaise, de l'hépatite C et du Nil occidental. Ces virus enveloppés sont de petite taille, soit de 40 à 60 nm, composé d'un brin d'ARN positif⁴⁰⁸. Son génome relativement simple contient 10 862 nucléotides : deux petites régions non codant (NCR) flanquant une région de 10 233 nucléotides codant pour un propeptide⁴⁰⁹. Dans une cellule infectée, ce propeptide est clivé après la translocation au réticulum endoplasmique rugueux en 10 protéines : 3 structurales, soit la protéine capsid (C), la pré-protéine de matrice (prM) et la protéine enveloppe (E), et 7 non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5)³⁹⁹. Les NCR servent de promoteurs pendant la réplication virale en plus d'être essentiels à la structure du virion et à la cyclisation du génome pendant la réplication et l'encapsidation. La protéine C, quant à elle, a une taille de 11 kDa et interagit avec le génome viral pour former la nucléocapside⁴¹⁰. La glycoprotéine prM, de 27 kDa, stabilise le polypeptide E durant l'exocytose. C'est alors qu'elle est habituellement clivée par une protéase cellulaire pour ne laisser que la protéine M (8 kDa) sur l'enveloppe du virion. Cette enveloppe est composée d'une double couche de lipides provenant de la cellule cible, avec des dimères de protéines glycosylées E (chacune 50 kDa). Cette protéine est impliquée dans l'internalisation et la fusion des membranes virales et cellulaires, en plus de s'ancrer aux récepteurs cellulaires. Les mutations de cette protéine affectent directement le tropisme et la virulence⁴⁰⁹. NS1 est une protéine glycosylée qui est impliquée dans la réplication de l'ARN des flavivirus^{411,412} et probablement dans la lyse cellulaire⁴¹³. NS2A (22 kDa) est essentielle à la réplication virale, à l'assemblage du virion, à l'exocytose et interagit avec NS3, NS5 et la NCR 3^{414,415}. Les protéines NS2B (14 kDa) et NS3 (70 kDa) interagissent ensemble pour accomplir plusieurs fonctions enzymatiques, dont celle d'une protéase à sérine pour cliver le propeptide viral, d'une hélicase à ARN et d'une triphosphatase à ARN³⁹⁹. NS4A (16 kDa) et NS4B (27 kDa) sont associées à la membrane et participent à la réplication de l'ARN. La protéine NS5 (103 kDa) fonctionne comme une méthyltransferase et une ARN polymérase spécifique au virus³⁹⁹.

2.4.1.4 Cycle de réplication du virus de la fièvre jaune

On estime qu'une piqûre de moustique peut inoculer approximativement 1000 virions chez l'être humain⁴¹⁶. À partir du moment où le virus est en contact avec une cellule qui peut se faire infecter, le cycle de réplication des flavivirus commence par un attachement du virion à un récepteur extracellulaire de la cellule, jusqu'ici inconnu pour la fièvre jaune. Le virion est internalisé par le mécanisme gouverné par les clathrines, et le pH acide des vésicules permet la fusion des membranes et la dénaturation de la capsid. Le brin d'ARN positif sert alors de matrice pour former le brin négatif, nécessaire à la réplication, ce qui est alors suivi de la traduction. Les protéines non-structurales sont impliquées dans ces étapes ainsi que dans les modifications post-traductionnelles. Les virions sont ainsi assemblés, glycosilés et ensuite relâchés à l'extérieur de la cellule⁴⁰⁹. Les cellules ciblées par le virus ne sont pas bien connues, mais certains indices nous permettent d'en identifier ou de présumer l'implication de certaines. Les PBMC, cellules mononucléées du sang, et possiblement les cellules lymphoïdes, semblent être les cibles de réplication du virus dans les premiers temps de l'infection^{417,418}, tout comme les cellules de foie Kupffer chez les singes rhésus. Trois jours après l'infection de ces singes, le virus est détectable dans la moelle osseuse, la rate et les nœuds lymphatiques⁴¹⁷. Chez les cas fatals de fièvre jaune chez l'humain, 80% des hépatocytes en moyenne sont en nécrose⁴¹⁹. On y retrouve d'ailleurs ARN et antigènes du virus dans les hépatocytes du foie⁴²⁰, tout comme dans les tubulures rénales et dans le cœur des patients décédés⁴²¹⁻⁴²³.

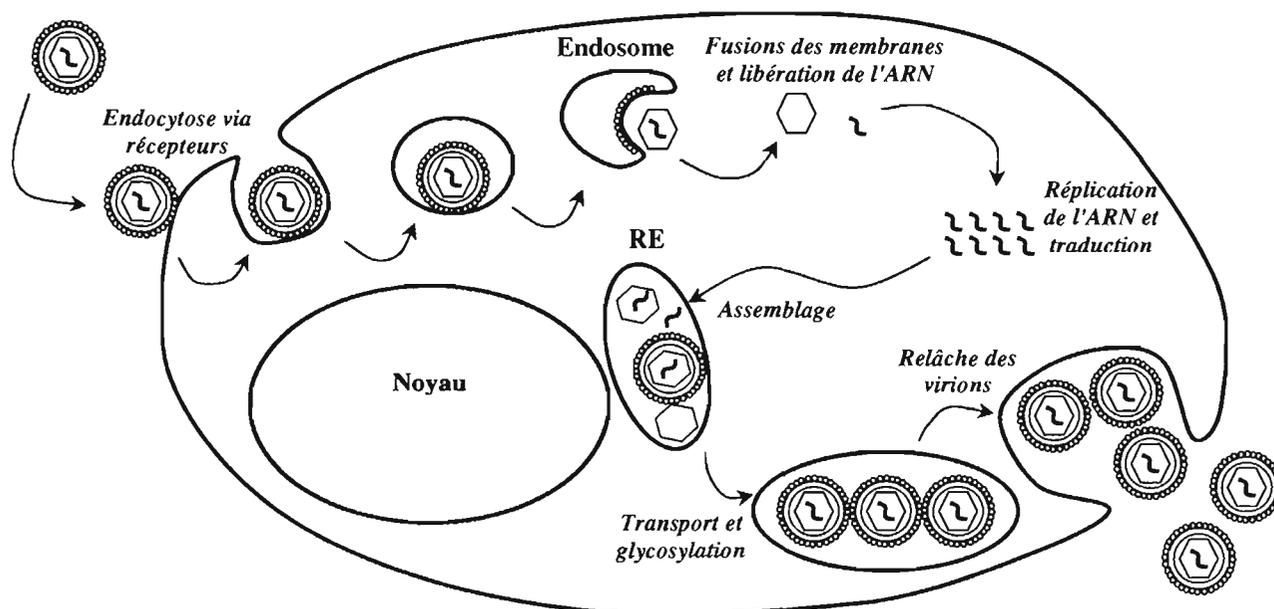


Figure 2. Cycle de réplication du virus de la fièvre jaune.

2.4.1.5 Réponse immunitaire induite par le virus de la fièvre jaune

Il n'y a aucun cas documenté de personne ayant eu une deuxième fois la fièvre jaune après l'avoir déjà développée une première fois³⁹⁹. La réponse immunitaire contre la maladie est donc persistante et efficace. Il est connu que les personnes infectées par le virus de la fièvre jaune développent des anticorps 7 ou 8 jours après l'infection initiale, soit dans la période d'intoxication⁴⁰³. Des cas surprenants de mémoire immunitaire ont été étudiés. Certains individus peuvent garder des anticorps contre le virus de la fièvre jaune jusqu'à 78 ans après la maladie^{424,425}. La réponse cellulaire semble aussi être présente, puisque plusieurs épitopes spécifiques pour les lymphocytes T CD8⁺ ont été décrits dans la protéine E, NS1, NS2A et NS3^{408,426-428}. Pour étudier la réponse immunitaire innée et son efficacité, certaines études se sont penchées sur l'effet de la dose initiale de virus sur des singes. La diminution de la dose de virus de la fièvre jaune inoculée à des singes rhésus augmente la période d'incubation sans modifier la durée de la maladie ou le taux de mortalité^{425,429,430}. Cela laisse supposer que la réponse immunitaire innée seule est insuffisante pour se débarrasser d'une infection de la fièvre jaune si petite soit-elle³⁹⁹.

2.4.2 Le vaccin contre la fièvre jaune YF17D

Le vaccin contre la fièvre jaune 17D (YF17D) a été développé par des méthodes empiriques en 1936. Pour cette innovation, Max Theiler s'est vu accorder le prix Nobel de Médecine en 1951. Une série de passages dans des animaux ou dans des milieux de culture a atténué la souche virulente Asibi, nom de l'africain chez qui a été prélevé l'échantillon. Les 54 premiers passages, débutant en juin 1927, ont été effectués dans des singes soit par injection ou par l'intermédiaire d'*Aedes aegypti*. Par la suite, plusieurs cultures *in vitro* ont suivi : 18 dans des tissus d'embryons de souris, 58 dans des tissus d'embryon de poules, 145 dans des tissus d'embryon de poules ayant subi l'ablation du cerveau et de la colonne vertébrale et 11 dans des œufs de poules. Selon le pays producteur du vaccin, jusqu'à 7 autres passages ont été effectués dans des œufs de poules. Ce vaccin, qui se nomme 17D-204 plus spécifiquement, est légèrement différent du vaccin 17DD, qui a été développé à partir du passage 195 de la souche Asibi et qui est utilisé au Brésil. Ailleurs dans le monde et dans ce travail, le vaccin utilisé est le vaccin contre la fièvre jaune 17D-204, abrégé à YF17D^{423,431}.

Il existe plusieurs producteurs de vaccin YF17D. L'Angleterre produit le ARILVAX (Chiron), la France produit le Stamaril (Sanofi-Pasteur) et le Sénégal produit aussi le YF17D (Institut Pasteur). D'autres vaccins sont produits pour des consommations locales, mais ne sont pas approuvés par l'Organisation mondiale de la Santé. Les pays producteurs sont les États-Unis (YF-VAX), la Russie, la Suisse (Flavimun), la Chine et la Colombie⁴⁰¹.

2.4.2.1 Différences moléculaires entre le YF17D et le virus sauvage

Une diminution de la neurovirulence et la perte du viscérotropisme du virus chez les singes a eu lieu entre les passages *in vitro* 89 et 114, soit dans les cultures d'embryons de poules dénués de cerveau et de colonne vertébrale. C'est dans ces mêmes cultures que le

virus a perdu de la neurovirulence chez la souris, soit entre les passages *in vitro* 114 et 176. Par la suite, aucun singe n'a développé d'encéphalites suivant une injection du virus dans le sang, alors que de 5 à 10 % des singes développaient une encéphalite si l'injection s'effectuait directement dans le cerveau. À partir du passage *in vitro* 227 en 1936, les tests sur les êtres humains se sont avérés être acceptables, puisque le vaccin développait des anticorps et était sans danger^{432,433}. Depuis lors, plus de 400 millions de personnes ont reçu le vaccin à travers le monde³⁹⁷.

Tableau I. Mutations observées entre le YF17D et la souche virale sauvage⁴⁰¹

Gène	Fonction de la protéine (références dans le texte)	Acide aminé ou nucléotide muté	Mutation
5'NCR		-	-
C	Nucléocapside	-	-
prM	Stabilise la protéine E	M 36	L->P
E	Impliquée dans l'internalisation, la fusion des membranes et l'ancrage du virus à la cellule hôte	E 52	G->R
		E 170	A->V
		E 173	T->I
		E 200	K->T
		E 299	M->I
		E 305	S->F
		E 380 E 407	T->R A->V
NS1	Réplication de l'ARN	NS1 307	I->V
NS2A	Réplication virale Assemblage du virion Exocytose	NS2A 61	M->V
		NS2A 110	T->A
		NS2A 115	T->A
		NS2A 126	S->F
NS2B	Maturation du virion	NS2B 109	I->L
NS3	Maturation du virion	NS3 485	D->N
NS4A	Réplication de l'ARN	NS4A 146	V->A
NS4B	Réplication de l'ARN	NS4B 95	I->M
NS5	ARN polymérase et méthyltransférase	NS5 836	Q->K
		NS5 900	P->L
3' NCR		nucléotide 10367	U->C
		nucléotide 10418	U->C
		nucléotide 10800	G->A
		nucléotide 10847	A->C

Plusieurs mutations ont causé l'atténuation du virus. Les quelques nucléotides qui différencient le YF17D de la souche virale, soit 0,62 % du génome ou l'équivalent de 20 acides aminés, se situent surtout dans les gènes codant pour les protéines E et NS2A, et dans la partie NCR 3⁴³⁴. De nombreuses études ont été menées pour déterminer les mutations qui ont causé l'atténuation. Un malheureux cas d'encéphalite infantile due au YF17D a mené à l'isolation de cette souche neurotropicque. Après séquençage, cette souche avait les acides aminés E155 et E303 mutés^{435,436}. D'autres observations chez la souris ont révélé, après avoir remplacé la protéine E du vaccin par son équivalent de la souche virale, que le virus regagnait sa neurovirulence⁴³⁷. Plus précisément, des études ont démontré que les acides aminés E52, E173, E303, E305, E525, E327, E380 semblent déterminant pour la neurovirulence^{436,438-442}, alors que les acides aminés E27, E28, E155, E323, E331 et NS4B95 sont possiblement impliqués dans le viscérotropisme⁴⁴³⁻⁴⁴⁷. La protéine E, par sa fonction d'ancrage aux cellules hôtes, est donc capitale pour sa virulence et son tropisme^{448,449}.

2.4.2.2 Effets secondaires du YF17D

De rares complications peuvent survenir lors de la prise de ce vaccin. Deux grands types de maladies peuvent survenir, soit viscérotropique, soit neurologique. Approximativement une personne sur 2,5 millions peut développer après 2 à 5 jours la maladie viscérotropique associée au YF17D, une maladie trop souvent mortelle, semblable au viscérotropisme de la fièvre jaune. La maladie neurotropicque associée au YF17D se déclare surtout chez les enfants de moins de 1 an (incidence de 0,5 à 4 par 1000 enfants) et chez les gens âgés (incidence de 2,5 à 16 par million)⁴⁵⁰⁻⁴⁵². De plus, comme le vaccin est développé dans des œufs, il est contre indiqué d'administrer le vaccin à quiconque ayant des allergies aux oeufs⁴⁰¹. Des effets secondaires plus fréquents accompagnent le vaccin. 14,6 % des vaccinés peuvent avoir des maux de tête et 10,2 % des douleurs à différentes parties du corps, et ce, 5 à 7 jours après vaccination. Seulement, aucun contrôle placebo n'a été utilisé dans cette précédente étude et il est probable que ces effets seraient moins importants⁴³³.

2.4.3 La réponse immunitaire induite par le YF17D

Le vaccin YF17D stimule une réponse immunitaire grandement protectrice. Plusieurs caractéristiques de cette réponse sont déjà décrites. Tout d'abord, les premiers changements observés après la vaccination contre la fièvre jaune sont une diminution du nombre d'érythrocytes, de leucocytes, de neutrophiles, d'éosinophiles et de lymphocytes chez les gens vaccinés⁴⁵³.

Les cellules infectées par le YF17D n'ont pas été trouvées *in vivo*, mais il est connu que les cDC et les cellules dendritiques de la peau exprimant DC-SIGN peuvent être des cibles de répliquions pour la chimère modifiée dengue-fièvre jaune et le virus de la dengue, un autre flavivirus^{454,455}. D'ailleurs, on a retrouvé les protéines NS4A et B dans des cDC humains en culture après les avoir exposés au YF17D^{21,397}, un autre indice indiquant que ces cellules peuvent être infectées. D'autres observations soutiennent que tant les DC matures qu'immatures peuvent être infectées par le vaccin, et l'infection des cellules immatures n'altère pas le processus de maturation de celles-ci. De surcroît, les DC infectées qui deviennent matures sont par la suite plus résistantes à l'apoptose et présentent efficacement les antigènes du virus²¹. De plus, le virus a été retrouvé dans les organes lymphoïdes, le foie, la rate, le thymus et la moelle épinière de singes vaccinés⁴⁵⁶. Cependant, le YF17D ne peut infecter les cellules B, T et les monocytes²¹.

2.4.3.1 Réponse immunitaire innée contre le YF17D

La vaccination avec le YF17D stimule à la fois les réponses immunitaires innée et acquise et active leurs cellules respectives. Les PBMC d'individus vaccinés avec le YF17D sont cytotoxiques vis-à-vis des cellules de type K562, ce qui laisse supposer que les cellules NK sont stimulées par la vaccination⁴⁵⁷. La réponse au YF17D inclut une augmentation de la présence d'IFN- γ dans le sang aux alentours de la sixième journée après vaccination⁴⁵⁸. D'ailleurs, on retrouve des niveaux élevés de la 2',5'-oligoadenylate synthétase, dépendante de l'interféron, chez les cellules T et B des

individus vaccinés⁴⁵⁸. Les protéines interféron α et β , TNF, IL-1Ra, néopterin et β -2-microglobuline se retrouvent élevées dans le sang pendant la période virémique après la vaccination⁴⁵⁸⁻⁴⁶¹.

Des analyses globales d'expression génique par puce d'ADN ont été effectuées sur des PBMC isolés entre 4 et 7 jours après vaccination de volontaires humains. Plusieurs expressions de gènes se retrouvent modifiés par la vaccination, dont des gènes de réponse immunitaire, de synthèse de protéines, d'apoptose, de métabolisme, de signalisation cellulaire et de contrôle de la transcription. Parmi les gènes davantage exprimés, on retrouve des gènes induits par l'interféron comme OAS1, OAS2, MX1, MX2, ISG15 et IFIT3, les gènes impliqués dans la protéolyse et la présentation de l'antigène comme CD74, LAP3, PSMA4, PSMB9 et PSME2. Malgré cela, les gènes d'interférons eux-mêmes ne sont pas davantage exprimés. La variation prédominante reste la diminution de l'expression de gènes associés à la synthèse de protéines, dont les sous-unités ribosomales⁴⁵³. Malgré l'intérêt de cette étude, cette analyse de transcription s'est concentrée seulement sur un seul temps donné après vaccination.

Suite à une vaccination avec le YF17D, les volontaires développent une virémie très variable d'un individu à l'autre, mais la majorité des vaccinés ont des pics de virémie aux jours 4, 5 et 6^{433,458,461,462}. La réponse au vaccin varie d'une personne à l'autre, ce qui est probablement dû entre autres aux caractéristiques génétiques et immunitaires des individus. De plus, le vaccin contre la fièvre jaune est composé de quelques différents virions en quantités variables comportant des mutations génétiques acquises pendant sa production, et non pas composé d'un seul type de clone d'une séquence exacte de nucléotides. On a dénombré jusqu'à 12 variants viraux dans un vaccin⁴⁶³⁻⁴⁶⁶. Cependant, après avoir séquencé des virus YF17D isolés après la vaccination, presque aucune mutation n'a été observée dans le génome, à l'exception d'une ou deux dans la région NS5 dans certains cas⁴⁶⁴. Une fois le vaccin injecté, il semblerait qu'un groupe restreint de clones peuvent se multiplier. Dans une étude pour évaluer l'effet de la variation de la concentration entre plusieurs doses, la concentration du vaccin s'avère chez les singes

rhésus être inversement proportionnelle au temps d'apparition, à la durée et l'amplitude de la virémie, ainsi qu'au temps d'apparition de la réponse immunitaire⁴³³.

2.4.3.2 Réponse humorale contre le YF17D

La réponse humorale au YF17D est très forte. Les IgM apparaissent les premiers une semaine après la vaccination pour persister entre 30 et 60 jours⁴⁶⁷⁻⁴⁶⁹. Les anticorps neutralisants développés par la vaccination persistent longtemps, voire 30 ans dans certains cas⁴⁷⁰. Ceux-ci apparaissent entre une et deux semaines après la vaccination^{461,471}, et plus habituellement entre 10 et 14 jours⁴⁰¹. Entre 86 et 88 % des vaccinés sont séropositifs après 14 jours et de 99 à 100 % des vaccinés le sont après 28 jours³. Aucune corrélation n'a été observée entre le niveau de virémie et la force de la réponse humorale⁴⁶¹. Plusieurs études ont été menées pour déterminer le taux de séroconversion, et la plupart approche 100 %^{461,472-496}. Cette réponse humorale est efficace, puisque des anticorps neutralisant contre la protéine E et des anticorps fixant le complément contre la protéine NS1 ont été retrouvés^{470,497,498}. Pour des raisons de précautions, l'Organisation mondiale de la Santé conseille la revaccination avec le YF17D 10 ans après une première administration de celle-ci⁴⁹⁹.

2.4.3.3 Réponse cellulaire contre le YF17D

La réponse cellulaire est aussi stimulée par le vaccin, malgré le peu d'études qui s'y sont intéressées. Il a été observé que le nombre de cellules T CD8⁺ se trouve élevé deux jours après la vaccination, et ce, pendant deux semaines⁴⁶¹. Dans une étude sur quatre volontaires vaccinés contre la fièvre jaune, les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissant les protéines E, NS1, NS2B, et NS3 ont été retrouvés, et ces cellules étaient aptes à sécréter de l'IFN- γ après restimulation dès le quatorzième jour après la vaccination, et ce, jusqu'à 19 mois. Cependant, aucun test n'a été effectué avant le quatorzième jour⁴⁰⁸, et le petit nombre de volontaires demande à confirmer les résultats avec une cohorte plus large. D'autre part, l'injection d'anticorps contre la dengue ne protège pas les singes contre la

fièvre jaune, alors que l'immunisation active de ceux-ci contre la dengue les protège contre la fièvre jaune, indiquant que la réponse immunitaire cellulaire joue un rôle dans la *cross-protection* et est active dans la réponse contre la fièvre jaune⁵⁰⁰.

In vitro, les cDC humaines purifiées s'activent à la présence du YF17D. Elles produisent de l'IL-6, de l'IL-10, du TNF, de l'IP-10 et du MCP-1 lorsqu'ils sont en culture avec le vaccin. De même, les pDC produisent de l'IFN- α en présence du YF17D. Chez la souris, YF17D active les cDC par leur TLR 2, 7 et 9 et stimule la production IL-12p40, IL-6 et IFN- α . La réponse qui en suit se compose des cytokines IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et de lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques, ces derniers produisant de l'IFN- γ . D'ailleurs, la protéine auxiliaire MyD88 a été démontrée comme essentielle à cette activation. Dans un modèle de lignée cellulaire humaine transfectée, YF17D active aussi le TLR8³⁹⁷. Ainsi, le YF17D induit une réponse T_{H1} et T_{H2} chez les souris par l'intermédiaire de TLR. Cependant, les souris ne sont que de piètres hôtes pour le YF17D et ne développent que rarement la maladie après injection du virus sauvage comparativement à l'être humain⁵⁰¹⁻⁵¹⁰. Comme l'interaction entre le vaccin et la souris est différente de celle avec l'humain, il est donc important de confirmer ces résultats chez ce dernier.

L'efficacité du vaccin contre la fièvre jaune est remarquable et c'est pourquoi il est envisagé de l'utiliser comme vaccin atténué recombinant contre d'autres maladies en y insérant des gènes codant pour des protéines provenant de maladies différentes. Il pourrait s'agir de gènes d'autres flavivirus pour développer un vaccin efficace contre l'encéphalite japonaise, la dengue, ou le virus du Nil occidental. De plus, des versions modifiées génétiquement du YF17D sont présentement étudiées pour immuniser contre la malaria ou le cancer⁵⁰¹⁻⁵¹⁰. Pour que les prochains vaccins deviennent efficaces et protecteurs, il est primordial de comprendre le fonctionnement du YF17D et ses caractéristiques immunostimulatoires.

2.5 Projet de recherche

Les nouveaux vaccins en développement se doivent de stimuler les mécanismes essentiels qui mènent à la protection immunitaire, mécanismes qui définissent les corrélats de protection immunitaire. La découverte de ceux-ci passe par l'étude des réponses immunitaires protectrices, dont celles induites par les vaccins protecteurs. Le vaccin contre la fièvre jaune YF17D est un candidat idéal, puisqu'il protège près de 100 % des individus vaccinés pour une longue période de temps. L'analyse de la réponse immunitaire induite par le YF17D est jusqu'ici préliminaire et incomplète, se basant surtout sur des études utilisant des modèles animaux. De plus, très peu de travaux s'attardent à décrire l'importance de la réponse cellulaire, pourtant essentielle dans l'efficacité des vaccins en développement. Malgré tout, ces résultats préliminaires offrent une base pour orienter les recherches chez l'être humain.

2.5.1 Objectif, hypothèses et méthodes de recherche

Des études précédentes soulignaient l'importance des TLR et de la réponse immunitaire innée chez la souris en réponse au YF17D³⁹⁷. Ce vaccin doit avoir un effet semblable chez l'être humain, orientant la réponse immunitaire vers les voies T_{H1} et T_{H2} . L'objectif de cette recherche est de caractériser la réponse immunitaire protectrice induite par le YF17D. Vingt volontaires se sont fait vacciner et ont donné de leur sang avant et 3, 7, 10, 14, 28, 60, 90, 180 et 365 jours après vaccination. Ces échantillons permettront de caractériser la réponse immunitaire innée et acquise, ainsi que la mémoire induite par ce vaccin.

Pour mieux comprendre les différents aspects de cette réponse immunitaire, il est important d'examiner les détails des réponses innée et acquise contre le YF17D, toutes deux actives et interdépendantes chez les singes et souris, dans une large cohorte de volontaires humains en utilisant les techniques les plus efficaces disponibles. L'implication dans la réponse au YF17D de l'immunité innée, des NK, des DC, des TLR et des ISG, soupçonnés de participer activement à la protection contre certaines

maladies, a été étudiée par analyse de transcription par puce à ADN. Par cytométrie de flux, il a été possible d'analyser au niveau cellulaire les lymphocytes impliqués dans la mémoire immunitaire, dont les T_H et les CTL. L'analyse du patron d'expression génique ainsi que des cytokines sécrétées par des PBMC d'individus vaccinés a permis de vérifier si le vaccin induit une réponse T_{H1} ou T_{H2} chez l'être humain. De plus, une analyse attentive des patrons de transcription a permis de trouver de nouveaux acteurs insoupçonnés dans la réponse immunitaire protectrice.

Les méthodes employées dans ce travail sont appropriées. L'analyse par puce à ADN est la méthode la plus efficace pour vérifier l'implication de plusieurs dizaines de milliers de gènes en n'utilisant que très peu d'échantillons et cela, très rapidement. Valider l'importance des acteurs principaux de l'immunité au niveau protéique par CBA (*cytometric bead assay*) est crucial pour consolider les conclusions majeures des analyses de transcription. La cytométrie de flux est, par sa précision, le meilleur instrument pour qualifier au niveau cellulaire la réponse immunitaire. Et finalement, il est innovateur d'utiliser les puces à ADN, méthode sensible et complète, pour déterminer le phénotype T_{H1} et T_{H2} des PBMC stimulés.

En validant ces résultats avec d'autres vaccins protecteurs et en les comparant aux caractéristiques immunitaires des vaccins inefficaces et des maladies incurables, il sera possible d'identifier de nouveaux corrélats de protection. Ceux-ci seront alors utiles pour développer de nouveaux vaccins, qui devront reproduire les caractéristiques découvertes ici.

2.5.2 Contribution de l'auteur

Le projet de recherche a rassemblé la participation de plusieurs collaborateurs qui a mené à l'écriture de l'article intitulé : « *Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses* ». Il a été soumis au journal *Nature* le 26 février 2008. Ma participation a été majeure et j'ai contribué significativement à l'élaboration de l'article.

Plus précisément, j'ai été impliqué dans la quasi-totalité des manipulations qui ont mené aux figures de cytométrie de flux, de CBA et d'analyse de transcription de PBMC stimulées. J'ai d'ailleurs été le responsable de la majorité des CBA, m'occupant de la planification de l'expérience jusqu'à son analyse et sa présentation. Mon implication majeure et mes initiatives dans l'analyse des *gene array* ont été essentielles à la conceptualisation finale des figures de l'article. J'ai fait l'entière analyse des résultats de cytométrie associés à l'expression de Ki67 chez les lymphocytes et ses sous-populations. Finalement, j'ai imaginé la présentation et dessiné ses figures *heatmap* autres que celles de type *gene array*.

J'ai participé activement aux discussions qui ont mené à l'orientation du travail et à l'écriture de l'article. J'ai apporté quelques points majeurs à l'analyse des résultats, comme par exemple la valorisation des résultats de CBA, la mise en évidence des gènes associés à l'inflammasome, ainsi que les études de corrélation. Ce travail d'envergure m'a permis d'acquérir amplement d'aptitudes et de connaissances dans le domaine de la recherche pour écrire ce mémoire.

La participation des coauteurs a été essentielle à la réalisation de l'article. Entre autres choses, Denis Gaucher a été l'initiateur de ce projet et a été responsable de la grande majorité des expériences de cytométrie et d'isolation d'ARNm, Geneviève Boucher a effectué les analyses techniques des *gene array* et a finalisé graphiquement la majorité des figures d'analyse de transcription, Nadia Kettaf a hybridé les échantillons d'ARNm, Bastian R. Angermann mis au point les figures liant les facteurs de transcriptions à leurs cibles, Rama Akondy et Aline Rinfret ont précédé les expériences principales avec leurs appuis, comme l'élaboration de demandes d'éthiques, Bader Yassine-Diab, Mark J. Cameron, Robert Clum, David Kelvin, Roland Somogyi, Larry D. Greller, Robert S. Balderas, Peter Wilkinson et Jim Tartaglia ont apporté leurs lumières sur des questions d'ordre techniques, informatiques ou théoriques, et Elias K. Haddad et Rafick-Pierre Sékaly ont supervisé et orienté les travaux.

3. Article scientifique

Traduction du résumé de l'article

Les corrélats de protection immunitaire contre les cancers et la plupart des virus, comme le VIH, sont toujours inconnus, ce qui ralentit considérablement le développement de nouveaux vaccins contre ces derniers. Alors qu'une bonne réponse humorale est le corrélat de protection le plus évident contre les bactéries pathogènes^{1,2}, les tumeurs et virus nécessitent une réponse immunitaire complexe impliquant à la fois des lymphocytes T et B^{3,4}. Cette réponse immunitaire adaptative est tributaire de la réponse immunitaire innée, qui pourrait être un acteur important de la protection induite par un vaccin, même si peu de mécanismes sont connus à ce sujet⁵. Dans cette étude, nous avons employé la génomique fonctionnelle et la cytométrie de flux pour définir la signature de la réponse immunitaire induite par le vaccin contre la fièvre jaune YF17D. Ving volontaires ont été suivis jusqu'à un an après vaccination. Nous démontrons que l'immunisation avec le YF17D mène à une réponse immunitaire intégrée qui inclut plusieurs facettes des réponses immunitaires innée et acquise, dont le complément, les lymphocytes B et une réponse à la fois T_{H1} et T_{H2}. Ces réponses sont précédées par l'augmentation de l'expression de plusieurs facteurs de transcription, incluant STAT-1, IRF-7 et Ets-2, qui sont en amont d'une multitude de mécanismes de réponses immunitaires. Nos analyses transcriptionnelles soulignent la relation entre la transcription de gènes associés à l'inflammasome avec le contrôle de la virémie, alors que l'expression de gènes associés à l'IL-2 prépare une solide réponse T_H ciblant une panoplie d'épitopes. Les résultats présentés ici démontrent qu'un bon vaccin stimule une réponse immunitaire persistante, incluant les T_{H1} et T_{H2}, et faisant participer toutes les cellules effectrices du système immunitaire.

Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses

Denis Gaucher,¹⁻³ René Therrien,¹⁻³ Geneviève Boucher,^{1*} Nadia Kettaf,^{1-3*} Bastian R. Angermann,¹ Rama Akondy,⁴ Aline Rinfret,^{5,6} Bader Yassine-Diab,¹⁻³ Mark J. Cameron,⁷ Robert Clum,⁷ David Kelvin,⁷ Roland Somogyi,⁸ Larry D. Greller,⁸ Robert S. Balderas,⁹ Peter Wilkinson,¹ Jim Tartaglia,¹⁰ Elias K. Haddad,^{1-3,11,§} Rafick-Pierre Sékaly^{1-3,11,12§}

¹Laboratoire d'immunologie, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM) Saint-Luc, 264 René-Lévesque Est, Montréal, Québec, H2X 1P1, Canada

²Laboratoire d'Immunologie, département de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada

³INSERM U743, CR-CHUM, Université de Montréal, 264 René-Lévesque Est, Montréal, Québec, H2X 1P1, Canada

⁴Emory Vaccine Center, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia 30322, USA

⁵CANVAC, 5160 Décarie, bureau 790, Montréal, Québec, H3X 2H9, Canada

⁶Biologics and Genetic Therapies Directorate, Health Canada, Tunney's Pasture, Ottawa, Ontario, K1A 0K9, Canada

⁷Toronto General Research Institute, University Health Network, Toronto, Ontario M5G 2M9, Canada

⁸Biosystemix, Ltd, Sydenham, Ontario K0H 2T0, Canada

⁹BD Biosciences, 10975 Torreyana Road, San Diego, California 92121, USA

¹⁰Aventis Pasteur, Ltd., Toronto, Ontario, M2R 3T4, Canada

¹¹Department of Microbiology and Immunology, 3775 University Street, McGill University, Montréal, Québec, H3A 2B4, Canada

¹² Corresponding author

*§ These authors contributed equally to the manuscript.

Correspondence should be addressed to R.P. Sékaly 

Keywords: correlates of protection, vaccine, systems biology

3.1 Corps du travail

Correlates of immune mediated protection to most viral and cancer vaccines are still unknown. This has constituted an impediment to the development of novel vaccines to incurable diseases such as HIV and cancer. While humoral immunity is clearly the dominant correlate of protection for vaccines against bacterial pathogens^{1,2}, viruses or tumors require a more complex immune response with contribution from both T and B cells^{3,4}. Innate immunity, which is known to shape the development of adaptive immune response, could also contribute to vaccine-mediated protection through mechanisms yet to be defined⁵. In this study, we have used functional genomics and polychromatic flow cytometry to define the signature of the immune response to the yellow fever (YF) vaccine 17D (YF17D) in a cohort of twenty volunteers followed for up to one year after vaccination. We show that immunization with YF17D leads to an integrated immune response that includes several effector arms of innate immunity including complement, B cell responses and a mixed Th1/Th2 response; development of these responses is preceded by the coordinate up-regulation of mRNA transcripts for specific transcription factors (STAT-1, IRF-7, Ets-2) that are upstream of the different effector arms of the immune response. Our analysis allowed us to establish that the inflammasome transcriptional pathway is associated with viral load control, while the IL-2 transcriptional pathway correlates with broad and potent CD4⁺ T cell responses. The results described herein clearly show that a strong vaccine is associated with a broad, polyfunctional and persistent immune response that integrates all effector cells of the immune system.

Developed empirically in the 1930s, the live attenuated vaccine YF17D is considered one of the most successful vaccines ever made⁶; a single dose can confer protective immunity for up to 35 years, in almost all vaccinated individuals. Although a clear role was demonstrated for a neutralizing humoral immune response in the protection against YF infection following vaccination, contributions from other arms of the immune response, including cellular and innate immunity, remain understudied.⁶ Moreover, there is a paucity of information regarding the qualitative and quantitative properties of

emerging protective responses *in vivo* in humans and this has been a major impediment to vaccine development^{7,8}. We have used an unbiased systems biology approach to identify the emerging protective immune response induced by YF17D and ultimately the correlates of protection in YF vaccination. RNA samples obtained from whole blood of YF17D-vaccinated individuals on the day of vaccination (Day 0) and at several time points post-vaccination (Days 3, 7, 10, 14, 28 and 60) were amplified and hybridized onto Illumina chips and analyzed. Expression profiles of 594 genes (Supplementary Document 1) were found to change significantly between Day 0 and any time point post-vaccination (with $p < 0.05$ and fold change < -1.3 or > 1.3). The peak of modulation of gene expression, as shown by heat map representation (Figure 1a) and principal component analysis (PCA; Figure 1b) primarily occurred at Days 3 and 7 post-vaccination, while a limited number of significant genes were modulated in response to vaccination at Day 10 post-vaccination or beyond (Figures 1a and b).

Gene set enrichment analysis identified transcription factors with predicted⁹ target genes showing a specific modulation after YF17D vaccination (Figure 1c and Supplementary Figure 1). With this approach, three major nodes of transcriptional regulation of downstream target genes were visualized as soon as Day 3 (IRF7^{10,11} and STAT1¹²) and Day 7 (Ets2¹³), and were most prominently involved in this master switch regulation. Other nodes of transcription factors (IRF-1, IRF-8, GATA6, GATA1, TAL1, FOXO3a, E2F4, E2F1, LMO2, SRF and CEBP8) also controlled the expression of several of the genes and pathways that were modulated in the first week following immunization (Figure 1c and Supplementary Document 1). This early response was highly integrated, as several of the downstream target genes were coordinately regulated by these transcription factors. IRF-7 and STAT-1 play a major role in the regulation of interferon responses as well as other innate immune responses, including dendritic cell (DC) maturation^{14,15}. Several of the target genes of these transcription factors (STAT1 and IRF7) were up-regulated as early as Day 3 (Figure 1d and Supplementary Document 1); moreover genes downstream of the TLR pathway (TLR7, MYD88, and IRF-7) were up-regulated, leading to the activation of the interferon pathway, as monitored by the induction of several interferon-induced genes (IFI27, IFI30, G1P2, G1P3, OAS1-3;

Figure 1d and Supplementary Document 1). In addition to being potent immune modulators, Type I interferons induce the expression of genes leading to viral RNA degradation, including ISG20, OAS1, OAS2, OAS3, and inhibition of viral replication, such as MX-1, MX-2, ADAR and EIF2AK2; these genes were all up-regulated following YF17D vaccination (Supplementary Document 1). Induction of TLR genes is critical for DC maturation and priming of naïve T cells, and for the subsequent production of effector molecules and cytokines¹⁶. Strikingly, components of the complement system (C1QA, C1QB, C3AR1 and SERPING1), which is downstream of the TLR activation cascade¹⁷, were found to be up-regulated early after vaccination (Figure 1e). Distinct components of the complement pathway have been shown to be essential in the development of humoral and cellular immunity to another flavivirus, the West Nile Virus^{18,19}.

The Ets2 node is also involved in this highly integrated response, as we can observe the up-regulation of several downstream genes that play a critical role in the maturation and differentiation of T cells, B cells, natural killer (NK) cells and macrophages²⁰⁻²². Indeed, several antigen-presenting cell-specific genes, targets of Ets2, were up-regulated early after vaccination, including CD86 (a marker of DC maturation; Supplementary Document 1), and CSF1R, MARCO and IFI16, which are expressed by cells of the monocyte-macrophage lineage (Figure 1f). The role of Ets2 in the early induction of innate immunity was further demonstrated by the increased expression of the NK cell receptors KIR2DL3 and KIR2DL4, as well as the cytolytic molecules perforin (PRF1), granulysin (GNLY) and granzyme B (GZMB) (Figure 1c and g); KIR2DL3, PRF1 and GZMB are known targets of members of the Ets family of transcription factors^{13,23,24}. Hence, several components of the innate immune system are up-regulated, most probably the result of TLR ligation by YF17D²⁵, possibly resulting in the development of a strong and diverse adaptive immune response.

The transcription factors STAT-1 and STAT-2, which play a central role in Th1 and Th2 phenotype differentiation²⁶, were up-regulated by Day 3 and maintained a high level of expression for at least 10 days upon vaccination (Figure 1h and Supplementary

Document 1). Their target genes, encoding the chemokines and chemokine receptors CXCL10 (IP-10), CCL8, CX3CR1 and CCR1, were also induced; these molecules are mostly involved in the recruitment of pro-inflammatory or Th1 cells to sites of viral replication²⁷. The Th2-associated gene TNFSF10 (TRAIL) was also up-regulated and is known to induce CCL20 expression and promote the differentiation of Th2 cells²⁸. INDO, an anti-inflammatory protein whose expression affects Th2 cytokine production²⁹ was also elevated. We also observed the induction of the IL-1R antagonist, IL1RN, which biases immune responses towards a Th2 phenotype³⁰. Interestingly, IL1RN expression is mediated by STAT-1 and STAT-2^{31,32}, further confirming the significance of a regulated network early following YF17D vaccination. Induction of the Th2 pathway is essential to the development of humoral immunity; in that context, we also noted the induction of several B cell-specific genes, including POU2AF1, a transcription factor that is essential for mature B cell differentiation³³, and CD19, TNFRSF13B (BAFF) and TNFRSF17 (BCMA) (Figure 1i). These genes are critical for B cell survival, persistence and isotype switching³⁴⁻³⁶. Late induction of B cell-associated genes (Days 10 and 14) coincided with the onset of antibody production (Supplementary Table 1).

YF17D vaccination led to the proliferation and expansion of NK cells ($p = 0.0474$), T cells ($p = 0.0049$ for CD4⁺ and $p = 0.0157$ for CD8⁺) and non-T cell PBMC (monocytes and B cells; $p = 0.009$), as shown by the significant increases in frequencies of Ki67⁺ cells within the first few days following vaccination (Figure 2 a - e and Supplementary Figure 2). This proliferation stems from the induction of a large network of transcription factors all known to regulate cell proliferation and differentiation (Figure 1c). These factors include E2F4 and its transcriptional targets (ATF5^{37,38} and NELL2^{39,40}), known to regulate cell cycle progression in immune cells, as well as SRF and LMO2, whose targets include BCL6. BCL6, a transcription repressor gene whose expression is downregulated after YF17D vaccination, has been shown to inhibit the expression of CD40⁴¹ and to prevent the formation of germinal centers and memory B cell differentiation.

Induction of memory cells is a hallmark of vaccination;¹ we have recently shown that the down-regulation of transcriptional activity of the forkhead box protein family member FOXO3a is critical for the induction and long-term maintenance of memory T cells⁴². Inhibition of FOXO3a pathway is confirmed by the down-regulation of several of the FOXO3a target genes involved in ubiquitination (TBL1X⁴³ and UBE2H⁴⁴), providing evidence for the initiation of memory T cell differentiation occurring within the first week following vaccination. We did not observe the induction of regulatory T cells nor Th17 cells at these early time points (data not shown). These results clearly show that, at the transcriptional level, vaccination with YF17D induces the coordinate and early up-regulation of several transcription pathways, resulting in the proliferation and differentiation of several immune effector cells, and leading to a broad and integrated immune response. This response includes a strong and complex innate immune response, the differentiation of mixed Th1/Th2 populations, a B cell response, and the generation and establishment of memory T and B cells.

To validate functionally our gene array data, we next assessed the amplitude, breadth and persistence of the YF17D-specific T cell response. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) sampled at Day 60 post-vaccination were incubated in the presence of each of 22 YF17D-derived peptide pools, and their proliferation was measured by CFSE labeling (Figure 2f bar graphs and Supplementary Figures 3a and b). The CD4⁺ T cell proliferative response was highly variable among vaccinated volunteers. Strong responders (notably YF001 and YF020) recognized almost if not all the peptide pools, while weak responders (YF005, YF011 and YF017) recognized only a few. Of note, both CD4⁺ and CD8⁺ T cell peptide-specific responses were persistent, as memory proliferative responses to the most immunodominant peptide pools were detected as long as one year after immunization (data not shown). To validate the development of Th1/Th2 responses in YF17D-vaccinated subjects, we determined, using cytometric bead assay (CBA), the cytokine profile produced by PBMC following stimulation with YF17D-derived peptide pools. The levels of the Th1 cytokines IL-2, IFN- γ and TNF, and the Th2 cytokines IL-4 and IL-10 were assessed. Figure 2f shows CBA results for six selected volunteers (heat maps); a summary of the CBA results for all volunteers and

pools tested can be found in Figure 2g. The qualitative and quantitative features of cytokine production were highly variable; pool 3 stimulated a mixed Th1/Th2 response in volunteer YF001, but triggered only a Th1 response in YF002, 3, 9, and 20, while no detectable response to this pool could be seen in YF019. In most volunteers (12 out of 15), both Th1 and Th2 cytokine secretion profiles were induced by YF17D peptide pools, providing validation at the protein level of the results observed by gene array that the YF17D vaccine induces a global mixed Th1/Th2 response. Three volunteers (YF0014, 15 and 16), who were weak responders to the vaccine as measured by T cell proliferation, did not show a mixed Th1/Th2 profile; these individuals were still able to mount very good antibody responses (Supplementary Table 1). The early Th1/Th2 commitment following vaccination (Days 3 and 7), suggested by the induction of transcription factors, was further confirmed by performing gene array analyses on PBMC stimulated *ex vivo* with peptide pools known to induce cytokine production at later time points (Figure 2h, Supplementary Document 2). The list of modulated genes in these samples was compared to our Th1/Th2 gene set (Supplementary Document 3). Interestingly, Th1/Th2 transcriptional profiles could be observed as early as Days 3 and 7 in *ex vivo*-stimulated PBMC, confirming the whole blood gene array results. Of note, we could observe gene modulation of Th1 (IFN- γ , IL-18, TNF) and Th2 (IL-6) cytokines, Th1 (CCL2, CCL8, CXCL9, CXCL10) and Th2 (CCL22) chemokines, Th1 (IL18R1) and Th2 (FCER1G, TNFSF10) -associated receptors, and Th1 (IRF-1) and Th2 (SOCS3, INDO) -associated signal transduction or transcription factors. These results clearly demonstrate the early imprinting of the Th1/Th2 polarization program already within 3 days following immunization.

The persistence of the Th1/Th2 phenotype was confirmed by analyzing the transcriptional profile of the YF17D-specific immune responses after *in vitro* stimulation of PBMC sampled at Day 365 post-vaccination. We stimulated the PBMC *ex-vivo* with immunostimulatory YF17D peptide pools (as identified in Supplementary Figures 3a and b) for 6 days to expand the antigen-specific T cells, and then re-stimulated the cells (or not) with the same pools. Supernatants were harvested for cytokine analysis, and cells were processed for microarray analysis. The first peptide-specific stimulation

induced the up-regulation of several Th1 genes (Figure 2i and Supplementary Document 2), including IL-18 and its receptor, which are critical for IFN- γ production⁴⁵ and for commitment to the Th1 lineage. It also led to the up-regulation of several Th2-associated genes, including TNFSF10 and its ligand CCL20. The re-stimulation of these cells enhanced the transcription of a similar gene expression pattern (Figure 2i). The reproducibility of the Th1/Th2 mixed responses in five different volunteers (11 distinct pools) confirms the specificity of the response to the YF17D vaccine. Several peptide pools induced both Th1 and Th2 responses, which can be explained by the fact that peptide pools can contain more than one immunogenic epitope. These data show that the mixed Th1/Th2 phenotype dictated by YF17D persisted for at least one year post-vaccination. Identification of transcriptional nodes, using independent component analysis and gene set enrichment (Figure 3), revealed the enhanced activity of STAT-1 and IRF-1, already identified at Days 3 and 7 post-vaccination, and provided further confirmation of the critical role of innate immunity in shaping the adaptive immune response. Importantly, the Th1/Th2 results were confirmed by our CBA data (Supplementary Figure 4), as we were able to detect both Th1 and Th2 cytokines in culture supernatants. Altogether, our results clearly demonstrate, using two different approaches, that YF17D induces persistent mixed Th1/Th2 immunity (Supplementary Table 2).

To determine if gene expression signatures generated early after vaccination (7 days) were associated with the breadth and magnitude of a CD4⁺ T cell response, we identified the transcriptional signatures associated with strong and broad CD4⁺ T cell response (Figure 4a, b and Supplementary Document 4). As noted earlier, vaccinated subjects showed great heterogeneity in the breadth and amplitude of the CD4 response. A specific gene expression signature was associated with broad CD4 responses and interestingly, it encompassed the up-regulation of genes that are downstream of the signal transduction pathway leading to IL-2 production in activated T cells, as monitored by increased expression of PRKD2 and SH2D3C^{46,47}. IL-2 is critical to the maintenance of memory T and B cells as well as NK cells; moreover, increased IL-2 production has been associated with strong memory T cell responses^{42,48,49}. We also observed the up-

regulation of NIBP and INPP5D (SHIP-1), both positive regulators of the NF- κ B pathway associated with T cell survival^{50,51}. The NF- κ B pathway also plays a critical role in DC maturation and survival⁵² and NK cell survival⁵³, further supporting the contribution of multiple cell lineages in the immune response to YF17D. Persistence of memory T cell responses, which we and others have shown to be critical to a more favorable prognosis of HIV infection^{49,54}, is clearly dependent on the induction of IL-2 and survival pathways such as NF- κ B.

Marked heterogeneity was also observed in the capacity of vaccinated individuals to control viral load (Supplementary Table 3). To determine whether specific gene expression signatures were associated with control of viral replication, we assessed transcriptional profiles of “high” (n=3) and “low” (n=4) viremic subjects using unsupervised cluster analysis. Control of viremia was associated with a strong innate immune response, as we observed the up-regulation of interferon-induced genes (IFIT3 and OASL; Figure 4c, d and Supplementary Document 4), as well as the increased expression of several components of the inflammasome⁵⁵, including IL1B, TLR4, and CASP5 (Figure 4e and Supplementary Document 4). Expression of the IL-1B decoy receptor, IL-1R2, was higher in aviremic vaccinated volunteers, most probably the result of a negative feedback loop. The inflammasome was recently shown to constitute a critical effector arm of the protective innate immune response to viral infections^{56,57}. Interestingly, IL-1, an effector molecule of the inflammasome, is also known to regulate the balance between Th1 and Th2 responses⁵⁸. Moreover, polymorphisms in the IL-1 gene have been linked to smallpox vaccine-mediated protection⁵⁹. Up-regulation of the inflammasome leads to the development of a strong innate immune response that controls viral load, and which could in turn foster the generation of mixed Th1/Th2 adaptive immunity.

Our results also highlight the critical role of innate immunity in the elicitation of the multilienage and broad immune response observed herein, and demonstrate the complexity of the innate immune response that is generated upon vaccination with YF17D. Indeed, several effector molecules of the innate immune response, including

complement, interferons, the inflammasome, as well as several effector cells of innate immunity (i.e. macrophages, NK cells and DCs, the latter being most likely the producers of type I interferons⁶⁰), are involved in this early response (Day 3 and 7). Control of viral replication happens as this innate response precedes the emergence of YF17D-specific humoral and cellular immune responses (Supplementary table 3). Interestingly, complement, interferons and the inflammasome, which are all downstream of TLR signaling, can all impact on the quality of the adaptive immune response and trigger Th1/Th2 mixed immune responses⁵⁷. Of note, YF17D triggers TLR-2 which is upstream of the Th2 pathway⁶¹ and TLR-7 and 9 which trigger mostly the Th1 pathway^{62,63}. Our studies have also revealed that cellular responses (including CD4 and CD8) preceded B cell responses, as monitored by the detection of antibodies in serum of vaccinated subjects as well as of the identification of gene expression signatures specific to B cell responses (Supplementary Table 1 and Figure 1i). An important outcome of the early development of Th2 CD4 T cells is the generation of a strong antibody production. As for CD8 responses, they will certainly provide long lasting protection against re-exposure to the virus. In that context, it will be important to compare the immune response described herein to that of individuals that have been re-exposed to the virus, i.e individuals who live in endemic areas or those who get re-immunized with the vaccine.

A thorough assessment of the YF17D vaccine-specific T cell response and viral load revealed variations in the strength of the T cell response and in the degree of control of viremia amongst vaccinated volunteers. Individuals who mounted poor CD4 responses were still able to mount good humoral responses (Supplementary Figure 3a and Supplementary Table 1). These individuals are however all protected against subsequent YF infection as YF17D is known to be one of the most efficient vaccines available⁶. Our results indicate that the qualitative features of the CD4 response (mixed Th1/Th2 immunity) and not its breadth are involved in YF17D mediated protection. The multilineage and polyfunctional nature of this protective immune response is the result of the induction of an orchestrated cascade of tightly regulated network of transcription factors, signaling and effector molecules.

Results described herein identify unique features of protective immune responses which can now be used as benchmarks to design and monitor the development of novel vaccines. They demonstrate the complexity of this immune response and they highlight the fact that it is the sum of all arms of the immune response that is most probably required for the long-lasting protection induced by this vaccine; and they highlight the fact that it is this integrated immune response that constitutes the correlates of protection. In that context systems biology becomes an essential tool to identify correlates of immune mediated protection. The recent failure of the STEP HIV vaccine trial paves the way to the use of new immune monitoring strategies focused on the identification of multilineage and polyfunctional features of candidate vaccines-induced immune response.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Vaccination of human volunteers and blood collection

The volunteer recruitment and vaccination protocol for this study was approved by the ethics committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Twenty volunteers (4 men and 16 women) from the Montréal area (Supplementary Table 4) were recruited for this study *via* ads published in newspapers and word-of-mouth. To be included in the study, candidates had to be between 18 and 40 years of age and in good health, as well as having no previous exposure to the YF vaccine, not being pregnant or planning to be within the next year, not being immunocompromised or being in close proximity with such people, and having no allergies to eggs. Each recruited subject received a single 0.5 ml subcutaneous injection of the Sanofi-Pasteur 17D-204 live-attenuated YF virus vaccine (YF-VAX[®]). On the day of vaccination (Day 0) as well as 3, 7, 10, 14, 28, 60, 90, 180 and 365 days thereafter, 50 ml of blood were drawn from each volunteer in sodium-heparinized Vacutainer tubes (Becton Dickinson), and PBMC were isolated from these samples using standard Ficoll-Paque Plus (Amersham) density

gradient centrifugation. Cells were cryopreserved in bovine serum + 10% DMSO in liquid nitrogen. At each abovementioned time point, 10 additional milliliters of blood were collected from each volunteer in PaxGene tubes (Qiagen), for whole blood RNA isolation and analysis by DNA microarray. Viremia and YF17D-specific seroconversion were determined as described in Supplementary Tables 3 and 1, respectively.

3.2.2 Gene array analysis of whole blood

Whole blood total RNA was purified from Paxgene tubes using RNA extraction kits (Qiagen). Quantification was performed using a spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and RNA quality was assessed using the Experion automated electrophoresis system (Bio-Rad). Total RNA was then amplified and labeled using the Illumina TotalPrep RNA Amplification kit, which is based on the Eberwine amplification protocol⁶⁴. This protocol involves a first cDNA synthesis step followed by *in vitro* transcription for cRNA synthesis. The biotinylated cRNA was hybridized onto Illumina Human RefSeq-8 BeadChips v2 at 58°C for 20 hrs and quantified using Illumina BeadStation 500GX scanner and Illumina BeadStudio v3 software.

Illumina probe data were exported from BeadStudio as raw data and were screened for quality. Samples failing chip visual inspection and control examination were removed. The R software package was used to quantile-normalize the probe intensities, filter probes with intensities below background in all samples, and to minimum-replace (a surrogate-replacement policy) values below background using the mean background value of the probe controls determined from the microarray quality controls to reduce noise and reduce ‘over inflated’ expression ratios determined in subsequent steps. The resulting matrix showing probes as rows and samples as columns was \log_2 transformed and used as input for linear modeling using BioConductor “Linear models for microarray analysis” (LIMMA). The LIMMA package⁶⁵ was used to identify differentially expressed genes at Days 3, 7, 10, 14, 28, and 60, compared to Day 0 (moderated *t*-statistic <0.05 and fold change < -1.3 or >1.3). To assess differences between high/low viremia and strong/weak CD4⁺ T cell response classes, preprocessed

intensities of Day 7 samples were normalized to Day 0. Difference in response post-vaccination was evaluated between low viremia (YF008, YF017, YF019, YF020) and high viremia (YF011, YF013, YF016) volunteers, and between strong (YF009, YF013, YF018, YF020) and weak (YF008, YF011, YF015, YF016, YF017) CD4⁺ T cell responders. The group comparisons were also performed using LIMMA. In each case, genes with a fold change <-1.3 or >1.3 and p -value < 0.05 were considered significant. The lists were then filtered to exclude probes having a Day 7/ Day 0 fold change below 1.3 in the two groups being compared to avoid false positives. The resulting lists were used for PCA and hierarchical clustering using R packages *made4*⁶⁶ and *gplots*, respectively. Microarray data is available through National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO).

3.2.3 Identification of transcription factors

Transcription factors were identified using Independent Component Analysis (ICA) and gene set enrichment as described in Teschendorff *et al.*⁶⁷ ICA was performed on the expression profiles of the whole blood gene arrays on each day individually as well as on the whole data set. The CRAN package *fastICA* (v1.1-9) was used to carry out the ICA. Genes in each component were chosen for enrichment by selecting genes with loads below the 2.5th percentile or above the 97.5th percentile. Gene set enrichment was done on the C3 collection of MsigDB.^{9,68} The resulting p -values were Benjamini-Hochberg adjusted to keep the false discovery rates within each component below 5%. Only records annotated with known transcription factors that were differentially expressed between day 3 and day 14 were kept. A second ICA and gene set enrichment was done on the gene array data on ex-vivo stimulated PBMC, using both stimulated and re-stimulated samples. Due to the small sample sizes in the individual classes, statistical testing for differential expression was not possible. Instead candidate transcription factors and presumed target genes had to be modulated 1.3 fold in at least twenty samples compared to the unstimulated reference.

3.2.4 Flow cytometric analysis of Ki67⁺ cells in various blood cell populations

Two million PBMC were stained for 30 minutes at 4°C with the surface-specific antibodies anti-CD3 Alexa 700, anti-CD4 AmCyan and anti-CD8 PE Texas Red. They were then fixed with FACS Lysis solution (BD Biosciences), and intracellular Ki67 was stained with anti-Ki67 FITC (BD Biosciences) for 20 minutes at room temperature, in the presence of 0.25% saponin (Sigma-Aldrich). Cells were washed in PBS, fixed in 2% formaldehyde and collected on a BD LSRII. A minimum of 1 million events were acquired for each analysis. Data analysis was done using the BD FACSDiva software.

3.2.5 Proliferation and cytokine secretion assays

Cryopreserved PBMC were thawed and labeled with CFSE (Molecular Probes) as previously described⁴⁹. Cells were washed with PBS twice and resuspended at 2×10^6 /ml in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 10% normal human AB serum (HS; Sigma). 2×10^6 cells were incubated in polypropylene snap cap tubes (Falcon) in the presence of YF17D-derived peptide pools (see Supplementary Figure 5) at a final concentration of 2 µg/ml/peptide, SEB (50 ng/ml, Toxin Technology, Sarasota, FL) or nothing (non-stimulated; NS). After 24 hours of incubation at 37°C, 5%CO₂, 120 µl of supernatant was withdrawn from each tube and frozen at -80°C for subsequent cytokine analysis. The same volume of fresh medium was replaced in each tube and five days later (6 days incubation total), the cells were harvested and stained with anti-CD3 Pacific Blue, anti-CD4 AmCyan (BD Biosciences) and anti-CD8 PE Texas Red (CalTag). Fluorescence data were collected on a BD LSRII flow cytometer and the results analyzed using the BD FACSDiva software (BD Biosciences). The BD Th1/Th2 CBA array (BD Biosciences) was used to measure levels of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ and TNF in PBMC supernatants, as suggested by the manufacturer. The event acquisition was done on a BD LSRII flow cytometer and the results analyzed using the BD FCAP CBA array analysis software (BD Biosciences).

3.2.6 Gene array on ex-vivo stimulated PBMC

PBMC were re-suspended at a density of 2×10^6 cells/ml in RPMI + 10% HS, and aliquots of 0.5×10^6 cells were distributed in polypropylene tubes. Selected peptide pools were added to the cells ($2 \mu\text{g/peptide/ml}$), and the cultures were incubated at 37°C , $5\% \text{CO}_2$ for 6 hours. Cells were harvested by centrifugation, washed twice in ice-cold PBC and dissolved in RNeasy solution. Total RNA extraction, amplification and hybridization on Illumina Human RefSeq-8 v2 were done as described above. Illumina probe data were exported from BeadStudio and preprocessed in R following the same procedure as above (quantile normalization, minimum replacement, filtering, and \log_2 transformation). Data from re-stimulated and stimulated samples were compared to non-stimulated samples with respect to each individual volunteer. Selected genes were identified when having a fold change < -1.3 or > 1.3 . Microarray data is available through National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO).

3.2.7 Th1/Th2 profile assignment

A list of known Th1 or Th2 - specific genes was derived from literature to create our Th1 and Th2 gene sets (Supplementary Document 3). One-tail Fisher exact test for categorical data was used to assess enrichment for Th1 or Th2 profile in differentially expressed genes (fold change > 1.3 for stimulated versus non stimulated samples). A p -value < 0.05 was considered significant. One-tail test was used since we were only interested in over-representation of the profiles.

3.2.8 CBA on supernatants from ex-vivo stimulated PBMC

Aliquots of 2×10^6 PBMC in 1 ml RPMI + 10% HS were incubated in polypropylene tubes with selected YF17D peptide pools ($2 \mu\text{g/peptide/ml}$), for 6 days at 37°C , $5\% \text{CO}_2$. The cells were then re-stimulated with the same peptide pools for 12 hours, and their

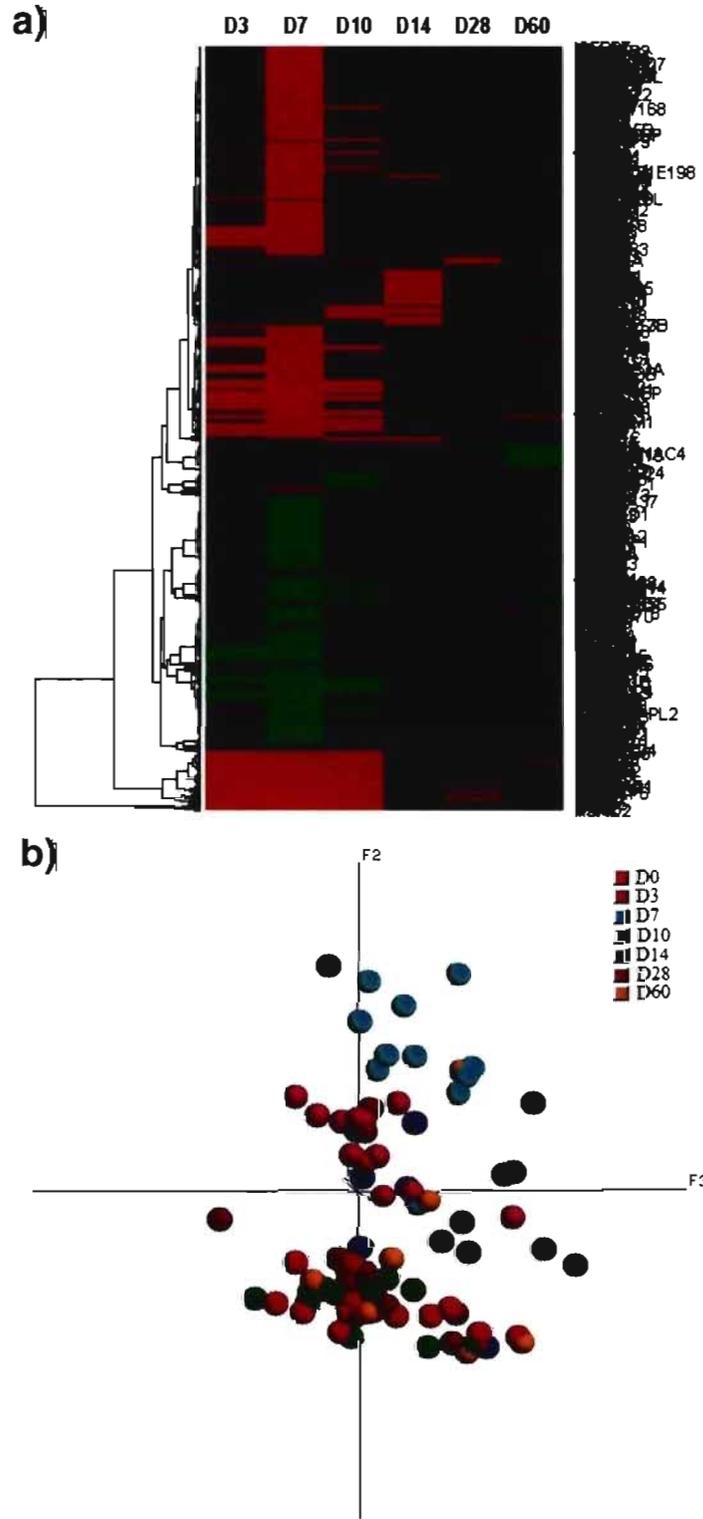
supernatants were collected and analyzed by CBA, as described above, for their content in Th1 and Th2 cytokines.

3.3 Remerciements

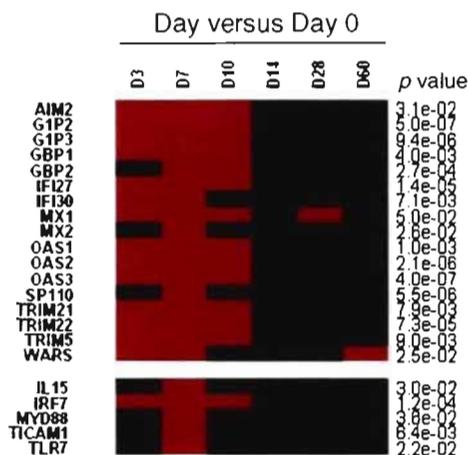
We thank M. Lainesse and R.Bordi for expert technical assistance. D. Gaucher is the recipient of a postdoctoral fellowship from the “Fonds de la recherche en santé du Québec”. R. Therrien is supported by a scholarship from INSERM. This study was supported by funds from Genome Canada, Genome Québec, the Canadian Network for Vaccines and Immunotherapeutics (CANVAC) and the INSERM. R.P. Sekaly is the Canada Research Chair in Human Immunology.

3.4 Figures de l'article

Figure 1.



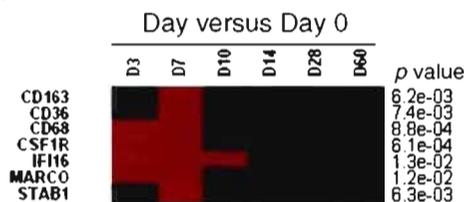
d) Interferon - induced and TLR - associated genes



e) Complement - associated genes



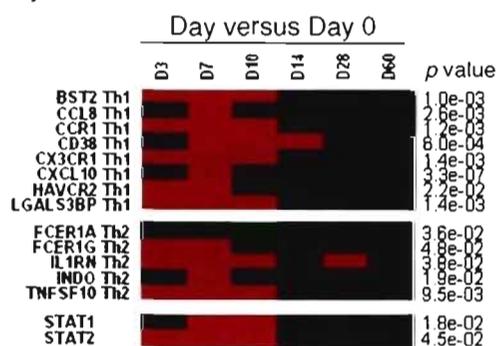
f) Macrophage - associated genes



g) NK cell - associated genes



h) Th1/Th2 - associated genes



i) B cell - associated genes

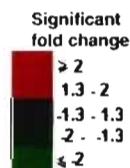
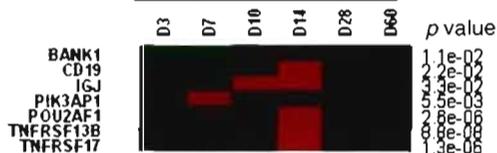
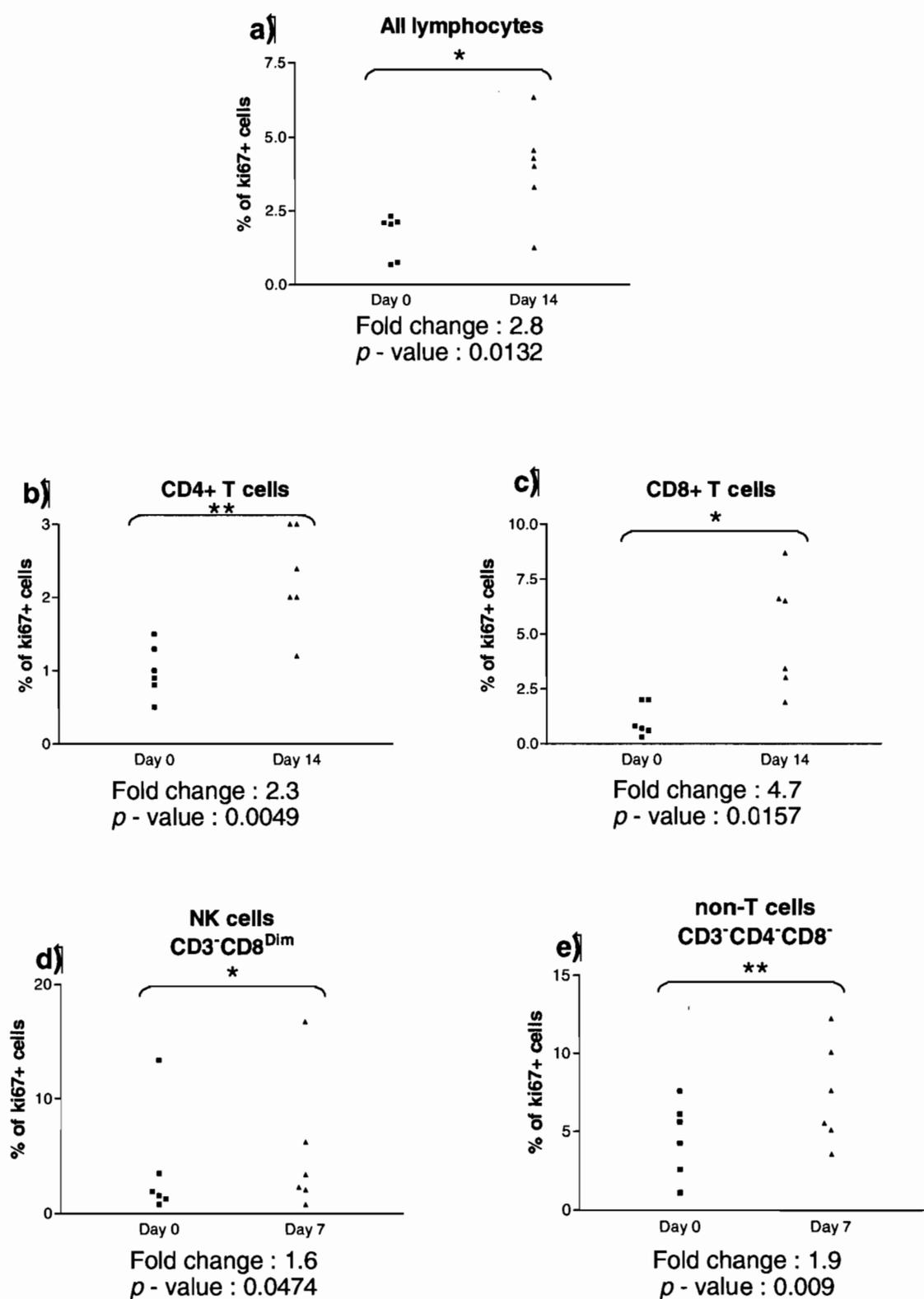
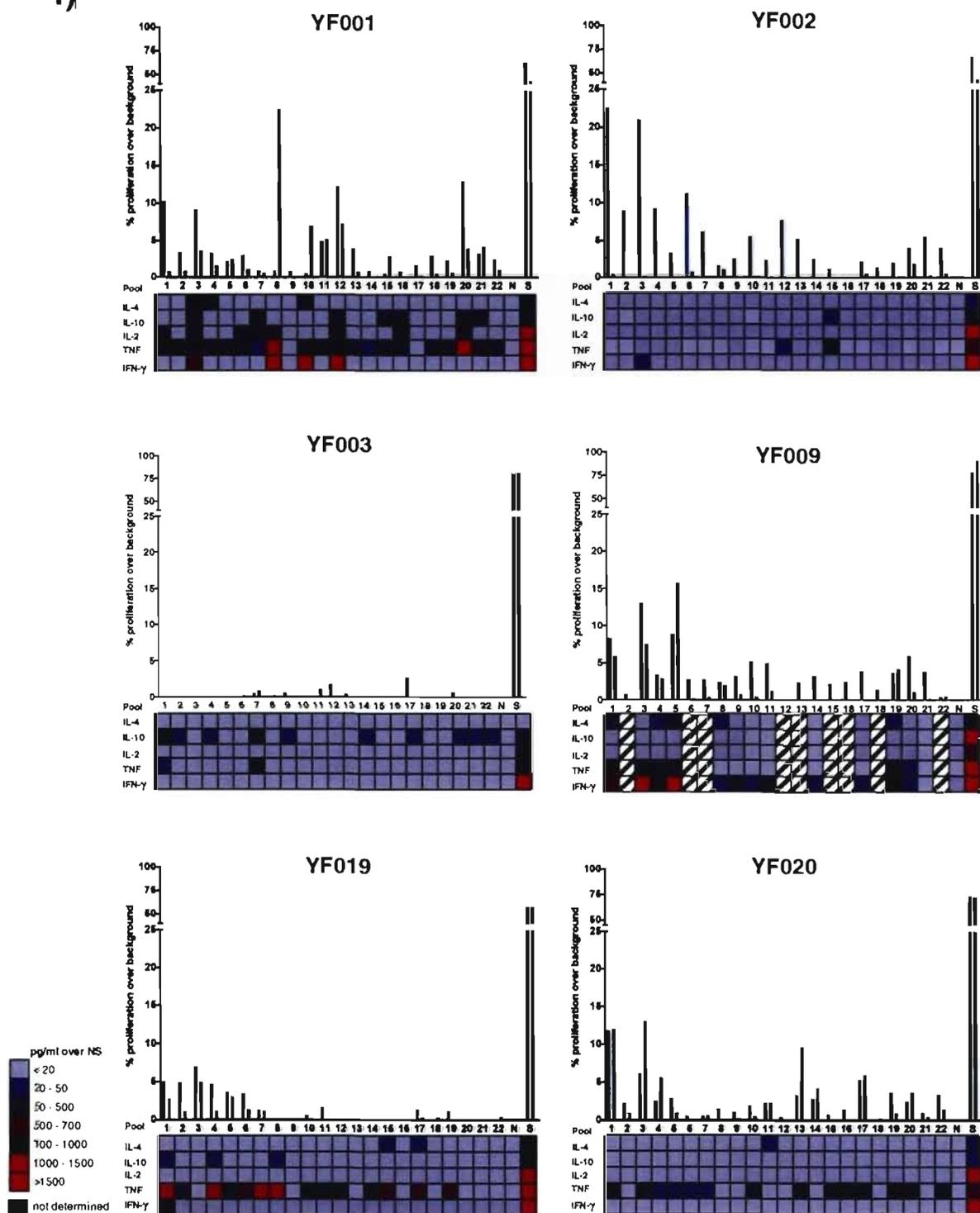


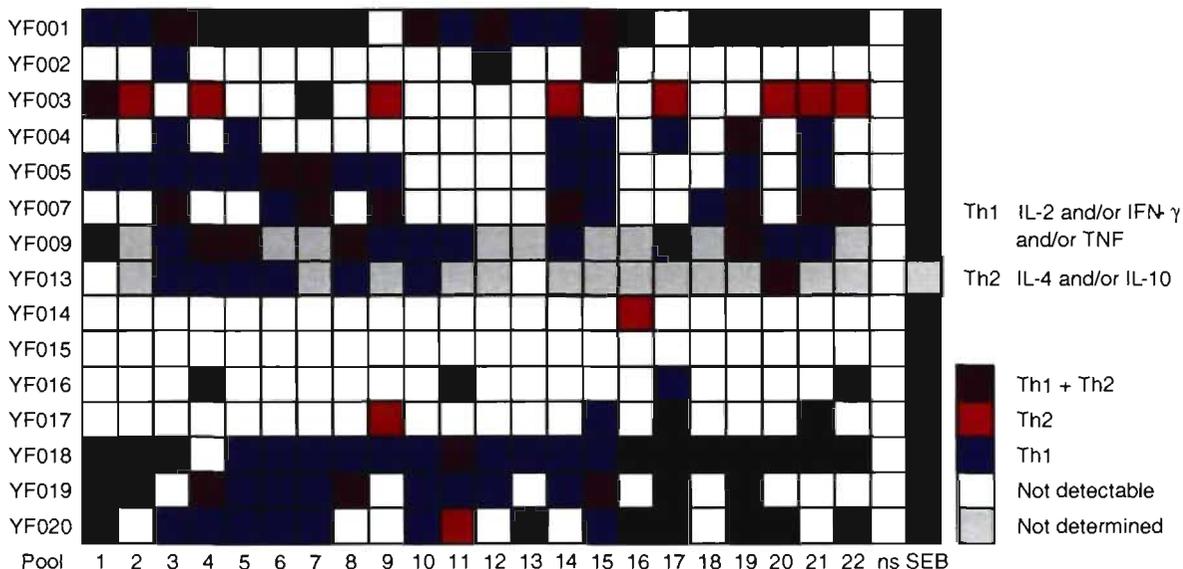
Figure 2.



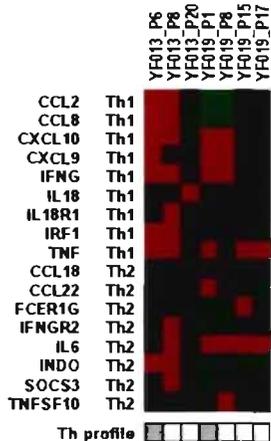
f)



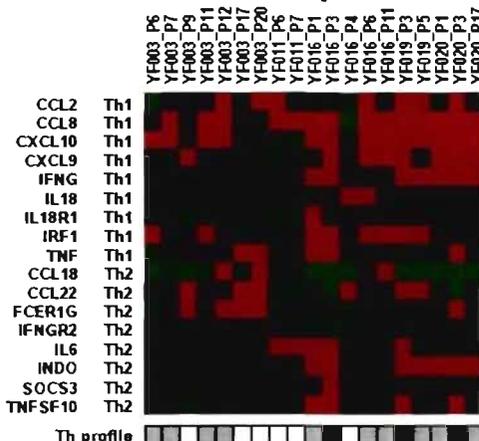
g)



h) Stimulated versus nonstimulated Days 3,7



i) Stimulated versus nonstimulated Day 365



Restimulated versus nonstimulated Day 365

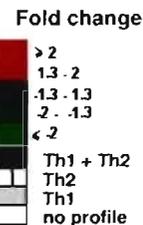
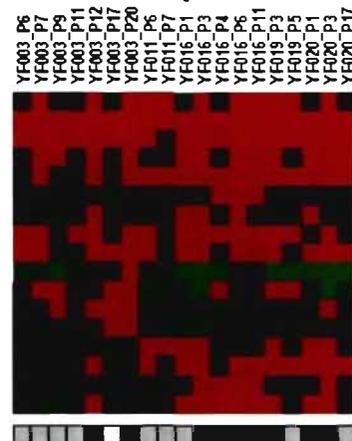


Figure 3.

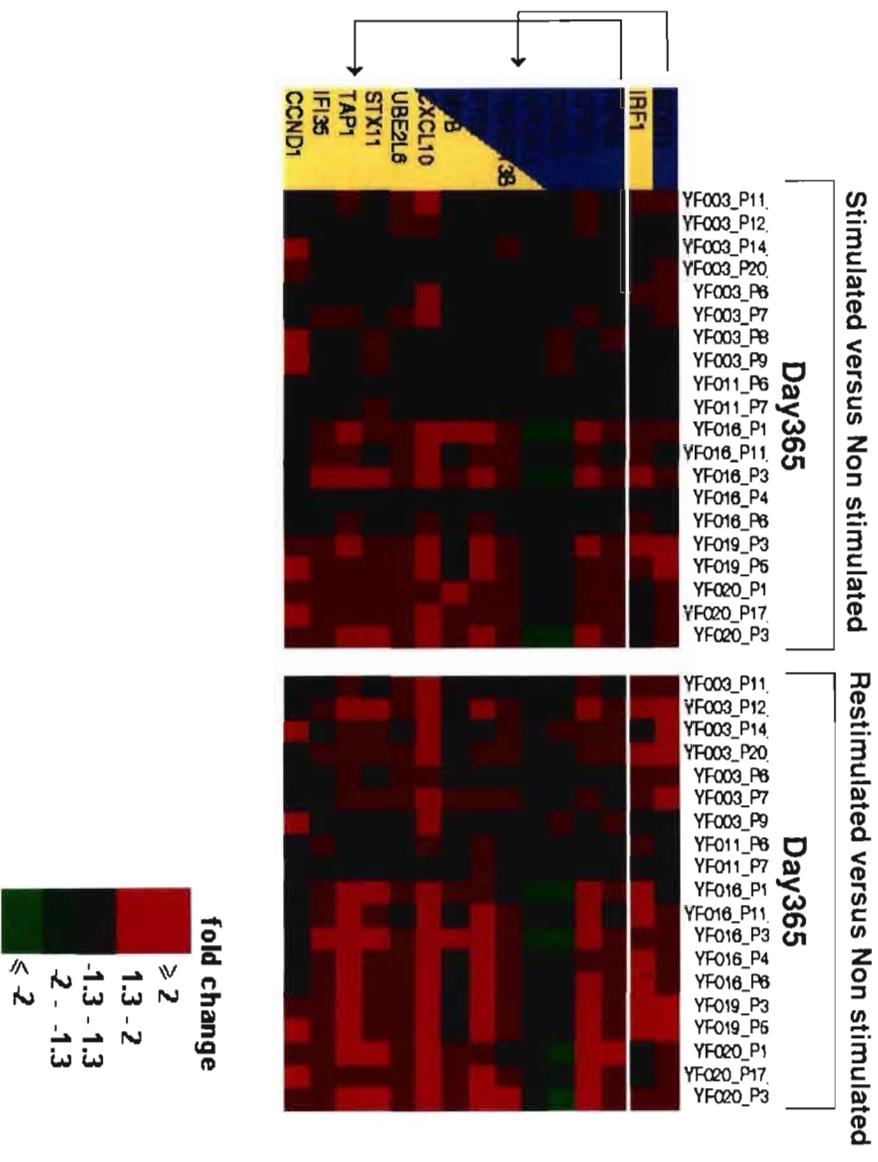
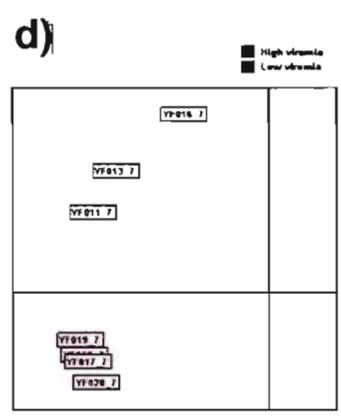
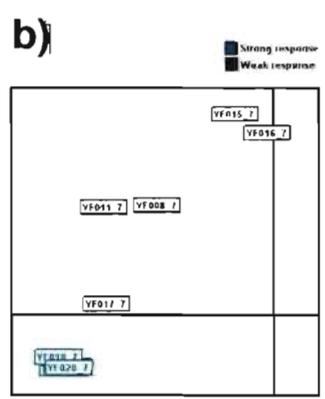
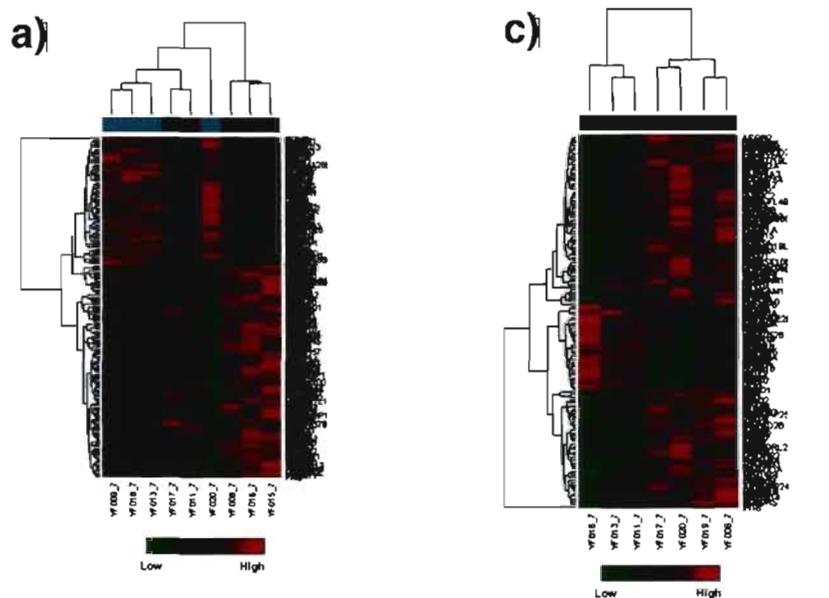


Figure 4.



e) Inflammasome - associated genes

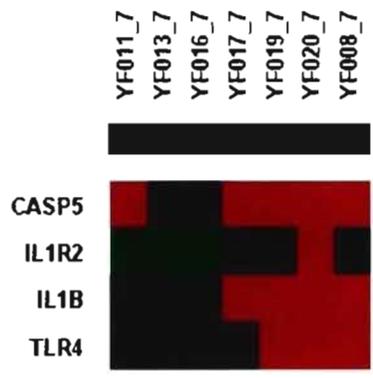
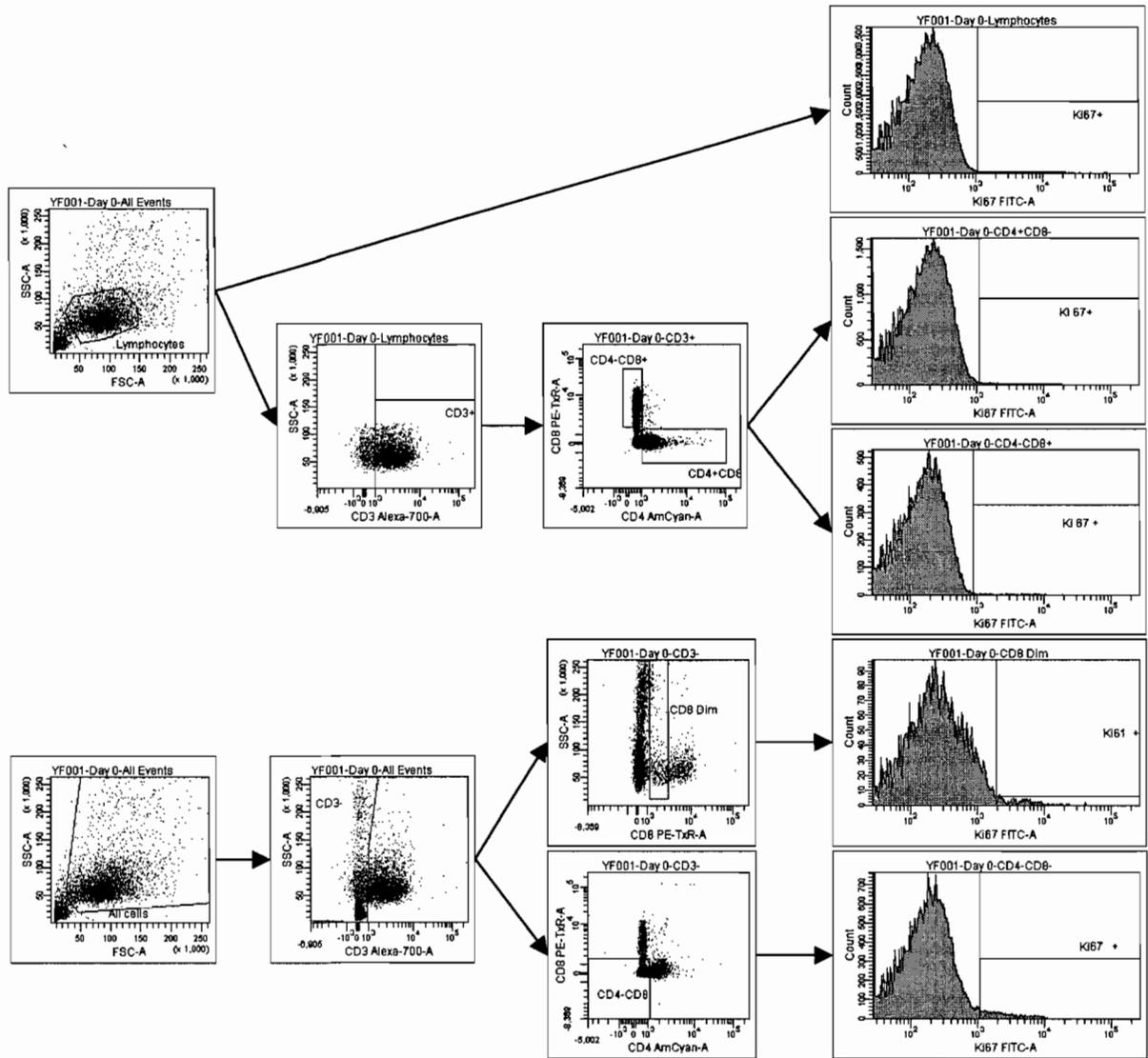


Figure supplémentaire 2.

a)



b)

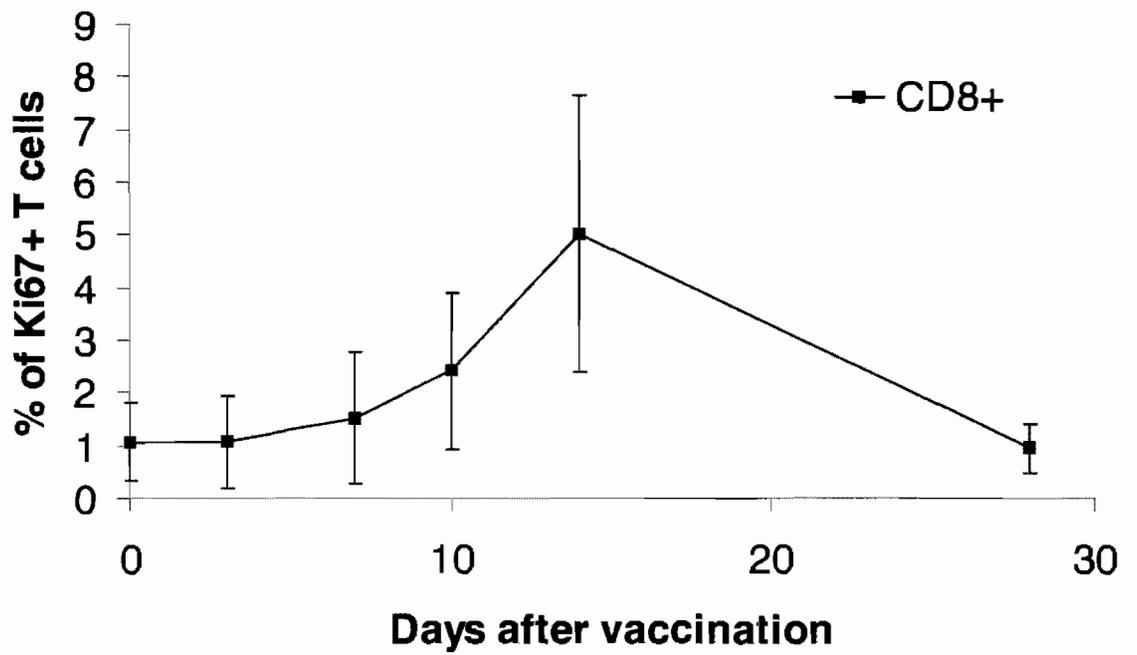
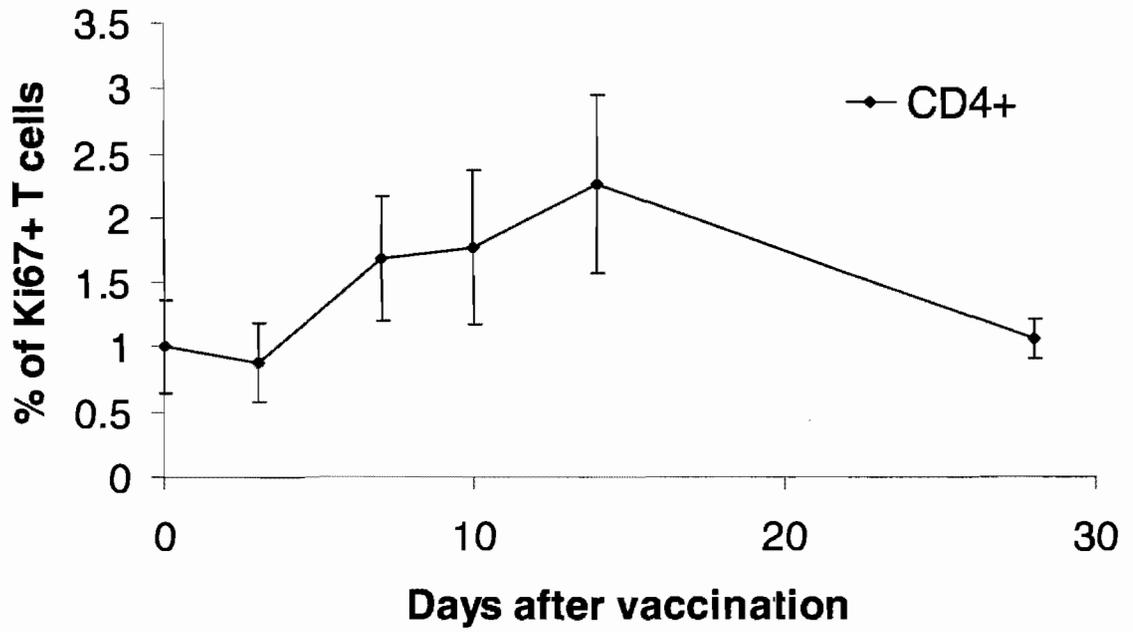


Figure supplémentaire 4.

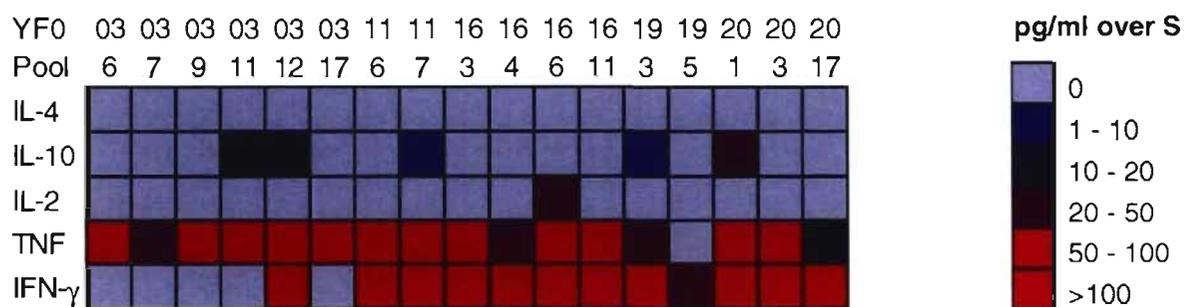


Figure supplémentaire 5.

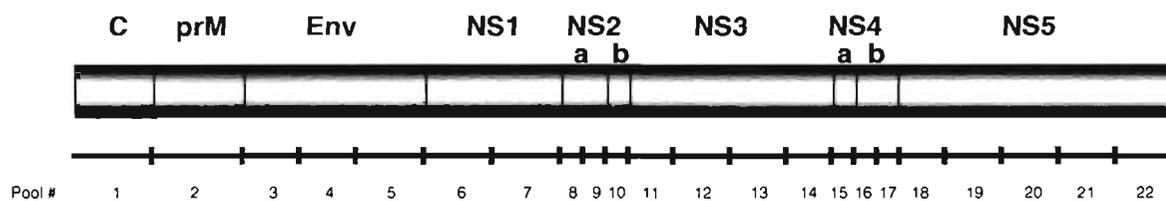
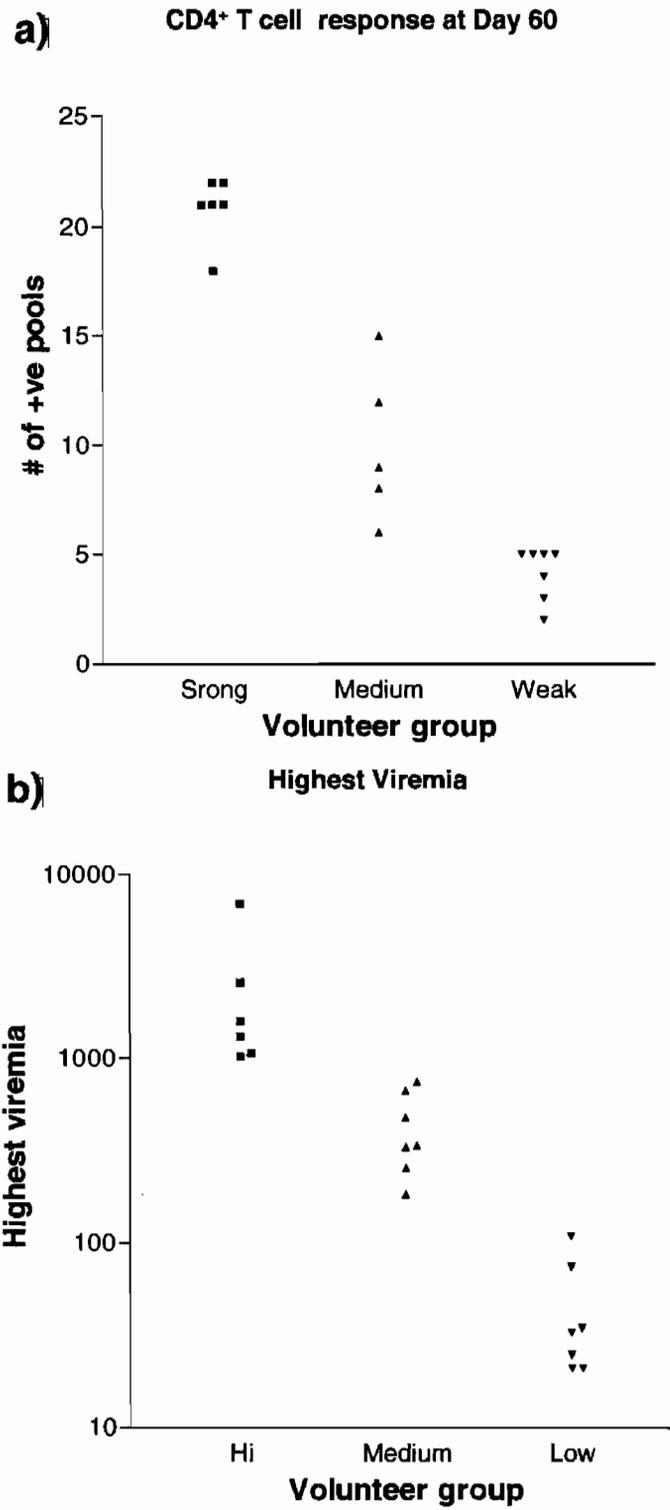


Figure supplémentaire 6.



3.5 Légendes des figures de l'article

Figure 1. Vaccination with YF17D induces early gene transcription. Global view of gene modulation in total blood cells following YF17D vaccination, as analyzed by gene array. Heat map representation (a) and PCA (b) of significantly modulated genes ($p < 0.05$ and fold change < -1.3 (represented in green) or > 1.3 (represented in red)), in at least one comparison versus Day 0. c) Transcriptional network of differentially expressed genes, as inferred by gene set enrichment analysis. Network representation of inferred transcription factors⁹ and predicted target genes that are significantly modulated. Node colors indicate fold change of gene expression between day 0 and day 7, green indicates > 1.3 fold decrease, light red > 1.3 fold increase, and red > 2 fold increase. Grey nodes indicate fold changes < 1.3 in either direction. White nodes indicate genes for which the fold change was not determined. Rectangular nodes indicate transcription factors identified by gene enrichment; parallelogram, hexagonal, octagonal, triangular and diamond shapes indicate genes in the functional categories of Figures 1d-h, respectively. The triangle is used to highlight B cell-associated genes (Figure 1i) as well. IRF-1 and IRF-8 and genes targeted by IRF-1 or IRF-8 but no other transcription factor in the figure were removed to increase readability (see Supplementary Figure 1 for a complete map). d, e and f) Heat map representation of significantly modulated genes falling under different functional categories: d) complement-associated genes; e) interferon-induced and TLR-associated genes; f) macrophage-associated genes; g) NK cell-associated genes; h) Th1/Th2-associated genes; and i) B cell-associated genes. Supplementary Document 3 includes a justification for the attribution of each gene into its respective group.

Figure 2. Yellow fever vaccine 17D induces multifunctional responses. a-e) PBMC sampled at Days 0, 3, 7, 10, 14 and 28 post-vaccination from six volunteers were stained with anti-Ki67 and other specific antibodies to identify distinct cell subsets (see gating strategy in Supplementary Figure 2a). Significant percentages of Ki67-positive cells in each subset were then analyzed by a paired t-test. Data for the most significant time points are presented. Each point represents individual volunteer. * and ** denote p

values less than 0.05 and p value less than 0.01 respectively. f- i) YF vaccination induces a mixed and persistent Th1/Th2 response. f,g) PBMC from Day 60 post-vaccination were stimulated for 6 days with the 22 peptide pools and assayed by CFSE labeling for their proliferative response. f) Bar graphs show data for 6 selected volunteers, and the dataset for all the volunteers can be found in Supplementary Figure 3. At 24 hours of culture, supernatants were analyzed by CBA to determine the Th1/Th2 cytokine secretion profile in response to each pool. The heat maps represent the data for the same 6 volunteers. The Th1/Th2 profiles determined this way for all the volunteers and pools are shown in g). h) A mixed Th1/Th2 gene expression profile was also observed in PBMC from Days 3 + 7 stimulated with selected immunostimulatory pools and analyzed by gene microarray. i) Day 365 PBMC from 5 volunteers were stimulated (S) for 6 days with selected immunostimulatory pools, and then re-stimulated (RS) with the same pools for another 18 hours. The figure shows a heat map of differentially expressed Th1 or Th2 genes between S versus non-stimulated (NS), or RS versus NS cells. Th1/Th2 CBA analysis results for the supernatants are shown in Supplementary Figure 4. The Th profiles at the bottom of the heat maps depict either single Th1 or Th2 or mixed Th1/Th2. One-tail test was used to determine significance (see materials and methods).

Figure 3. Heatmap of the transcriptional network of differentially expressed genes as inferred by gene set enrichment analysis on *ex-vivo* stimulated PBMC. Top two rows show modulation of the inferred transcription factors. For STAT-1 only the modulation of the probe targeting all transcripts is shown (ProbeId 7050139). Genes presumably targeted by STAT-1 are indicated by blue background, presumed IRF-1 targets are highlighted in yellow, genes targeted by both are indicated by both highlights. Column labels indicate donor numbers and experimental conditions.

Figure 4. Gene signatures associated with a strong CD4⁺ T cell response and control of viremia following YF17D vaccination. Heat maps (a,c) and PCAs (b,d) showing gene expression profiles in subjects belonging to different clinical groups: strong (YF009, 13, 18, 20) and weak (YF008, 11, 15, 16 and 17) CD4⁺ T cell response, and high (YF011,

13 and 16) and low (YF008, 17, 19 and 20) viremia, respectively. These groups were determined as shown in Supplementary Figure 6. The data are from whole blood total RNA sampled at Day 7 post-vaccination, and normalized to Day 0. In the heat maps, the horizontal axis represents the vaccinated volunteers and the vertical axis shows the names of significant genes. In the PCA representations, each box represents a volunteer, and the distance separating each box reflects the differences in gene expression between these volunteers. e) Heat map showing that control of viremia correlates with the up-regulation of genes associated with the inflammasome.

Supplementary Figure 1. Transcriptional network of differentially expressed genes following YF17D vaccination, as inferred by gene set enrichment analysis. Network representation of inferred transcription factors⁹ and predicted target genes that are significantly modulated ($p < 0.05$ and fold change < -1.3 or > 1.3). Node colors indicate fold change of gene expression between Day 0 and Day 7: green indicates > 1.3 fold decrease, light red > 1.3 fold increase, and red > 2 fold increase. Grey nodes indicate fold changes < 1.3 in either direction. White nodes indicate genes for which the fold change was not determined. Rectangular nodes indicate transcription factors identified by gene enrichment; parallelogram, hexagonal, octagonal, triangular and diamond shapes indicate genes in the functional categories of Figures 1d-h). The triangle is used for indicating B cell associated genes (Figure 1i) as well. Genes in grey boxes are grouped to enhance readability.

Supplementary figure 2. Analysis of Ki67 expression in different subsets of PBMC. a) Gating strategy to identify lymphocytes, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, NK cells (CD3⁻CD8^{Dim}) and non-T cells (CD3⁻CD4⁻CD8⁻) by flow cytometry. b Kinetics of Ki67 expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells of six volunteers after vaccination. Error bar shows standard deviation (n=6).

Supplementary Figure 3. YF-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses following YF17D vaccination are variable. PBMC from 18 volunteers from Day 60 post-vaccination were labeled with CFSE and stimulated for 6 days with the 22 YF17D-

derived peptide pools (defined as shown in Supplementary Figure 5), and then analyzed by FACS for their proliferative response. The heat maps represent the percentage of cell proliferation over background for a) CD4⁺ T cells and b) CD8⁺ T cells.

Supplementary Figure 4. The mixed Th1/Th2 antigen-specific response induced by YF17D vaccination is persistent. Supernatants from the Day 365 cultures described in Figure 2i were sampled after 24 hours of incubation, and analyzed by CBA for their content in the Th1 cytokines IL-2, IFN- γ and TNF, and the Th2 cytokines IL-4 and IL-10.

Supplementary Figure 5. Schematic representation of the 22 YF17D-derived peptide pools used in this study. A total of 851 overlapping (by 11 amino acids) peptides, spanning the whole YF17D proteome, were obtained from the Emery Vaccine Center, Atlanta. These 15-mer peptides were grouped in 22 pools (containing 28-46 peptides each), according to the YF17D protein they were derived from. Each pool contained 2 mg of each peptide/ml, diluted in PBS-DMSO.

Supplementary Figure 6. Segregation of vaccinated volunteers according to two clinical parameters: strength of the CD4⁺ response at Day 60, as measured by proliferative response to YF17D peptide pools, and highest viremia. a) The volunteers were divided into three groups: those with a “weak” response, whose CD4⁺ cells recognized 5 pools or less, those with a “medium” response (6 to 15 pools), and those with a “strong” response (more than 15 pools). b) We divided the volunteers into three groups according to the value of their highest viremia: “low” (< 150 copies/ml), “medium” (151 – 1000 copies/ml) and “high” (>1001 - copies/ml).

Supplementary Document 1. YF17D vaccination regulates the transcription of numerous genes in total blood cells. Volunteers were vaccinated with YF17D and their total blood was collected at Days 0, 3, 7, 10, 14, 28 and 60 post-vaccination. Total RNA was isolated from the blood samples, amplified and hybridized to Illumina Human RefSeq-8 v2. Samples from 11-15 volunteers per time point were used for analysis. This

list enumerates all the modulated genes with a fold change value < -1.3 or > 1.3 (time point compared to Day 0), with or without a p value < 0.05 .

Supplementary Document 2. List of the modulated genes in PBMC from Day 3 (volunteer YF013) and Day 7 (volunteer YF019) stimulated with selected YF17D-derived immunostimulatory pools (spreadsheet a), and from Day 365 (YF003, YF011, YF016, YF019, YF02020.) cells stimulated once (PNRS) or twice (PP) with immunostimulatory pools. Total RNA was isolated from PBMC, amplified and hybridized to Illumina Human RefSeq-8 v2. The list contains the fold change of the stimulated compared to non-stimulated samples. Please refer to Material and methods section and Figure 2h and I for details.

Supplementary Document 3. Lists of genes selected to make up the “TLR-associated and IFN-induced genes”, “complement-associated genes”, macrophage-associated genes”, “NK cell-associated genes”, “Th1/Th2-associated genes” and “B cell-associated genes” gene sets used for Figures 1d, e, f, g, h and i, respectively. The document also includes the “inflammasome-associated genes”, gene set used for Figures 4e. The Th1/Th2 gene set was also used to generate Figure 2h and i. These lists were derived from published literature. The gene symbol used by Illumina, the official gene symbol and name (as of February 2008) and known synonyms are provided for each gene. At least one reference supporting the assignment of each gene to its respective set is also given.

Supplementary Document 4. Gene signatures associated with a strong CD4⁺ response and control of viremia following YF17D vaccination. Total RNA was isolated from total blood cells, amplified and hybridized onto Illumina Human RefSeq-8 v2. Spreadsheet a) The difference in response post-vaccination was evaluated between strong (YF009, YF013, YF018, YF020) and weak (YF008, YF011, YF015, YF016, YF017) CD4⁺ T cell responders (as determined in Supplementary Figure 6a), using Day 7 data normalized to Day 0. Spreadsheet b) The difference in response post-vaccination was evaluated between volunteers with high (YF011, YF013, YF016) and low (YF008, YF017,

YF019, YF020) viremia (as determined in Supplementary Figure 6b), using Day 7 data normalized to Day 0. These lists (spreadsheets a and b) show the significantly modulated genes having a fold change <-1.3 or >1.3 and a p -value <0.05 . False positives were removed.

3.6 Tableaux supplémentaires

Supplementary Table 1. The humoral immune response elicited by YF vaccination is variable

Volunteer	Days post-vaccination									
	0	3	7	10	14	28	60	90	180	360
YF001	0	0	0	0	1/640	1/640	1/1280	1/1280	1/640	1/640
YF002	0	0	0	0	1/640	1/640	1/320	1/320	1/80	1/80
YF003	0	0	0	0	1/80	1/320	1/80	1/80	1/80	1/80
YF004	0	0	0	0	1/320	1/320	1/320	1/640	1/640	1/640
YF005	0	0	0	0	1/320	1/160	1/160	1/320	1/320	1/160
YF006	0	0	0	0	1/320	1/320	1/80	1/80	1/80	1/640
YF007	0	0	0	0	1/160	1/320	1/320	1/320	1/160	1/160
YF008	0	0	0	0	0	1/1280	1/1280	1/1280	1/640	1/640
YF009	0	0	0	0	1/640	1/640	1/640	1/640	1/1280	1/1280
YF010	0	0	0	0	1/2560	1/2560	N/D	N/D	N/D	N/D
YF011	0	0	0	0	1/1280	1/1280	1/1280	1/1280	1/320	1/320
YF012	0	0	0	0	1/640	1/640	1/640	1/640	1/640	320
YF013	0	0	0	0	1/640	1/640	1/640	1/640	1/640	1/640
YF014	0	0	0	0	1/1280	1/1280	1/1280	1/1280	1/640	1/640
YF015	0	0	0	0	1/320	1/320	1/320	1/320	1/160	1/160
YF016	0	0	0	0	1/640	1/640	1/640	1/640	1/640	1/640
YF017	0	0	0	0	1/160	1/160	1/160	1/160	1/80	1/40
YF018	0	0	0	0	1/640	1/640	1/640	1/640	1/640	1/320
YF019	0	0	0	0	1/160	1/160	1/160	1/160	1/160	1/160
YF020	0	0	0	0	1/640	1/640	1/640	1/640	1/320	1/320

N/D = Not determined. YF17D-specific seroconversion by each volunteer following vaccination was assessed by measuring the titer of neutralizing antibodies in all available plasma samples pre- (Day 0) and post-vaccination (Days 3, 7, 10, 14, 28, 60, 90, 180 and 365). To do so, the plaque reduction neutralization assay⁶⁹ was performed in Dr. Rafi Ahmed's laboratory.

Supplementary Table 2. Comparison of Th profiles determined by gene microarray or CBA

Volunteer	Pool	Th profile	
		Microarray	CBA
YF003	6	Th1	Th1
	7	Th1	Th1
	9	Th1	Th1
	11	Th1	Th1/Th2
	12	Th1/Th2	Th1/Th2
	17	-	Th1
	20	Th1/Th2	N/D
YF011	6	Th1	Th1
	7	Th1	Th1/Th2
YF016	1	Th1	N/D
	3	Th1/Th2	Th1
	4	Th1/Th2	Th1
	6	Th1/Th2	Th1
	11	Th1/Th2	Th1
YF019	3	Th1/Th2	Th1/Th2
	5	Th1	Th1
YF020	1	Th1/Th2	Th1/Th2
	3	Th1/Th2	Th1
	17	Th1	Th1

YF17D stimulates a mixed Th1/Th2 profile. PBMC were collected from 5 patients 365 days post-vaccination, and were stimulated for 6 days with immunostimulatory YF17D-derived peptide pools. They were then re-stimulated with the same pools for another 18 hours. Cells were harvested and their RNA analyzed by gene microarray, as described in the Materials and Methods section. The results are reported in Figure 2i. The culture supernatants were harvested and analyzed by CBA; the results are shown in Supplementary Figure 4. A comparison of the T helper profiles, as determined by gene microarray and CBA, is shown in this figure. N/D = Not determined.

Supplementary Table 3. Viremia following YF vaccination is variable

Volunteer	Days post-vaccination					
	0	3	7	10	28	60
YF001	21.00	21.00	6920.79	207.72	21.00	N/D
YF002	21.00	24.76	21.00	21.00	21.00	N/D
YF003	21.00	21.00	21.00	21.00	21.00	N/D
YF004	21.00	22.36	1067.59	21.00	21.00	N/D
YF005	21.00	1027.43	616.32	21.00	21.00	N/D
YF006	21.00	21.00	479.03	21.00	21.00	N/D
YF007	21.00	21.00	21.00	74.15	21.00	N/D
YF008	21.00	21.00	21.00	21.00	21.00	N/D
YF009	21.00	21.00	255.35	28.89	21.00	N/D
YF010	21.00	21.00	185.39	21.00	21.00	N/D
YF011	21.00	26.21	1593.71	21.00	21.00	N/D
YF012	21.00	143.65	335.86	21.00	21.00	N/D
YF013	21.00	2580.65	21.00	21.00	21.00	N/D
YF014	21.00	390.06	747.12	70.35	N/D	21.00
YF015	21.00	21.00	331.68	21.00	21.00	N/D
YF016	21.00	21.00	1316.12	21.00	N/D	21.00
YF017	21.00	45.56	108.67	21.00	21.00	N/D
YF018	21.00	21.00	673.54	52.36	21.00	N/D
YF019	21.00	23.01	32.80	21.00	21.00	N/D
YF020	21.00	21.00	34.72	21.00	21.00	N/D

N/D: not determined. Viremia following YF17D vaccination was assessed for each volunteer by determining the number of YF17D viral particles in plasma samples obtained at Days 0, 3, 7, 10 and 28. When Day 28 samples were not available, Day 60 samples were used instead. The method used was the TaqMan real-time PCR assay (Applied Biosystems, Foster City, CA), and was performed in Dr. Rafi Ahmed's laboratory at the Emory Vaccine Center in Atlanta. Numbers expressed as viral particles per ml plasma. The detection limit of the assay was 21 copies per ml.

Supplementary Table 4. Comprehensive list of the 20 volunteers enrolled in our study

Volunteer	Gender	Age	Date of vaccination	Other vaccines administered during the study
YF001	F	21	Jun 4 2002	---
YF002	F	20	Jun 4 2002	---
YF003	F	22	Jul 2 2002	Jul 31 2002 (Day 28) - Salk
YF004	F	21	Jul 2 2002	Feb 26 2003 (Day 239) - Salk, Havrix 1440, TYPHIN VI
YF005	F	28	Jul 2 2002	---
YF006	F	22	Sep 23 2002	Nov 28 2002 (Day 66) - Salk, Vivotif, TCT
YF007	F	26	Nov 19 2002	May 6 2003 (Day 168) - Twinrix, Menomune, TYPHIN VI; Jun 3rd 2003 (Day 196) - RRO, Salk, Twinrix
YF008	F	23	Jan 21 2003	Mar 21 2003 (Day 60) - Salk, typhoid, Havrix 1440
YF009	F	34	Feb 7 2003	---
YF010	M	27	Feb 11 2003	---
YF011	F	25	Feb 24 2003	---
YF012	F	29	Feb 24 2003	---
YF013	M	28	Feb 24 2003	---
YF014	F	28	Feb 25 2003	---
YF015	M	26	Feb 24 2003	---
YF016	M	23	Feb 24 2003	Jun 2 2003 (Day 90) - MMR, DTP, typhoid fever
YF017	F	22	Aug 18 2003	---
YF018	F	25	Jul 8 2003	---
YF019	F	43	Aug 18 2003	---
YF020	F	31	Sep 15 2003	---

DTP: diphtheria, tetanus, pertussis; Havrix 1440: hepatitis A; Menomune: meningococcal vaccine; MMR: measles, mumps, rubella; Salk: polio; TCT: tuberculosis; Twinrix: hepatitis A and B; TYPHIN VI: typhoid fever; Vivotif: typhoid fever.

3.7 Documents supplémentaires

Ces documents supplémentaires sont disponibles dans le support informatique ci-joint.

Supplementary Document 1: YF17D vaccination regulates the transcription of numerous genes in total blood cells.

Supplementary Document 2: List of the modulated genes in PBMC from Day 3 (volunteer YF013) and Day 7 (volunteer YF019) stimulated with selected YF17D-derived immunostimulatory pools (spreadsheet a), and from Day 365 (YF003, YF011, YF016, YF019, YF02020.) cells stimulated once (PNRS) or twice (PP) with immunostimulatory pools.

Supplementary Document 3: Lists of genes selected to make up the “TLR-associated and IFN-induced genes”, “complement-associated genes”, macrophage-associated genes”, “NK cell-associated genes”, “Th1/Th2-associated genes” and “B cell-associated genes” gene sets used for Figures 1d, e, f, g, h and i, respectively.

Supplementary Document 4. Gene signatures associated with a strong CD4+ response and control of viremia following YF17D vaccination.

3.8 Références de l'article

1. Plotkin, S. & Orenstein, W. (eds.) Vaccines (WB Saunders, Philadelphia, 2004).
2. Jokinen, J. T., Ahman, H., Kilpi, T. M., Makela, P. H. & Kayhty, M. H. Concentration of antipneumococcal antibodies as a serological correlate of protection: an application to acute otitis media. *J Infect Dis* 190, 545-50 (2004).
3. McMichael, A. J. HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* 24, 227-55 (2006).
4. Zinkernagel, R. M. On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol* 21, 515-46 (2003).
5. Querec, T. D. & Pulendran, B. Understanding the role of innate immunity in the mechanism of action of the live attenuated Yellow Fever Vaccine 17D. *Adv Exp Med Biol* 590, 43-53 (2007).
6. Monath, T. P. in Vaccines (eds. Plotkin, S. & Orenstein, W.) 1095-1176 (WB Saunders, Philadelphia, 2004).
7. Sekaly, R. P. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med* 205, 7-12 (2008).
8. Steinbrook, R. One step forward, two steps back--will there ever be an AIDS vaccine? *N Engl J Med* 357, 2653-5 (2007).
9. Xie, X. et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434, 338-45 (2005).
10. Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25, 349-60 (2006).
11. Honda, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-7 (2005).
12. Jouanguy, E. et al. Human primary immunodeficiencies of type I interferons. *Biochimie* 89, 878-83 (2007).
13. Gallant, S. & Gilkeson, G. ETS transcription factors and regulation of immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54, 149-63 (2006).
14. Levy, D. E., Marie, I., Smith, E. & Prakash, A. Enhancement and diversification of IFN induction by IRF-7-mediated positive feedback. *J Interferon Cytokine Res* 22, 87-93 (2002).
15. Malmgaard, L., Salazar-Mather, T. P., Lewis, C. A. & Biron, C. A. Promotion of alpha/beta interferon induction during in vivo viral infection through alpha/beta interferon receptor/STAT1 system-dependent and -independent pathways. *J Virol* 76, 4520-5 (2002).
16. Severa, M. & Fitzgerald, K. A. TLR-mediated activation of type I IFN during antiviral immune responses: fighting the battle to win the war. *Curr Top Microbiol Immunol* 316, 167-92 (2007).
17. Hawlisch, H. & Kohl, J. Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. *Mol Immunol* 43, 13-21 (2006).
18. Mehlhop, E. et al. Complement activation is required for induction of a protective antibody response against West Nile virus infection. *J Virol* 79, 7466-77 (2005).

19. Mehlhop, E. & Diamond, M. S. Protective immune responses against West Nile virus are primed by distinct complement activation pathways. *J Exp Med* 203, 1371-81 (2006).
20. Bhat, N. K. et al. Reciprocal expression of human ETS1 and ETS2 genes during T-cell activation: regulatory role for the protooncogene ETS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3723-7 (1990).
21. Blumenthal, S. G. et al. Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1, cooperate with GATA3 and HTLV-I Tax1. *J Biol Chem* 274, 12910-6 (1999).
22. Hagman, J. & Grosschedl, R. An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the mb-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8889-93 (1992).
23. Koizumi, H. et al. Identification of a killer cell-specific regulatory element of the mouse perforin gene: an Ets-binding site-homologous motif that interacts with Ets-related proteins. *Mol Cell Biol* 13, 6690-701 (1993).
24. Wargnier, A. et al. Identification of human granzyme B promoter regulatory elements interacting with activated T-cell-specific proteins: implication of Ikaros and CBF binding sites in promoter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6930-4 (1995).
25. Querec, T. 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* 203, 413-24 (2006).
26. Yoshimura, A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci* 97, 439-47 (2006).
27. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 177, 134-40 (2000).
28. Weckmann, M. et al. Critical link between TRAIL and CCL20 for the activation of TH2 cells and the expression of allergic airway disease. *Nat Med* 13, 1308-15 (2007).
29. Odemuyiwa, S. O. et al. Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol* 173, 5909-13 (2004).
30. Chizzolini, C., Chicheportiche, R., Burger, D. & Dayer, J. M. Human Th1 cells preferentially induce interleukin (IL)-1beta while Th2 cells induce IL-1 receptor antagonist production upon cell/cell contact with monocytes. *Eur J Immunol* 27, 171-7 (1997).
31. Wan, L. et al. Type I IFN induced IL1-Ra expression in hepatocytes is mediated by activating STAT6 through the formation of STAT2 : STAT6 heterodimer. *J Cell Mol Med* (2007).
32. Gabay, C., Dreyer, M., Pellegrinelli, N., Chicheportiche, R. & Meier, C. A. Leptin directly induces the secretion of interleukin 1 receptor antagonist in human monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 783-91 (2001).
33. Brunner, C. et al. BOB.1/OBF.1 controls the balance of TH1 and TH2 immune responses. *Embo J* 26, 3191-202 (2007).
34. Wang, Y. & Carter, R. H. CD19 regulates B cell maturation, proliferation, and positive selection in the FDC zone of murine splenic germinal centers. *Immunity* 22, 749-61 (2005).

35. Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P. & Browning, J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 21, 231-64 (2003).
36. Castigli, E. et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 201, 35-9 (2005).
37. Monaco, S. E., Angelastro, J. M., Szabolcs, M. & Greene, L. A. The transcription factor ATF5 is widely expressed in carcinomas, and interference with its function selectively kills neoplastic, but not nontransformed, breast cell lines. *Int J Cancer* 120, 1883-90 (2007).
38. Wang, H., Lin, G. & Zhang, Z. ATF5 promotes cell survival through transcriptional activation of Hsp27 in H9c2 cells. *Cell Biol Int* 31, 1309-15 (2007).
39. Nelson, B. R., Claes, K., Todd, V., Chaverra, M. & Lefcort, F. NELL2 promotes motor and sensory neuron differentiation and stimulates mitogenesis in DRG in vivo. *Dev Biol* 270, 322-35 (2004).
40. Luce, M. J. & Burrows, P. D. The neuronal EGF-related genes NELL1 and NELL2 are expressed in hemopoietic cells and developmentally regulated in the B lineage. *Gene* 231, 121-6 (1999).
41. Niu, H., Cattoretti, G. & Dalla-Favera, R. BCL6 controls the expression of the B7-1/CD80 costimulatory receptor in germinal center B cells. *J Exp Med* 198, 211-21 (2003).
42. Riou, C. et al. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* 204, 79-91 (2007).
43. Yoon, H. G. et al. Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *Embo J* 22, 1336-46 (2003).
44. Li, Y. P. et al. TNF-alpha increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating UbcH2/E220k. *Faseb J* 17, 1048-57 (2003).
45. Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. & Okamura, H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19, 423-74 (2001).
46. Irie, A. et al. Protein kinase D2 contributes to either IL-2 promoter regulation or induction of cell death upon TCR stimulation depending on its activity in Jurkat cells. *Int Immunol* 18, 1737-47 (2006).
47. Sakakibara, A., Hattori, S., Nakamura, S. & Katagiri, T. A novel hematopoietic adaptor protein, Chat-H, positively regulates T cell receptor-mediated interleukin-2 production by Jurkat cells. *J Biol Chem* 278, 6012-7 (2003).
48. Doms, H., Wolslegel, K., Lin, P. & Abbas, A. K. Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells. *J Exp Med* 204, 547-57 (2007).
49. Younes, S. A. et al. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 198, 1909-22 (2003).
50. Gloire, G., Erneux, C. & Piette, J. The role of SHIP1 in T-lymphocyte life and death. *Biochem Soc Trans* 35, 277-80 (2007).
51. Hu, W. H. et al. NIBP, a novel NIK and IKK(beta)-binding protein that enhances NF-(kappa)B activation. *J Biol Chem* 280, 29233-41 (2005).

52. Arimilli, S., Johnson, J. B., Alexander-Miller, M. A. & Parks, G. D. TLR-4 and -6 agonists reverse apoptosis and promote maturation of simian virus 5-infected human dendritic cells through NF κ B-dependent pathways. *Virology* 365, 144-56 (2007).
53. Jyothi, M. D. & Khar, A. Interleukin-2-induced nitric oxide synthase and nuclear factor-kappaB activity in activated natural killer cells and the production of interferon-gamma. *Scand J Immunol* 52, 148-55 (2000).
54. Okoye, A. et al. Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. *J Exp Med* 204, 2171-85 (2007).
55. Martinon, F. & Tschopp, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14, 10-22 (2007).
56. Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D. A. & Tschopp, J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 19, 615-22 (2007).
57. Muruve, D. A. et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* (2008).
58. Chen, Q., Sen, G. & Snapper, C. M. Endogenous IL-1R1 signaling is critical for cognate CD4+ T cell help for induction of in vivo type 1 and type 2 antipolysaccharide and antiprotein Ig isotype responses to intact *Streptococcus pneumoniae*, but not to a soluble pneumococcal conjugate vaccine. *J Immunol* 177, 6044-51 (2006).
59. Stanley, S. L., Jr. et al. The immunogenetics of smallpox vaccination. *J Infect Dis* 196, 212-9 (2007).
60. Steinman, R. M. & Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449, 419-26 (2007).
61. Redecke, V. et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 172, 2739-43 (2004).
62. Gorden, K. B. et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* 174, 1259-68 (2005).
63. Bafica, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 202, 1715-24 (2005).
64. Van Gelder, R. N. et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1663-7 (1990).
65. Smith, G. K. in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor* (eds. Gentleman, R., Carey, V., Dudoit, S., Irizarry, R., & Huber, W.) 397-420 (Springer, New York, 2005).
66. Culhane, A. C., Thioulouse, J., Perriere, G. & Higgins, D. G. MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics* 21, 2789-90 (2005).
67. Teschendorff, A. E., Journee, M., Absil, P. A., Sepulchre, R. & Caldas, C. Elucidating the altered transcriptional programs in breast cancer using independent component analysis. *PLoS Comput Biol* 3, e161 (2007).

68. Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-50 (2005).
69. Stefano, I. et al. Recent immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine. *Vaccine* 17, 1042-6 (1999).

4. Discussion

Les résultats obtenus permettent de progresser dans la compréhension des corrélats de protection. Tant l'immunité innée qu'acquise se sont révélées impliquées dans toutes leurs complexités dans la réponse immunitaire induite par le vaccin contre la fièvre jaune YF17D. Parmi les cellules engagées dans la protection induite par le vaccin, l'activité des cellules T auxiliaires de type T_{H1} et T_{H2} s'est retrouvée chez la grande majorité des volontaires. De plus, des patrons de transcription ont permis de souligner l'importance des facteurs de transcription STAT1 et IRF1 dans la protection procurée par le vaccin. Les études de transcription ont mis en évidence des signatures caractéristiques d'un contrôle de la virémie et d'une large réponse $CD4^+$. Finalement, en plus de documenter en détail les caractéristiques de la réponse au vaccin YF17D, ce travail met de l'avant la réponse combinée T_{H1} et T_{H2} ainsi que la participation de la réponse innée comme des corrélats de protection essentiels à une bonne protection immunitaire.

4.1 Le YF17D induit la transcription de gènes liés à l'immunité innée et acquise

Suite à la vaccination contre la fièvre jaune, le patron d'expression génique des cellules sanguines change grandement durant les 10 premiers jours (Figure 1a). Un peu plus de la moitié des gènes modulés sont davantage exprimés par rapport au jour d'avant la vaccination, alors que 238 des 594 gènes le sont moins (Document supplémentaire 1). Après 10 jours, les variations d'expressions sont sensiblement redevenues stables et semblables au patron d'expression du jour 0 (Figure 1b). Le pic de variation de gènes semble se situer au jour 7 (Figure 1b), ce qui distingue la vaccination contre la fièvre jaune de celles avec la vaccine, dont les variations de l'expression génique les plus importantes surviennent à la troisième journée⁴⁵³. Parmi les gènes modulés par le YF17D, plusieurs sont reliés biologiquement. En effet, il est intéressant de voir le lien entre les facteurs de transcriptions surexprimés et leurs gènes cibles tout autant exprimés au jour 7. C'est le cas des facteurs de transcriptions STAT1 et IRF7, impliqués dans la réponse aux interférons et dans la maturation des DC^{511,512}, ainsi que de leurs cibles communes, dont IFIT2, MOV10 et CXCL10. Ces molécules participent de près ou de

loin au contrôle de la virémie. IFIT2 est impliqué dans les réponses contre certains virus⁵¹³, MOV10 participe aux processus de "RNA silencing"⁵¹⁴, qui est un des mécanismes antiviraux intracellulaires⁵¹⁵ et le ligand de CXCR3, CXCL10, joue un rôle central dans la migration des éosinophiles⁵¹⁶ et des cellules T¹²⁶. Cette cohérence entre l'augmentation de l'expression tant du facteur de transcription que de ses gènes cibles confirme que ces voies reliées à ces deux facteurs de transcriptions sont grandement mises à contribution par la vaccination.

Or, le degré d'expression d'un facteur de transcription n'est pas nécessairement relié à l'expression de ses cibles, comme pour ETS2 ou IRF1 (Figure supplémentaire 1). En effet, d'autres caractéristiques d'un facteur de transcription influencent son efficacité et les gènes transcrits par celui-ci. Il peut s'agir du degré de phosphorylation du facteur de transcription, de la présence de cofacteurs ou même de sa localisation dans la cellule et de sa disponibilité. Ceci explique pourquoi certains gènes ne varient pas nécessairement dans le même sens que leur facteur de transcription. Le haut degré de variation d'expression des nombreux gènes cibles de ETS2 laisse supposer qu'il y a un effet important induit par le vaccin sur le potentiel de transcription de ETS2, dont l'expression ne semble pourtant pas varier. Selon l'état de cette protéine, celle-ci peut agir comme répresseur ou activateur de transcription et peut se lier à une panoplie de cofacteurs^{517,518}, dont GATA-3⁵¹⁹. D'ailleurs, ETS2 et certains de ses gènes cibles sont importants dans la différenciation des lymphocytes et des macrophages, en plus d'être impliqués dans le fonctionnement des cellules NK⁵¹⁸⁻⁵²².

La vaccination avec le YF17D stimule plusieurs voies du système immunitaire. En effet, un grand nombre des gènes associés aux interférons, aux TLR, au complément, aux macrophages, aux cellules NK, aux cellules T_{H1} et T_{H2} et aux cellules B sont davantage exprimés tôt après la vaccination (Figure 1, d à i). De surcroît, plusieurs gènes codant pour des molécules antivirales, dont MX-1, MX-2, ADAR et EIF2AK2, sont davantage exprimés après la vaccination. Les gènes induits par les interférons sont nombreux, indiquant que les cellules productrices d'interférons, probablement les DC⁵²³, sont actives. L'augmentation de l'expression de ces gènes est d'ailleurs un bon pronostic pour

les singes aux prises avec une infection au HCV²⁶³. Malgré le fait que l'on ne détecte pas de modulation des interférons eux-mêmes, il est possible que ces cytokines soient tout de même plus accessibles aux cellules répondant à ces molécules, ce qui expliquerait l'augmentation de l'expression des gènes induits par les interférons. Malgré la détection des gènes induits par les interférons, l'absence de ces derniers dans une analyse par puce à ADN a déjà été notée dans une expérience indépendante⁴⁵³. En d'autres termes, la transcription d'un gène n'est pas obligatoirement liée à la production de la protéine ou à la sécrétion de celle-ci. D'autres mécanismes doivent être en action pour augmenter l'effet des interférons. Une augmentation de la concentration des protéines IFN α , β et γ a déjà été retrouvée dans le sang d'individus récemment vaccinés avec le YF17D⁴⁵⁵. D'ailleurs, la production des IFN de type 1 (α et β) doit passer par les molécules signalisatrices STAT1 et STAT2, toutes deux surexprimées après vaccination. Ces facteurs de transcription pourraient être responsables de l'augmentation de l'expression des OAS et d'IRF7, qui figurent parmi les cibles de ces facteurs²⁶². Plusieurs gènes associés aux ribosomes sont moins exprimés après vaccination, comme cela a été démontré précédemment⁴⁵³. Les critères de détection des gènes modulés, incluant une valeur de p inférieur à 0,05 et une variation de plus de 1,3, font en sorte que les résultats obtenus sont très crédibles, puisque dans ces conditions, une observation est exacte dans plus de 95 % des cas⁵²⁴. Il est probable que les gènes détectés soient traduits sous forme de protéine. En effet, dans une expérience par puce à ADN se penchant sur les ARNm distinguant les T_{H1} des T_{H2} , la grande majorité des gènes exprimés sous forme d'ARNm l'était aussi sous forme de protéines⁵²⁵.

Il est cohérent d'observer l'expression du TLR7 augmentée (Figure 1d), alors que cette molécule est capable de reconnaître l'ARN simple brin des virus comme le YF17D. D'ailleurs, sa participation est importante dans l'expression des gènes induits par les interférons. Sa modulation est suivie par MYD88, essentielle à son fonctionnement. L'IL-15, dont la production est connue pour être directement induite par les TLR2 et 4⁵²⁶, est également augmenté suite au vaccin. Ces résultats concordent avec des observations chez la souris qui soulignaient que le YF17D stimulait entre autres les TLR 2 et 7³⁹⁷. En plus, l'augmentation du gène TICAM1, codant pour une protéine adaptatrice

du TLR3, laisse supposer que ce TLR est également mis à contribution suite à la vaccination⁵²⁷. De plus, plusieurs molécules impliquées dans le système du complément sont induites par l'activation de TLR, dont ceux retrouvés dans la Figure 1e⁵²⁸. D'ailleurs, le système du complément est connu pour participer à la réponse contre la fièvre jaune^{470,497,498}. Ainsi, la réponse immunitaire innée, combinant ses nombreux acteurs cellulaires et ses protéines capitales à leur fonctionnement, participe grandement à la réponse au vaccin contre la fièvre jaune.

L'implication de la réponse immunitaire adaptative est aussi détectable par le niveau d'expression des gènes associés aux T_{H1}, aux T_{H2} et aux cellules B (Figure 1, h et i). Plusieurs gènes T_{H1} sont surexprimés après la vaccination, dont CCR1, habituellement surexprimé chez des T_{H1} stimulées⁵²⁹, CD38, marqueur de DC stimulant une réponse T_{H1}⁵³⁰, CXCL10, aussi connu sous le nom de IP10 et induit par la présence d'IFN- γ ⁵³¹ ainsi que HAVCR2, synonyme de TIM3 et marqueur spécifique des cellules T_{H1}⁵³². En plus, IL1RN, récepteur antagoniste des cellules T_{H2}⁵³³, INDO, exprimé par les éosinophiles qui favorisent la réponse T_{H2}⁵³⁴, et TNFSF10, connu sous le nom de TRAIL et marqueurs des cellules T_{H2}⁵³⁵, sont tous surexprimés et indiquent la présence d'une réponse T_{H2} au vaccin. Des gènes spécifiques à une réponse humorale sont surexprimés, dont les gènes TNFRSF17, impliqué dans la maturation des lymphocytes B⁵³⁶ et PIK3AP1, relié directement au récepteur des cellules B⁵³⁷. Ces modulations de gènes liés à la réponse humorale majoritairement au quatorzième jour après vaccination coïncident avec l'apparition des anticorps (Tableau supplémentaire 1). Cette correspondance renforce la validité des données tirées des analyses d'expression de gènes.

La participation de plusieurs types de cellules à la réponse immunitaire a été confirmée par cytométrie de flux en observant les cellules exprimant la protéine intracellulaire Ki67, marqueur de division cellulaire⁵³⁸. Tous les lymphocytes, incluant les T_H, les CTL, les cellules NK et même les cellules non-T, dont les lymphocytes B, possèdent davantage la protéine Ki67 au jour 14 qu'avant la vaccination (Figure 2a), et semblent proliférer en réponse au YF17D. Cela concorde avec les observations précédentes qui

rapportaient l'activité des NK⁴⁵⁷ et l'augmentation du nombre de lymphocytes T cytotoxiques dans le sang après vaccination⁴⁶¹.

La réponse innée prend donc une place importante dans la réponse contre le YF17D, en faisant participer les cellules NK, les macrophages et les DC. Les acteurs classiques de la réponse innée, dont les TLR et le système du complément⁵³⁹, sont de plus en plus reconnus comme des initiateurs et des guides pour la réponse adaptative. La réponse adaptative devient tributaire de la réponse innée, et ces deux réponses forment davantage un seul et même mécanisme protecteur bien orchestré plutôt que deux indépendants, comme décrit historiquement. La réponse adaptative est complète et composée de T_{H1}, T_{H2} et des cellules B, indiquant qu'une réponse humorale et cellulaire est induite par le YF17D. Cela concorde avec les observations sur les vaccins contre la variole et l'hépatite A, qui stimulaient aussi une forte réponse innée via les TLR et la participation des cellules NK, en plus d'activer tant des T_{H1} que des T_{H2}¹⁴³⁻¹⁴⁵.

4.2 Le YF17D induit une réponse T_{H1} et T_{H2} persistante

La forte réponse au vaccin mesurée par puce à ADN se stabilise après deux semaines, mais la mémoire immunitaire qui en résulte est persistante et implique plusieurs types de cellules. Tout d'abord, après avoir stimulé les PBMC du jour 60 des volontaires avec différents groupes de peptides (définis dans la Figure supplémentaire 5), tant des T_H que des CTL étaient aptes à proliférer dans un test avec CFSE (histogrammes de la Figure 2f et Figure supplémentaire 3). Or, il se trouve que chez tous les volontaires, aucun groupe de peptides n'est plus stimulant que d'autres. La réponse immunitaire comprenant les CTL et les T_H cible donc toutes les protéines du virus sans préférence avec un grand spectre d'action, alors que précédemment très peu d'épitopes avaient été notés⁴⁰⁸. De plus, la réponse est grandement variable d'un individu à un autre. Certains répondent à presque tous les groupes de peptides, comme les volontaires 1 et 20, alors que la réponse de d'autres n'est pas détectable contre la majorité des groupes de peptides, comme les volontaires 15 et 16. Il apparaît que cette méthode d'analyse de la mémoire immunitaire

est plus sensible pour les T_H que les CTL, dont le potentiel de prolifération semble moins important. Ceci est plausible, puisqu'il y a plus de T_{CM} parmi les T_H que les CTL¹¹⁸, et que les T_{CM} ont un plus grand potentiel de prolifération⁵⁶. Par contre, les volontaires dont les T_H répondent à un grand nombre de groupes de peptides ont tout autant une large réponse des CTL à ces groupes de peptides. En effet, en comparant le nombre de groupes stimulant des T_H à celui des CTL dans une analyse de corrélation non paramétrique de Spearman, la relation approche un ratio de 1 avec un r de 0,7222 et une valeur de p de 0,0007 (données brutes, annexe 2). Cependant, alors qu'il y a un lien entre le nombre de groupes de peptides reconnus entre les T_H et les CTL, un groupe de peptides stimulant la prolifération des T_H chez un volontaire ne stimule pas nécessairement les CTL, et *vice versa*. Cela peut s'expliquer par la différence entre les CMH de classe I et de classe II, dont les affinités peuvent être différentes. Autrement dit, la mémoire immunitaire induite par le vaccin est variable selon les individus et inclut des T_H et des CTL ciblant une grande variété de protéines et de sections de celles-ci. Ces variations sont peut-être dues à des facteurs immunologiques individuels ou même à la façon dont est produit le vaccin⁴³³. Puisque la protection du vaccin approche 100 % et que malgré tout certains ont reconnu beaucoup moins de groupes de peptides que d'autres, la largeur de la réponse cellulaire n'est donc pas liée à la protection et ne peut être un corrélat de protection. Il est possible qu'un petit nombre d'épitopes, s'ils stimulent une réponse efficace, est suffisant pour induire une protection immunitaire.

La suite de l'expérience sur les PBMC du jour 60 après vaccination a apporté davantage de lumière sur les phénotypes des T_H (*heatmap* de la Figure 2f et Figure 2g). En recueillant les surnageants des cellules stimulées par différents groupes de peptides, il a été possible de mesurer les cytokines IL-4 et IL-10, associées aux T_{H2} , ainsi que IL-2, TNF et IFN- γ , protéines produites par les T_{H1} . En comparant le profil de sécrétion de cytokines avec celui de prolifération cellulaire, aucune corrélation n'a pu être établie. Par exemple, alors que les volontaires 1 et 2 ont eu une forte prolifération des cellules T_H , seules les cellules du volontaire 1 ont sécrété une vaste gamme de cytokines en quantité contre un grand nombre de groupes de peptides. De même, les CTL des volontaires 2 et 19 ont répondu à un nombre semblable de groupes de peptides, mais seules les cellules

du volontaire 19 ont produit une grande quantité de cytokines. Le spectre de réponse des T_H et des CTL n'est donc pas nécessairement relié à l'habileté des PBMC à sécréter des cytokines en quantité ou en variété. Par contre, les cellules de presque tous les volontaires (12 sur 15) ont sécrété des cytokines associées au T_{H1} et au T_{H2} avec la stimulation d'un ou l'autre des groupes de peptides. Encore une fois, aucun groupe de peptides n'a su se démarquer et en conséquence, les réponses T_{H1} et T_{H2} ciblent toutes les protéines ou leurs sections, sans que ces antigènes ne favorisent l'une ou l'autre des réponses T_H . De plus, certains volontaires comme le volontaire 3 offrent des réponses surtout T_{H2} , alors que les cellules d'autres volontaires, comme le volontaire 18 par exemple, s'orientent majoritairement dans une voie T_{H1} . Bref, la mémoire immunitaire inclut une large gamme de cellules pouvant sécréter des cytokines tant T_{H1} que T_{H2} , et cette capacité est variable d'un individu à l'autre tant dans son spectre de réponse que dans la voie T_{H1} ou T_{H2} favorisée. La protection accordée par le vaccin n'est donc pas liée au nombre d'épitopes ciblés par la réponse immunitaire, mais à la présence de réponses T_{H1} et T_{H2} . Tant qu'il y a à la fois ces deux types de réponse, peu importe la prépondérance de l'une par rapport à l'autre, il semble que la protection soit efficace. La variabilité observée ici est possiblement due à deux facteurs. D'abord au vaccin, dont les doses sont variables en quantité et quelques fois en type de clones⁴³³, et ensuite aux caractéristiques génétiques et immunologiques des individus. Il serait intéressant de déterminer ce qui permet au YF17D d'induire à la fois une réponse T_{H1} et T_{H2} malgré tant de variabilité.

La stimulation avec certains peptides du vaccin semble mener à une réponse T_{H1} et T_{H2} au jour 60. En utilisant une méthode plus sensible que la mesure de sécrétion de cytokines, soit l'analyse du patron d'expression par puce à ADN, il est possible de retrouver cet engagement tôt après la vaccination et un an plus tard. En suivant l'expression de certains gènes spécifiques aux T_{H1} ou T_{H2} , comme ceux présentés dans la Figure 2 h et i et décrits dans le document supplémentaire 3, on retrouve déjà l'expression de molécules associées aux profils T_{H1} , comme IFN- γ , et T_{H2} , dont IL-6, chez les PBMC de plusieurs volontaires aux deux temps donnés après stimulation par rapport aux échantillons non stimulés. Les gènes présentés dans les figures ne sont qu'un

exemple de la liste complète de gènes analysés. En compilant les résultats d'expression de tous les gènes T_{H1} ou T_{H2} décrits dans le document supplémentaire 3, dès qu'une majorité de gènes étaient surexprimés significativement, le profil T_H a été déterminé. Par exemple, les volontaires 13 et 19 avec les groupes de peptides 6 et 1 présentent suffisamment de gènes surexprimés par la stimulation pour les qualifier de T_{H1} tôt après la vaccination (figure 2 h). Alors qu'il ne s'agit que d'une minorité de stimulations (2 sur 7) qui incite une réponse T_{H1} tôt après la vaccination, 13 stimulations sur 19 au jour 365 sont efficaces et stimulent une majorité de gènes T_{H1} . De plus, trois stimulations ont aussi engagé en quantité des gènes spécifiquement T_{H2} . Or, dans l'isolation des PBMC, il est probable que parmi tous les peptides ciblés par la mémoire immunitaire, une infime portion de ces cellules est spécifique aux peptides du YF17D. De surcroît, les lymphocytes T_{H1} sécrètent de l'IL-2 contrairement aux T_{H2} , ce qui les avantage dans la prolifération⁵³⁸ et qui les rend probablement plus visibles par test de puce à ADN. Pour amplifier le signal obtenu et détecter les cellules T_{H2} , une nouvelle stimulation a été effectuée pour laisser proliférer davantage les cellules T_{H2} (Figure 2 i deuxième panneau). Comme de fait, les cellules spécifiques étant probablement en plus grand nombre, le signal obtenu s'est accentué. La grande majorité des gènes se sont vus encore plus exprimés, en conservant un patron similaire, mais plus marqué. Cela confirme la validité de l'expérience, et permet de détecter 18 fois sur 19 un profil T_{H1} et ses nombreux gènes surexprimés. En plus, 9 des 19 restimulations ont augmenté l'expression d'une majorité de gènes T_{H2} , ce qui est trois fois plus qu'avec une stimulation normale. L'analyse de stimulation et de restimulation de PBMC par test de puce à ADN est donc une méthode extrêmement sensible qui a permis de détecter l'effet des cellules T_{H1} dès la première semaine après la vaccination et surtout, qui confirme qu'il y a bel et bien une mémoire tant T_{H1} que T_{H2} un an après vaccination.

Pour valider cette conclusion, le surnageant des cellules stimulées de nouveau du jour 365 a été analysé pour vérifier s'il y avait production de cytokines T_{H1} ou T_{H2} (Figure supplémentaire 4). Alors que de l'IFN- γ et du TNF ont été retrouvés dans presque tous les échantillons, l'IL-2 et l'IL-4 se sont avérés indétectables ou presque, et de l'IL-10 a été détecté dans moins de la moitié des essais. L'IL-2 et l'IL-4 auraient été d'excellentes

preuves de la présence de cellules T_{H1} et T_{H2} . À cause de la présence plus que probable des cellules T_{H1} , présence expliquée par les résultats des tests de puce à ADN et des molécules TNF et IFN- γ retrouvées dans les surnageants, l'IL-2 produite par ces cellules est possiblement consommée au fur et à mesure et ne peut s'accumuler à des niveaux détectables. Dans le cas où l'on détecte sa présence, il s'agit des échantillons (volontaire 16 groupe 6) dans lesquels l'on retrouve le plus de gènes T_{H1} surexprimés (Figure 2 i panneau de droite). Les cellules T_{H1} spécifiques à ces peptides doivent donc être en très grand nombre. De l'IL-5, une cytokine spécifique aux T_{H2} ⁶³, a été retrouvée dans certains cas (données présentées en annexe), ce qui supporte l'hypothèse, avec la présence d'IL-10 et des résultats de puce à ADN, que des cellules T_{H2} spécifiques au vaccin sont retrouvées un an après la vaccination. Toutefois, l'analyse des cytokines présentes est moins sensible que l'analyse par puce à ADN, mais permet tout de même de valider au niveau protéique qu'il y a bel et bien des cellules T_{H1} et T_{H2} spécifiques aux peptides du YF17D 365 jours après vaccination.

La réponse protectrice au vaccin YF17D n'est donc pas associée au spectre des réponses T_H ou CTL, mais plus probablement à la participation concertée de plusieurs acteurs immunologiques, dont les cellules T_{H1} et T_{H2} . Il a été possible de confirmer l'implication combinée des T_{H1} et des T_{H2} tant au niveau ARN par test de puce à ADN qu'au niveau protéique par CBA chez presque tous les volontaires. La présence combinée de ces deux types de cellules auxiliaires suite à la vaccination s'avance donc comme un corrélat de protection immunitaire, comme cela a été observé avec les vaccins contre la variole et l'hépatite A^{143,144}. Par contre, le nombre d'épitopes ciblés par la réponse auxiliaire ou cytotoxique ou même la prépondérance de la voie T_{H1} ou T_{H2} ne sont pas, selon cette étude, des corrélats de protection immunitaire.

4.3 L'efficacité de l'immunité induite par le YF17D passe par STAT1 et IRF1

Parmi les facteurs de transcription ayant le plus de gènes cibles modulés dans la restimulation, STAT1 et IRF1 figurent parmi les plus importants. Dans la Figure 3, il est possible de suivre l'expression des facteurs de transcription STAT1 et IRF1, ainsi que de leurs gènes cibles des PBMC du jour 365, soit après stimulation ou après restimulation. Cela donne la possibilité de vérifier si le facteur de transcription STAT1 est utilisé lors de la stimulation peptidique comme l'a fait le vaccin dans la Figure 1 c). Comme le montrait la Figure 2 i), la restimulation accentue ce qui est retrouvé dans le panneau stimulé, tout en conservant un patron d'expression similaire. Les gènes surexprimés dans le panneau de gauche se retrouvent davantage surexprimés dans le droit, et *vice versa* pour les gènes moins exprimés. Seuls les gènes CXXC5, codant pour une protéine interagissant avec les protéines Smad⁵⁴⁰ impliquées dans la production de TGF- β et dans le cycle cellulaire^{541,542}, et HPCAL1, lié par l'intermédiaire du cytochrome b5⁵⁴³ à la génération de radicaux libres et l'apoptose⁵⁴⁴, sont nettement moins exprimés avec la stimulation de plusieurs groupes de peptides chez plusieurs volontaires, et l'effet s'accroît lorsqu'ils sont stimulés à nouveau. De plus, les facteurs de transcriptions STAT1 et IRF1 sont davantage transcrits après restimulation avec des peptides du YF17D chez 5 des 6 volontaires testés. À l'exception des deux cibles mentionnées précédemment ainsi que les deux gènes MYB et CCND1, tous les 9 autres gènes cibles analysés de STAT1 et de IRF1 sont davantage exprimés. MYB, impliqué dans le développement des cellules T⁵⁴⁵, et la cycline D1 (CCND1), actrice essentielle dans le cycle cellulaire⁵⁴⁶, ne varient pas d'une façon constante entre les différents volontaires. De ces neuf autres gènes, on retrouve RIPK2, essentielle dans les cascades en aval des TLR2, 3, 4, IL1R et IL18R⁵⁴⁷, et TAP1, nécessaire au bon fonctionnement des CMHI⁵⁴⁸. Il est fort probable, comme dans l'analyse de l'expression des cellules sanguines au jour 7, que ces facteurs de transcription aient un rôle important à jouer dans la réponse protectrice induite par le vaccin.

Les cellules mémoires du jour 365 spécifiques au vaccin répondent d'une façon particulière et précise à l'antigène, et il s'agit probablement d'une signature de la réponse protectrice selon la grande efficacité du vaccin. S'il était possible de retrouver les mécanismes propres aux cellules protectrices du jour 365 au jour 7, ce serait un indice de taille qu'il y a, à ce temps donné, des cellules spécifiques au vaccin déjà efficaces. Voilà entre autres pourquoi il est intéressant de comparer les patrons d'expression des cellules sanguines du jour 7 (Figure 1 c) avec ceux des restimulations des PBMC avec des peptides du vaccin au jour 365 (Figure 2 i). Il est probable que des mécanismes semblables sont utilisés dans les deux événements, puisque l'on retrouve plusieurs cellules de même type aux prises avec les mêmes antigènes. Parmi les gènes ciblés par le facteur de transcriptions STAT1 étudiés à la fois au jour 365 et au jour 7, on dénombre, en plus de STAT1, TNFRSF13B (synonyme de BAFF, molécule qui stimule la prolifération des cellules B⁵⁴⁹), IFIT2 et CXCL10. Après comparaison, tous ces gènes sont surexprimés chez presque tous les volontaires du jour 365 après restimulation, et sont aussi significativement surexprimés au jour 7 après la vaccination. La restimulation et la vaccination partagent donc au moins l'augmentation de la transcription de ces gènes, ce qui s'inscrit possiblement dans un mécanisme similaire de réponse protectrice au vaccin. Il serait intéressant de pousser l'analyse au niveau protéique pour confirmer leur importance, et ensuite de valider qu'il y a bel et bien des cellules protectrices tôt après la vaccination.

Ainsi, des mécanismes précis soutenant une réponse protectrice après vaccination peuvent être décrits grâce aux analyses transcriptionnelles. STAT1 et IRF1 sont deux facteurs de transcriptions qui semblent être grandement impliqués lors d'une stimulation de cellules mémoires avec des peptides du YF17D. Ils forment un point de départ de la réponse immunitaire protectrice en faisant participer une variété de gènes cibles associés aux multiples facettes de l'immunité.

4.4 Signatures transcriptionnelles du contrôle de la virémie et d'une large réponse CD4⁺

Tous les volontaires ont généré de hauts taux d'anticorps protecteurs après la vaccination (tableau supplémentaire 1). Alors que l'on peut déduire que tous les volontaires sont protégés par le vaccin contre la fièvre jaune, certains d'entre eux ont répondu, au niveau de la réponse cellulaire au jour 60 (Figure supplémentaire 3 a), à un large éventail de groupes de peptides, pendant que d'autres ont à peine répondu à quelques groupes seulement. D'ailleurs, il n'y a pas de relation entre le spectre de réponse CD4⁺ et la quantité d'anticorps générée (données brutes, annexe 2, Test non paramétrique de Spearman, $r = 0,2871$ et $p = 0,2480$). D'autres mécanismes sont donc derrière une large réponse cellulaire. Malgré qu'une large réponse CD4⁺ ne soit pas un corrélat de protection, comprendre comment générer celle-ci pourra être utile pour concevoir un vaccin qui devra générer une réponse cellulaire large contre un virus générant de nombreux mutants comme le VIH. En ne sélectionnant que des volontaires qui avaient une forte ou une faible réponse CD4⁺ au jour 60 comme présenté dans la Figure supplémentaire 6 a) et en comparant leur parton d'expression génique au jour 7, il a été possible de différencier les deux groupes par une série de gènes (Figure 4 a et b). Cette signature caractéristique d'une large réponse CD4⁺ est très informative et inclut l'augmentation de l'expression de PRKD2 et de SH2D3C, essentiels à la sécrétion d'IL-2^{550,551}, elle-même nécessaire au maintien de la mémoire des cellules T et B⁵⁵². NIBP et INPP5D (SHIP-1), deux gènes qui activent la voie de survie des cellules T et des DC⁵⁵³⁻⁵⁵⁵, sont aussi surexprimés chez les forts répondeurs en CD4⁺. Ces gènes surexprimés au septième jour révèlent donc une persistance et une survie cellulaire qui se retrouve deux mois plus tard. De plus, plus d'une dizaine de gènes reliés aux ribosomes sont moins exprimés chez les forts répondeurs CD4⁺ (document supplémentaire 4). Ceci est intéressant, puisque la variation de ces gènes est tellement forte qu'elle a été notée comme significative chez tous les volontaires dans une étude précédente⁴⁵³, alors qu'elle ne se retrouve que chez les individus avec un large spectre de réponse CD4⁺. Ces gènes sont donc impliqués dans un mécanisme d'une large réponse cellulaire. Cette signature de gènes pourra être très utile dans la recherche des corrélats de protection d'un vaccin

induisant une réponse cellulaire large, comme contre le VIH, qui devra induire des gènes associés à la production de l'IL-2 et à l'activation des cellules T et B.

Tous les volontaires n'ont pas contrôlé la virémie induite par le vaccin de la même façon (tableau supplémentaire 3). Le virus-vaccin YF17D n'a pas été détecté chez certains volontaires, comme les volontaires 3 et 8, alors que d'autres ont montré de forts niveaux de réplication virale, comme les volontaires 1 et 13. Le contrôle de la virémie n'est pas un corrélat de protection, mais la compréhension des mécanismes derrière ce contrôle pourra aider à conceptualiser des vaccins thérapeutiques qui doivent contrôler une virémie déjà présente. En comparant les caractéristiques des différents volontaires (annexe 2), le contrôle de cette virémie n'est apparemment pas lié à la largeur de la réponse CD4⁺ (Test non paramétrique de Spearman, $r = -0,0973$ et $p = 0,7009$) ou à la quantité d'anticorps développés (Test non paramétrique de Spearman, $r = 0,5105$ et $p = 0,0214$), résultats semblables à la littérature⁴⁵⁴. Pour comprendre les mécanismes qui mènent au contrôle de la virémie, les patrons d'expression du jour 7 des volontaires n'ayant eu que très peu de virus détectés ont été comparés à ceux des volontaires ayant développé beaucoup de virus du YF17D (Figure supplémentaire 6 b). Une signature génique permet de départager ces deux groupes (Figure 4 c et d et document supplémentaire 4). Le contrôle de la virémie est associé à une plus grande expression de gènes induits par les interférons comme IFIT3 et OASL, supportant l'hypothèse qu'une plus forte réponse innée y participe. De plus, le contrôle de la virémie est lié à une grande expression de gènes associés à l'inflammasome, comme IL1B, TLR4 et CASP5 (Figure 4e). L'inflammasome est lié à la protection induite par la réponse innée contre les virus^{556,557}. IL1R2 agit comme un récepteur-antagoniste de IL1B, et son expression relativement plus élevée dans le groupe contrôlant la virémie est possiblement due à une compensation en retour de la surexpression d'IL1B. La réponse immunitaire innée est donc possiblement responsable du contrôle de la virémie via l'inflammasome et des gènes induits par les interférons. L'importance de IL1B est retrouvée par des observations précédentes qui notaient une augmentation d'IL1R1 dans le sang des vaccinés⁴⁵⁸⁻⁴⁶¹. Si ces résultats se confirmaient dans des études comprenant plus de volontaires et avec différents vaccins atténués protecteurs, un futur vaccin thérapeutique

ciblant le contrôle de la virémie devra donc idéalement induire l'expression des gènes de cette signature, dont les gènes induits par les interférons, en plus de s'assurer de la participation de l'inflammasome dans la réponse au vaccin.

4.5 Corrélat de protection immunitaire contre la fièvre jaune

Une réponse immunitaire protectrice se décrit donc avec une multitude de paramètres, et non pas avec un seul comme le voulait la norme récemment¹⁹⁸. Dans la réponse protectrice induite par le vaccin contre la fièvre jaune, l'hépatite A et la variole¹⁴³⁻¹⁴⁵, il est visiblement nécessaire d'avoir une réponse impliquant plusieurs acteurs de l'immunologie innée, dont les DC et les NK, en plus de la participation des TLR et des gènes induits par les interférons. Une réponse protectrice, selon ces mêmes vaccins, se compose d'une réponse à la fois T_{H1} et T_{H2} , ce qui est un nouveau corrélat de protection qui pourra être utilisé dans la conception de futurs vaccins. Selon la présente étude de vaccination contre le YF17D, bien que la réponse T_H peut être variable tant dans son spectre que dans sa force selon les individus, elle doit être polyfonctionnelle. Cette caractéristique est détectable par cytométrie, un moyen efficace, fiable et rapide, ou par puces à ADN, un outil plus sensible. D'ailleurs, les patrons d'expressions mis en évidence ici, une fois comparés avec d'autres vaccins, pourront être des modèles pour l'élaboration de vaccins protecteurs.

Concrètement, cette étude confirme l'importance de l'immunité innée dans les corrélats de protection. De plus, la participation concertée des cellules auxiliaires T_{H1} et T_{H2} est l'une des caractéristiques primordiales de la réponse au YF17D, et est un nouveau corrélat de protection immunitaire identifié par cette analyse. Cette connaissance pourra être employée pour vérifier si les nouveaux vaccins ont cette particularité avant de les essayer dans une large cohorte, étape longue et coûteuse. Comprendre en détails les mécanismes qui mènent à une réponse T_{H1} et T_{H2} permettra de concevoir des vaccins rationnellement, par exemple en s'assurant qu'ils activent efficacement une série de TLR. D'un autre côté, le contrôle de la virémie, le nombre d'épitopes ciblés par les réponses $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi que la voie T_H favorisée par la réponse au vaccin ne sont pas des

corrélats de protection immunitaire valables. En revanche, il est exact d'identifier les mécanismes identifiés dans la Figure 4 comme des corrélats de contrôle de la virémie, utiles pour les vaccins thérapeutiques, et des corrélats de large spectre de réponse $CD4^+$, corrélats utiles contre les virus à haut pouvoir mutagène comme le VIH.

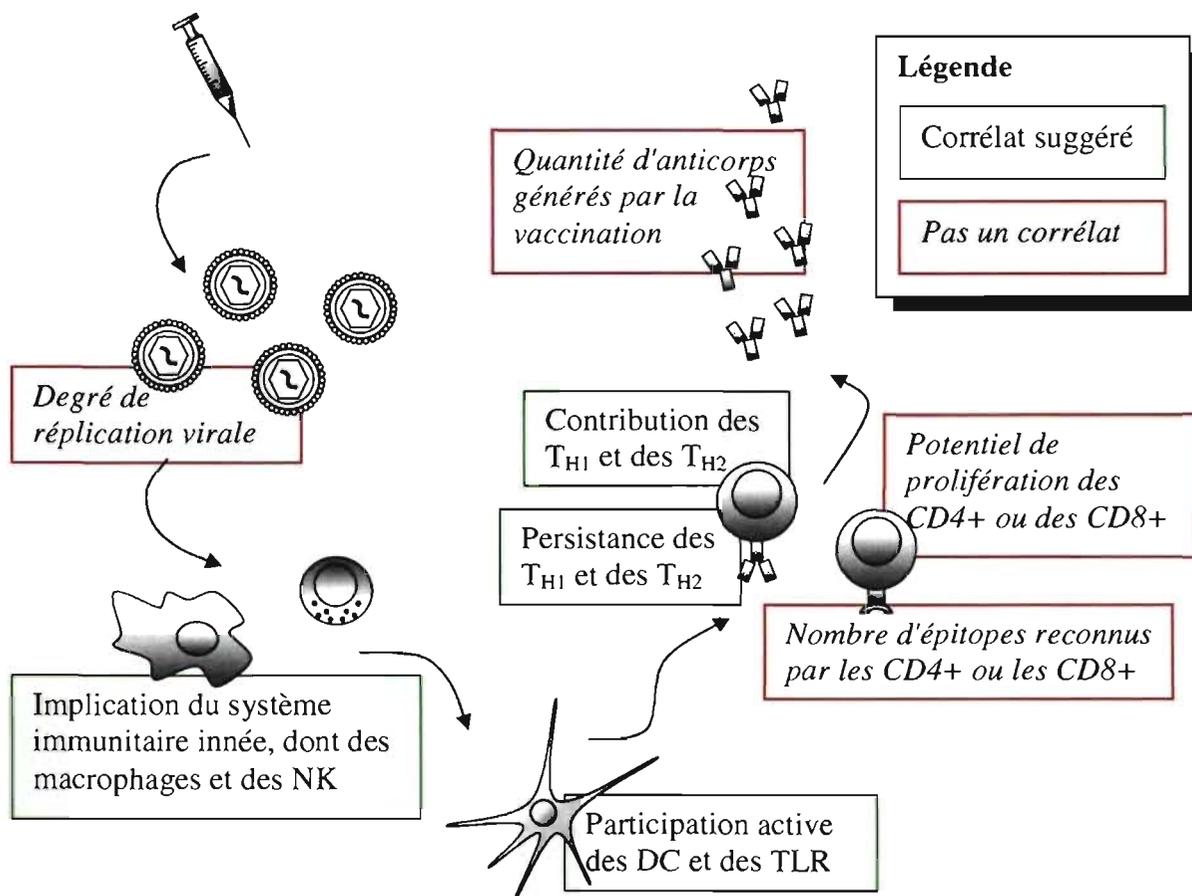


Figure . Corrélats de protection d'une réponse immunitaire efficace contre un vaccin comme suggérés par l'étude.

5. Conclusion

La caractérisation de la réponse immunitaire induite par l'excellent vaccin contre la fièvre jaune YF17D a permis de mieux comprendre les événements qui s'inscrivent dans une réponse immunitaire protectrice. Plusieurs caractéristiques sont maintenant candidats à devenir des corrélats de protection immunitaire et pourront éventuellement servir de base à l'élaboration de futurs vaccins.

Le YF17D induit une réponse immunitaire innée vérifiée par l'augmentation de la transcription des gènes associés aux cellules dendritiques, aux macrophages, aux cellules NK, aux TLR et au système du complément. Ceux-ci sont intimement liés à la réponse adaptative qui comprend la participation remarquable des cellules B et de la production d'anticorps, ainsi que des cellules T auxiliaires et cytotoxiques. Surtout, cette réponse pluricellulaire est spécifique et polyfonctionnelle, ce qui est proposé comme un nouveau corrélat de protection immunitaire. En effet, il a été possible de détecter, suite à une stimulation, la participation de l'expression des gènes tant des cellules T_{H1} que T_{H2} , en plus de la production de plusieurs cytokines associées aux T_{H1} et aux T_{H2} , dont IL-2, -4, -5, -10, TNF et IFN- γ , moins d'une semaine ou même un an après la vaccination.

Suite à une analyse des patrons de transcription après vaccination, il a été possible de définir des mécanismes qui soutiennent la réponse protectrice induite par le vaccin. STAT1, IRF7 et ETS2 sont les points de départ d'une série de modulations de plus d'une cinquantaine de gènes impliqués dans une panoplie de fonctions immunologiques qui font le fondement d'une réponse immunitaire protectrice. Un contrôle remarquable de la virémie est associé à la transcription de gènes reliés à l'inflammasome et à ceux induits par les interférons, alors qu'une large réponse des cellules auxiliaires deux mois après la vaccination est précédée, une semaine après vaccination, par l'expression des gènes impliqués dans la production de l'IL-2 et à l'activation des cellules T et B. Après stimulation de cellules un an après vaccination, d'autres patrons d'expression de cellules mémoires efficaces ont souligné l'importance de STAT1, de IRF1 et de leurs gènes cibles.

Toutes ces caractéristiques, si elles sont confirmées dans l'étude de d'autres vaccins efficaces, seront propres à une réponse protectrice, et donc se révéleront être des corrélats d'une protection immunitaire. Elles pourront alors servir d'assise pour l'élaboration de vaccin contre les maladies redoutées de ce début de millénaire, dont le SIDA, l'hépatite C et le cancer.

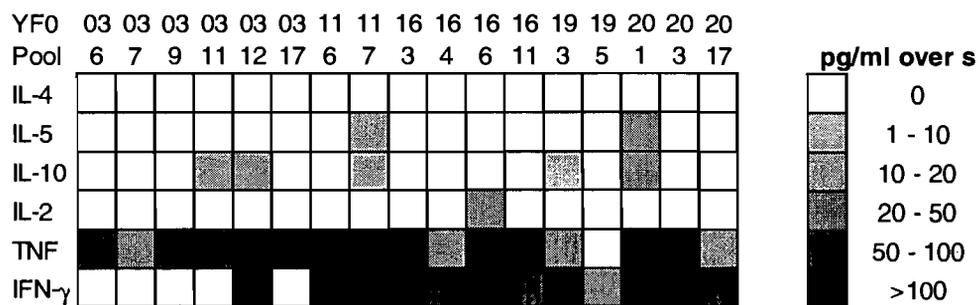
Recommandations

À la suite de cette étude, il est recommandé de :

- Valider les analyses par puce à ADN à l'aide d'expériences plus précises, comme par PCR;
- Vérifier si les gènes impliqués dans la réponse à la vaccination se retrouvent au niveau protéique ;
- Analyser la fonctionnalité des cellules induites par le vaccin contre la fièvre jaune ;
- Confirmer les mécanismes impliqués dans la réponse au vaccin au niveau protéique ;
- Confirmer ces résultats avec l'étude d'autres vaccins protecteurs, et ainsi définir les caractéristiques identifiées ici comme corrélats de protection immunitaire ;
- Reproduire ces études sur des échantillons sanguins de personnes infectées par le virus de la fièvre jaune sauvage pour s'assurer que les caractéristiques identifiées ici sont propres à une réponse immunitaire protectrice ;
- Poursuivre la constitution d'une base de données de *genearray* avec d'autres vaccins, protecteurs ou non, afin de cerner les corrélats de protection immunitaire.

Annexes

Annexe 1. The mixed T_{H1}/T_{H2} antigen-specific response induced by YF17D vaccination is persistent. Supernatants from the Day 365 cultures described in Figure 2i were sampled after 24 hours of incubation, and analyzed by CBA for their content in the T_{H1} cytokines IL-2, IFN- γ and TNF, and the T_{H2} cytokines IL-4, IL-5 and IL-10.



Annexe 2. Caractéristiques des volontaires utilisés pour les tests de Spearman

Volunteers	Highest viremia (# of copies)	nAb titer at day 14 (1/#)	CD4 response at day 60 (# of pool)	CD8 response at day 60 (# of pool)
1	6920	640	22	19
2	24	640	21	9
3	below 22	80	6	4
4	1067	320	5	0
5	1027	320	4	0
6	479	320	N/A	N/A
7	74	160	15	3
8	below 22	0	5	12
9	255	640	21	15
10	185	2560	N/A	N/A
11	1593	1280	2	4
12	335	640	8	2
13	2580	640	18	7
14	747	1280	9	1
15	331	320	5	0
16	1316	640	5	0
17	108	160	3	1
18	673	640	21	9
19	32	160	12	12
20	34	640	22	19

Références

1. Global eradication of smallpox: WHO Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication. *J Med Assoc Thai* **62**, 461 (1979).
2. Pantaleo, G. & Koup, R. A. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med* **10**, 806-10 (2004).
3. Lang, J. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of two 17D yellow fever vaccines. *Am J Trop Med Hyg* **60**, 1045-50 (1999).
4. Nossal, G. J. The Global Alliance for Vaccines and Immunization--a millennial challenge. *Nat Immunol* **1**, 5-8 (2000).
5. Robinson, H. L. & Amara, R. R. T cell vaccines for microbial infections. *Nat Med* **11**, S25-32 (2005).
6. Graham, B. S. Clinical trials of HIV vaccines. *Annu Rev Med* **53**, 207-21 (2002).
7. Burton, D. R. et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* **5**, 233-6 (2004).
8. Harari, A., Petitpierre, S., Vallelian, F. & Pantaleo, G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* **103**, 966-72 (2004).
9. Beutler, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**, 257-63 (2004).
10. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-95 (2004).
11. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-76 (2003).
12. Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **17**, 338-44 (2005).
13. Germain, R. N. An innately interesting decade of research in immunology. *Nat Med* **10**, 1307-20 (2004).
14. Moser, M. & Murphy, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* **1**, 199-205 (2000).
15. Norbury, C. C., Malide, D., Gibbs, J. S., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo. *Nat Immunol* **3**, 265-71 (2002).
16. Cumberbatch, M., Dearman, R. J. & Kimber, I. Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha. *Arch Dermatol Res* **289**, 277-84 (1997).
17. Cumberbatch, M., Dearman, R. J. & Kimber, I. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology* **92**, 388-95 (1997).
18. De Smedt, T. et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* **184**, 1413-24 (1996).
19. Shortman, K. & Liu, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**, 151-61 (2002).
20. Pulendran, B. Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J Immunol* **174**, 2457-65 (2005).

21. Barba-Spaeth, G., Longman, R. S., Albert, M. L. & Rice, C. M. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med* **202**, 1179-84 (2005).
22. Underhill, D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**, 811-5 (1999).
23. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8 (2001).
24. Guillot, L. et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* **280**, 5571-80 (2005).
25. Tabeta, K. et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3516-21 (2004).
26. Poltorak, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-8 (1998).
27. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-31 (2004).
28. Heil, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-9 (2004).
29. Lund, J. M. et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5598-603 (2004).
30. Krieg, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* **20**, 709-60 (2002).
31. Krug, A. et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**, 107-19 (2004).
32. Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**, 513-20 (2003).
33. Takeshita, F. et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* **167**, 3555-8 (2001).
34. Triantafilou, K. et al. Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. *Cell Microbiol* **7**, 1117-26 (2005).
35. Triantafilou, K. et al. TLR8 and TLR7 are involved in the host's immune response to human parechovirus 1. *Eur J Immunol* **35**, 2416-23 (2005).
36. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-7 (1997).
37. Kato, H. et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19-28 (2005).
38. Coban, C. et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* **201**, 19-25 (2005).
39. Yamamoto, M. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-3 (2003).

40. Hoebe, K. et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**, 743-8 (2003).
41. Fitzgerald, K. A. et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**, 1043-55 (2003).
42. Horng, T., Barton, G. M. & Medzhitov, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**, 835-41 (2001).
43. Yamamoto, M. et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**, 6668-72 (2002).
44. Yamamoto, M. et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* **420**, 324-9 (2002).
45. Asselin-Paturel, C. & Trinchieri, G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med* **202**, 461-5 (2005).
46. Kapsenberg, M. L., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A. & Kalinski, P. The role of antigen-presenting cells in the regulation of allergen-specific T cell responses. *Curr Opin Immunol* **10**, 607-13 (1998).
47. Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A. & Kapsenberg, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* **20**, 561-7 (1999).
48. Kapsenberg, M. L. & Kalinski, P. The concept of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. *Immunol Lett* **69**, 5-6 (1999).
49. Iezzi, G., Karjalainen, K. & Lanzavecchia, A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**, 89-95 (1998).
50. Tybulewicz, V. L. Chemokines and the immunological synapse. *Immunology* **106**, 287-8 (2002).
51. Wong, M. M. & Fish, E. N. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* **15**, 5-14 (2003).
52. Iezzi, G., Scotet, E., Scheidegger, D. & Lanzavecchia, A. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* **29**, 4092-101 (1999).
53. van Stipdonk, M. J. et al. Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. *Nat Immunol* **4**, 361-5 (2003).
54. Badovinac, V. P., Porter, B. B. & Harty, J. T. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* **5**, 809-17 (2004).
55. Badovinac, V. P., Porter, B. B. & Harty, J. T. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* **3**, 619-26 (2002).
56. Reyes-Sandoval, A., Harty, J. T. & Todryk, S. M. Viral vector vaccines make memory T cells against malaria. *Immunology* **121**, 158-65 (2007).
57. Borrow, P. et al. CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8+ CTL response. *J Exp Med* **183**, 2129-42 (1996).
58. Bourgeois, C., Rocha, B. & Tanchot, C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* **297**, 2060-3 (2002).
59. Janssen, E. M. et al. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852-6 (2003).
60. Shedlock, D. J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-9 (2003).

61. Sun, J. C. & Bevan, M. J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**, 339-42 (2003).
62. Sun, J. C., Williams, M. A. & Bevan, M. J. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* **5**, 927-33 (2004).
63. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-57 (1986).
64. Lund, R. J. et al. Genome-wide identification of novel genes involved in early Th1 and Th2 cell differentiation. *J Immunol* **178**, 3648-60 (2007).
65. Rogge, L. et al. Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **25**, 96-101 (2000).
66. Bonecchi, R. et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* **187**, 129-34 (1998).
67. Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R. & Lanzavecchia, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* **187**, 875-83 (1998).
68. Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-96 (1997).
69. Szabo, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-69 (2000).
70. Szabo, S. J. et al. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* **295**, 338-42 (2002).
71. Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K. & Ray, A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* **272**, 21597-603 (1997).
72. Ansel, K. M., Lee, D. U. & Rao, A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* **4**, 616-23 (2003).
73. Foulds, K. E., Wu, C. Y. & Seder, R. A. Th1 memory: implications for vaccine development. *Immunol Rev* **211**, 58-66 (2006).
74. Wu, C. Y. et al. Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. *Nat Immunol* **3**, 852-8 (2002).
75. Wherry, E. J. et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* **4**, 225-34 (2003).
76. Maldonado-Lopez, R. & Moser, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol* **13**, 275-82 (2001).
77. O'Garra, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**, 275-83 (1998).
78. Trinchieri, G. Immunobiology of interleukin-12. *Immunol Res* **17**, 269-78 (1998).
79. Lighvani, A. A. et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15137-42 (2001).
80. Afkarian, M. et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* **3**, 549-57 (2002).

81. Rogge, L. et al. The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J Immunol* **161**, 6567-74 (1998).
82. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765 (2001).
83. Villarino, A. V., Huang, E. & Hunter, C. A. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol* **173**, 715-20 (2004).
84. Fearon, D. T. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* **388**, 323-4 (1997).
85. Gorden, K. B. et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* **174**, 1259-68 (2005).
86. Ito, T., Wang, Y. H. & Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* **26**, 221-9 (2005).
87. Coccia, E. M. et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* **34**, 796-805 (2004).
88. Heit, A. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 9 expression is not required for CpG DNA-aided cross-presentation of DNA-conjugated antigens but essential for cross-priming of CD8 T cells. *J Immunol* **170**, 2802-5 (2003).
89. Datta, S. K. et al. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* **170**, 4102-10 (2003).
90. Pulendran, B. et al. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* **167**, 5067-76 (2001).
91. Dillon, S. et al. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* **172**, 4733-43 (2004).
92. Netea, M. G. et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* **172**, 3712-8 (2004).
93. Sing, A. et al. *Yersinia V*-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* **196**, 1017-24 (2002).
94. Agrawal, S. et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* **171**, 4984-9 (2003).
95. Redecke, V. et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* **172**, 2739-43 (2004).
96. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219-26 (2004).
97. Imanishi, T. et al. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol* **178**, 6715-9 (2007).
98. Curtsinger, J. M. et al. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **162**, 3256-62 (1999).
99. Curtsinger, J. M., Lins, D. C. & Mescher, M. F. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* **197**, 1141-51 (2003).

100. Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. & Mescher, M. F. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* **174**, 4465-9 (2005).
101. Prlic, M., Hernandez-Hoyos, G. & Bevan, M. J. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J Exp Med* **203**, 2135-43 (2006).
102. Blattman, J. N. et al. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 657-64 (2002).
103. Gourley, T. S., Wherry, E. J., Masopust, D. & Ahmed, R. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* **16**, 323-33 (2004).
104. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-52 (1998).
105. Ahmed, R. & Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**, 54-60 (1996).
106. Demkowicz, W. E., Jr., Littau, R. A., Wang, J. & Ennis, F. A. Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. *J Virol* **70**, 2627-31 (1996).
107. Amara, R. R., Nigam, P., Sharma, S., Liu, J. & Bostik, V. Long-lived poxvirus immunity, robust CD4 help, and better persistence of CD4 than CD8 T cells. *J Virol* **78**, 3811-6 (2004).
108. Hammarlund, E. et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* **9**, 1131-7 (2003).
109. Crotty, S. et al. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol* **171**, 4969-73 (2003).
110. Rubbert, A. et al. Multifactorial nature of noncytolytic CD8+ T cell-mediated suppression of HIV replication: beta-chemokine-dependent and -independent effects. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**, 63-9 (1997).
111. Levy, J. A., Mackewicz, C. E. & Barker, E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* **17**, 217-24 (1996).
112. Pal, R. et al. Inhibition of HIV-1 infection by the beta-chemokine MDC. *Science* **278**, 695-8 (1997).
113. Migueles, S. A. et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* **3**, 1061-8 (2002).
114. Manz, R. A., Thiel, A. & Radbruch, A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* **388**, 133-4 (1997).
115. Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K. & Ahmed, R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* **8**, 363-72 (1998).
116. Ochsenbein, A. F. et al. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13263-8 (2000).
117. Kaech, S. M. et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191-8 (2003).

118. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-12 (1999).
119. Campbell, J. J. et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* **166**, 877-84 (2001).
120. Oh, J. E., Krapfenbauer, K., Fountoulakis, M., Frischer, T. & Lubec, G. Evidence for the existence of hypothetical proteins in human bronchial epithelial, fibroblast, amnion, lymphocyte, mesothelial and kidney cell lines. *Amino Acids* **26**, 9-18 (2004).
121. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L. & Lefrancois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**, 2413-7 (2001).
122. Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. & Jenkins, M. K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**, 101-5 (2001).
123. Vander Heiden, M. G. et al. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* **21**, 5899-912 (2001).
124. Boothby, M., Mora, A. L. & Stephenson, L. M. Lymphokine-dependent proliferation of T-lymphoid cells: regulated responsiveness and role in vivo. *Crit Rev Immunol* **21**, 487-522 (2001).
125. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**, 745-63 (2004).
126. Geginat, J., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* **101**, 4260-6 (2003).
127. Faint, J. M. et al. Memory T cells constitute a subset of the human CD8+CD45RA+ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics. *J Immunol* **167**, 212-20 (2001).
128. Grogan, J. L. et al. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* **14**, 205-15 (2001).
129. Appay, V. et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* **8**, 379-85 (2002).
130. Champagne, P. et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* **410**, 106-11 (2001).
131. Chisari, F. V. & Ferrari, C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* **13**, 29-60 (1995).
132. Bertoni, R. et al. Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis. *J Clin Invest* **100**, 503-13 (1997).
133. Maini, M. K. et al. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* **117**, 1386-96 (1999).
134. Rehmann, B. et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* **181**, 1047-58 (1995).

135. Jung, M. C. et al. Activation of a heterogeneous hepatitis B (HB) core and e antigen-specific CD4+ T-cell population during seroconversion to anti-HBe and anti-HBs in hepatitis B virus infection. *J Virol* **69**, 3358-68 (1995).
136. Ferrari, C. et al. Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest* **88**, 214-22 (1991).
137. Mizukoshi, E. et al. Cellular immune responses to the hepatitis B virus polymerase. *J Immunol* **173**, 5863-71 (2004).
138. Ota, M. O. et al. Influence of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J Immunol* **168**, 919-25 (2002).
139. Bertoletti, A. & Maini, M. K. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr Opin Microbiol* **3**, 387-92 (2000).
140. Franzese, O. et al. Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* **79**, 3322-8 (2005).
141. Xu, D. et al. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* **177**, 739-47 (2006).
142. Inchauspe, G. & Michel, M. L. Vaccines and immunotherapies against hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Viral Hepat* **14 Suppl 1**, 97-103 (2007).
143. Lambert, P. H., Liu, M. & Siegrist, C. A. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nat Med* **11**, S54-62 (2005).
144. Amanna, I. J., Slifka, M. K. & Crotty, S. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. *Immunol Rev* **211**, 320-37 (2006).
145. Pulendran, B. & Ahmed, R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849-63 (2006).
146. Kuekrek, H. et al. Differential effect of interleukin-2 treatment on primary and secondary immunizations in HIV infected individuals. *Aids* **19**, 1967-74 (2005).
147. Letvin, N. L. Progress toward an HIV vaccine. *Annu Rev Med* **56**, 213-23 (2005).
148. Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. & Liu, M. A. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* **15**, 617-48 (1997).
149. Egan, M. A. et al. Simian immunodeficiency virus (SIV) gag DNA-vaccinated rhesus monkeys develop secondary cytotoxic T-lymphocyte responses and control viral replication after pathogenic SIV infection. *J Virol* **74**, 7485-95 (2000).
150. Barouch, D. H. et al. Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 immunity. *J Immunol* **172**, 6290-7 (2004).
151. Reyes-Sandoval, A. et al. Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes. *J Virol* **78**, 7392-9 (2004).
152. Shiver, J. W. & Emini, E. A. Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu Rev Med* **55**, 355-72 (2004).
153. Yang, Z. Y. et al. Overcoming immunity to a viral vaccine by DNA priming before vector boosting. *J Virol* **77**, 799-803 (2003).

154. Le Bon, A. et al. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J Immunol* **176**, 4682-9 (2006).
155. Tan, P. H. et al. Modulation of human dendritic-cell function following transduction with viral vectors: implications for gene therapy. *Blood* **105**, 3824-32 (2005).
156. Yang, Y., Ertl, H. C. & Wilson, J. M. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* **1**, 433-42 (1994).
157. Singh, M. & O'Hagan, D. T. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res* **19**, 715-28 (2002).
158. Yip, H. C. et al. Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response. *J Immunol* **162**, 3942-9 (1999).
159. Gupta, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* **32**, 155-172 (1998).
160. Wheeler, A. W., Marshall, J. S. & Ulrich, J. T. A Th1-inducing adjuvant, MPL, enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines. *Int Arch Allergy Immunol* **126**, 135-9 (2001).
161. Gustafson, G. L. & Rhodes, M. J. Bacterial cell wall products as adjuvants: early interferon gamma as a marker for adjuvants that enhance protective immunity. *Res Immunol* **143**, 483-8; discussion 573-4 (1992).
162. Ulrich, J. T. & Myers, K. R. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol* **6**, 495-524 (1995).
163. Hemmi, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-5 (2000).
164. Klinman, D. M., Barnhart, K. M. & Conover, J. CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* **17**, 19-25 (1999).
165. Broide, D. et al. Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* **161**, 7054-62 (1998).
166. Hartmann, G. et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **164**, 1617-24 (2000).
167. Bangham, A. D., Horne, R. W., Glauert, A. M., Dingle, J. T. & Lucy, J. A. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* **196**, 952-5 (1962).
168. Kensil, C. R. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **13**, 1-55 (1996).
169. Evans, T. G. et al. QS-21 promotes an adjuvant effect allowing for reduced antigen dose during HIV-1 envelope subunit immunization in humans. *Vaccine* **19**, 2080-91 (2001).
170. Douek, D. C., Kwong, P. D. & Nabel, G. J. The rational design of an AIDS vaccine. *Cell* **124**, 677-81 (2006).
171. Stevenson, M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* **9**, 853-60 (2003).
172. Sousa, A. E., Carneiro, J., Meier-Schellersheim, M., Grossman, Z. & Victorino, R. M. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the

- pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* **169**, 3400-6 (2002).
173. Giorgi, J. V. et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* **179**, 859-70 (1999).
 174. Billich, A. AIDSVAX VaxGen. *Curr Opin Investig Drugs* **5**, 214-21 (2004).
 175. Letvin, N. L. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol* **6**, 930-9 (2006).
 176. Robinson, H. L. HIV/AIDS vaccines: 2007. *Clin Pharmacol Ther* **82**, 686-93 (2007).
 177. Whatmore, A. M. et al. Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence. *J Virol* **69**, 5117-23 (1995).
 178. Learmont, J. C. et al. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med* **340**, 1715-22 (1999).
 179. Thorner, A. R. & Barouch, D. H. HIV-1 Vaccine Development: Progress and Prospects. *Curr Infect Dis Rep* **9**, 71-5 (2007).
 180. Letvin, N. L. et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science* **312**, 1530-3 (2006).
 181. Emini, E. A. & Koff, W. C. AIDS/HIV. Developing an AIDS vaccine: need, uncertainty, hope. *Science* **304**, 1913-4 (2004).
 182. McMichael, A. J. HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* **24**, 227-55 (2006).
 183. Cooney, E., McElrath, M. & Corey, L. Enhanced immunity to human immunodeficiency virus (HIV) envelope elicited by a combined vaccine regimen consisting of priming with a vaccinia recombinant expressing HIV envelope and boosting with gp160 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1882 (1993).
 184. Corey, L., McElrath, M. & Weinhold, K. Cytotoxic T cell and neutralizing antibody responses to HIV-1 envelope with a combination vaccine regimen. *J. Infect. Dis.* **177**, 301 (1998).
 185. Hammond, S., Bollinger, R. & Stanhope, P. Comparative clonal analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4+ and CD8+ cytolytic T lymphocytes isolated from seronegative humans immunized with candidate HIV-1 vaccines. *J. Exp. Med.* **176**, 1531 (1992).
 186. El-Daher, N., Keefer, M. & Reichman, R. Persisting human immunodeficiency virus type 1 gp160-specific human T lymphocyte responses including CD8+ cytotoxic activity after receipt of envelope vaccines. *J. Infect. Dis.* **168**, 306 (1993).
 187. Clements-Mann, M., Matthews, T. & Weinhold, K. HIV-1 immune responses induced by canarypox (ALVAC)-gp160 MN, SF-2 rgp120, or both vaccines in seronegative adults. *J. Infect. Dis.* **177**, 1230 (1998).
 188. Evans, T., Keefer, M. & Weinhold, K. A canarypox vaccine expressing multiple HIV-1 genes given alone or with rgp120 elicits broad and durable CD8+ CTL responses in seronegative volunteers. *J. Infect. Dis.* **180**, 290 (1999).
 189. Belshe, R., Gorse, G. & Mulligan, M. Induction of immune responses to HIV-1 by canarypox virus (ALVAC) HIV-1 and gp120 SF-2 recombinant vaccines in uninfected volunteers. *AIDS* **12**, 2407 (1998).

190. Salmon-Ceron, D., Excler, J. & Finkielsztejn, L. Safety and immunogenicity of a live recombinant canarypox virus expressing HIV type 1 gp120 MN tm/gag/protease LAI (ALVAC-HIV, vCP205) followed by a p24E-V3 MN synthetic peptide (CLTB-36) administered in healthy volunteers at low risk for HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**, 633 (1999).
191. Belshe, R., Stevens, C. & Gorse, G. Safety and immunogenicity of a canarypox-vectored human immunodeficiency virus type 1 vaccine with or without gp120: a phase 2 study in higher- and lower-risk volunteers. *J. Infect. Dis.* **183**, 1343 (2001).
192. Ferrari, G., Humphrey, W. & McElrath, M. Clade B-based HIV-1 vaccines elicit cross-clade cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1396 (1997).
193. Redfield, R. R. et al. Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *N Engl J Med* **316**, 673-6 (1987).
194. Hirsch, V. M. et al. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J Virol* **70**, 3741-52 (1996).
195. Santra, S. et al. Recombinant canarypox vaccine-elicited CTL specific for dominant and subdominant simian immunodeficiency virus epitopes in rhesus monkeys. *J Immunol* **168**, 1847-53 (2002).
196. Evans, T. G. et al. A canarypox vaccine expressing multiple human immunodeficiency virus type 1 genes given alone or with rgp120 elicits broad and durable CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in seronegative volunteers. *J Infect Dis* **180**, 290-8 (1999).
197. Letvin, N. L. Correlates of immune protection and the development of a human immunodeficiency virus vaccine. *Immunity* **27**, 366-9 (2007).
198. Sekaly, R. P. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med* **205**, 7-12 (2008).
199. Malim, M. H. & Emerman, M. HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. *Cell* **104**, 469-72 (2001).
200. Korber, B. et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**, 1789-96 (2000).
201. Wei, X. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307-12 (2003).
202. Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. & Petropoulos, C. J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4144-9 (2003).
203. Phogat, S., Wyatt, R. T. & Karlsson Hedestam, G. B. Inhibition of HIV-1 entry by antibodies: potential viral and cellular targets. *J Intern Med* **262**, 26-43 (2007).
204. Allen, T. M. et al. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* **407**, 386-90 (2000).
205. Goulder, P. J. et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* **3**, 212-7 (1997).

206. Mascola, J. R. Defining the protective antibody response for HIV-1. *Curr Mol Med* **3**, 209-16 (2003).
207. Mascola, J. R. et al. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol* **73**, 4009-18 (1999).
208. Prince, A., Reesink, H. & Pascual, D. Prevention of HIV infection by passive immunization with HIV immunoglobulin. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**, 971 (1991).
209. Putkonen, P., Thorstensson, R. & Ghavamzadeh, L. Prevention of HIV-2 and SIVsm infection by passive immunization in cynomolgus monkeys. *Nature* **352**, 436 (1991).
210. Baba, T., Liska, V. & Hofmann-Lehmann, R. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* **6**, 200 (2000).
211. Mascola, J., Lewis, M. & Stiegler, G. Protection of macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* **73**, 4009 (1999).
212. Parren, P. W. & Burton, D. R. The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv Immunol* **77**, 195-262 (2001).
213. Haigwood, N., Watson, A. & Sutton, W. Passive immune globulin therapy in the SIV/macaque model: early intervention can alter disease profile. *Immunol. Lett.* **51**, 107 (1996).
214. Amara, R. R. et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* **292**, 69-74 (2001).
215. Barouch, D. H. et al. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* **290**, 486-92 (2000).
216. Hirsch, V., Fuerst, T. & Sutter, G. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J. Virol.* **70**, 3741 (1996).
217. Ourmanov, I., Brown, C. & Moss, B. Comparative efficacy of recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing simian immunodeficiency virus (SIV) Gag-Pol and/or Env in macaques challenged with pathogenic SIV. *J. Virol.* **74**, 2740 (2000).
218. Leno, M., Kowalski, M. & Robert-Guroff, M. CD8 T cell anti-HIV activity as a complementary protective mechanism in vaccinated chimpanzees. *AIDS* **14**, 893 (2000).
219. Allen, T., Vogel, T. & Fuller, D. Introduction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J. Immunol.* **164**, 4968 (2000).
220. Buge, S., Richardson, E. & Alipanah, S. An adenovirus-simian immunodeficiency virus env vaccine elicits humoral, cellular, and mucosal immune responses in rhesus macaques and decreases viral burden following vaginal challenge. *J. Virol.* **71**, 8531 (1997).

221. Abimiku, A., Robert-Guroff, M. & Benson, J. Long-term survival of SIVmac251-infected macaques previously immunized with NYVAC-SIV vaccines. *J. Acq. Immun. Defic. Syndr.* **15**, S78 (1997).
222. Davis, N., Caley, I. & Brown, K. Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J. Virol.* **74**, 371 (2000).
223. Egan, M., Charini, W. & Kuroda, M. Simian immunodeficiency virus (SIV) gag DNA-vaccinated rhesus monkeys develop secondary cytotoxic T-lymphocyte responses and control viral replication after pathogenic SIV infection. *J. Virol.* **74**, 7485 (2000).
224. Barouch, D., Santra, S. & Schmitz, J. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* **290**, 486 (2001).
225. Amara, R., Villinger, F. & Altman, J. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* **292**, 69 (2001).
226. Cafaro, A., Caputo, A. & Fracasso, C. Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine. *Nat. Med.* **5**, 643 (1999).
227. Reimann, K., Tenner, R., K & Racz, P. Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J. Virol.* **68**, 2362 (1994).
228. Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P. & Levy, J. A. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* **234**, 1563-6 (1986).
229. Cocchi, F. et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-5 (1995).
230. Koup, R. A. et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**, 4650-5 (1994).
231. Ogg, G. S. et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* **279**, 2103-6 (1998).
232. Zhang, D. et al. Most antiviral CD8 T cells during chronic viral infection do not express high levels of perforin and are not directly cytotoxic. *Blood* **101**, 226-35 (2003).
233. Zajac, A. J. et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* **188**, 2205-13 (1998).
234. Wherry, E. J., Barber, D. L., Kaech, S. M., Blattman, J. N. & Ahmed, R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16004-9 (2004).
235. Wherry, E. J., Blattman, J. N. & Ahmed, R. Low CD8 T-cell proliferative potential and high viral load limit the effectiveness of therapeutic vaccination. *J Virol* **79**, 8960-8 (2005).
236. Shankar, P. et al. Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* **96**, 3094-101 (2000).
237. Trautmann, L. et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* **12**, 1198-202 (2006).

238. Siliciano, R., Lawton, T., Knall, C., Karr, R. & Berman, P. Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones: effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4+ cell depletion. *Cell* **54**, 561 (1988).
239. Pitcher, C. J. et al. HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* **5**, 518-25 (1999).
240. Fowke, K., Nagelkerke, N. & Kimani, J. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* **348**, 1347 (1996).
241. Rowland-Jones, S., Sutton, J. & Ariyoshi, K. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat. Med.* **1**, 59 (1995).
242. Fowke, K. R. et al. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* **348**, 1347-51 (1996).
243. Clerici, M., Levin, J. & Kessler, H. HIV-specific T-helper activity in seronegative health care workers exposed to contaminated blood. *JAMA* **271**, 42 (1994).
244. Pinto, L., Sullivan, J. & Berzofsky, J. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. *J. Clin. Invest.* **96**, 867 (1995).
245. Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* **27**, 406-16 (2007).
246. Deacon, N., Tsykin, A. & Solomon, A. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from blood transfusion donor recipients. *Science* **270**, 988 (1995).
247. Kirchhoff, F., Greenough, T. & Brettler, D. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **332**, 228 (1995).
248. Wagner, R., Leschonsky, B. & Harrer, E. Molecular and functional analysis of a conserved CTL epitope in HIV-1 p24 recognized from a long-term nonprogressor: constraints on immune escape associated with targeting a sequence essential for viral replication. *J. Immunol.* **162**, 3727 (1999).
249. Rosenberg, E., Billingsley, J. & Caliendo, A. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**, 1447 (1997).
250. Ortiz, G., Nixon, D. & Trkola, A. HIV-1-specific immune responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Invest.* **104**, R13 (1999).
251. Bernard, N. F. et al. HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in immunologically normal HIV-infected persons. *Aids* **12**, 2125-39 (1998).
252. Pontesilli, O. et al. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte responses: a predominant gag-specific response is associated with nonprogressive infection. *J Infect Dis* **178**, 1008-18 (1998).
253. Geberding, J. Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personnel at risk for blood exposure: final report from a longitudinal study. *J. Infect. Dis.* **170**, 1410 (1994).

254. Wolinsky, S., Wike, C. & Korber, B. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* **255**, 1134 (1992).
255. Folgori, A. et al. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* **12**, 190-7 (2006).
256. Qureshi, S. A. Hepatitis C virus--biology, host evasion strategies, and promising new therapies on the horizon. *Med Res Rev* **27**, 353-73 (2007).
257. Logvinoff, C. et al. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10149-54 (2004).
258. Takaki, A. et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* **6**, 578-82 (2000).
259. Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M., Jr. & Lemon, S. M. Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J Biol Chem* **280**, 16739-47 (2005).
260. Yoneyama, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-7 (2004).
261. Sumpter, R., Jr. et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* **79**, 2689-99 (2005).
262. Gale, M., Jr. & Foy, E. M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* **436**, 939-45 (2005).
263. Su, A. I. et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15669-74 (2002).
264. Polyak, S. J., Khabar, K. S., Rezeiq, M. & Gretch, D. R. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* **75**, 6209-11 (2001).
265. Bode, J. G. et al. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *Faseb J* **17**, 488-90 (2003).
266. Li, K. et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2992-7 (2005).
267. Weeratna, R. D., Makinen, S. R., McCluskie, M. J. & Davis, H. L. TLR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848). *Vaccine* **23**, 5263-70 (2005).
268. Decalf, J. et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *J Exp Med* **204**, 2423-37 (2007).
269. Choo, Q. L. et al. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1294-8 (1994).
270. Rosa, D. et al. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1759-63 (1996).
271. Nevens, F. et al. A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **38**, 1289-96 (2003).

272. Rollier, C. et al. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. *J Virol* **78**, 187-96 (2004).
273. Statistique_Canada. *Principales causes de décès sélectionnées, selon le sexe* (Ottawa, 2004).
274. Pullarkat, V. et al. A phase I trial of SD-9427 (progenipointin) with a multipeptide vaccine for resected metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* **9**, 1301-12 (2003).
275. Schaed, S. G. et al. T-cell responses against tyrosinase 368-376(370D) peptide in HLA*A0201+ melanoma patients: randomized trial comparing incomplete Freund's adjuvant, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and QS-21 as immunological adjuvants. *Clin Cancer Res* **8**, 967-72 (2002).
276. Smith, J. M. et al. Multiprotein HIV type 1 clade B DNA/MVA vaccine: construction, safety, and immunogenicity in Macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 654-65 (2004).
277. Jaeger, E. et al. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer* **66**, 162-9 (1996).
278. Cormier, J. N. et al. Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am* **3**, 37-44 (1997).
279. Speiser, D. E. et al. Evaluation of melanoma vaccines with molecularly defined antigens by ex vivo monitoring of tumor-specific T cells. *Semin Cancer Biol* **13**, 461-72 (2003).
280. Rosenberg, S. A., Yang, J. C. & Restifo, N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* **10**, 909-15 (2004).
281. Powell, D. J., Jr. & Rosenberg, S. A. Phenotypic and functional maturation of tumor antigen-reactive CD8+ T lymphocytes in patients undergoing multiple course peptide vaccination. *J Immunother (1997)* **27**, 36-47 (2004).
282. Monsurro, V. et al. Quiescent phenotype of tumor-specific CD8+ T cells following immunization. *Blood* **104**, 1970-8 (2004).
283. Appay, V. et al. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J Immunol* **177**, 1670-8 (2006).
284. Boon, T., Coulie, P. G., Eynde, B. J. V. d. & Bruggen, P. v. d. Human T Cell Responses Against Melanoma. *Annual Review of Immunology* **24**, 175-208 (2006).
285. Lee, P. P. et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* **5**, 677-85 (1999).
286. Speiser, D. E. et al. In vivo activation of melanoma-specific CD8(+) T cells by endogenous tumor antigen and peptide vaccines. A comparison to virus-specific T cells. *Eur J Immunol* **32**, 731-41 (2002).
287. Robbins, P. et al. Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J Immunol.* **169**, 6036 (2002).

288. Topalian, S., Gonzales, M., Parkhurst, M., Li, Y. & Southwood, S. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J. Exp. Med.* **183**, 1965 (1996).
289. Mazzocchi, A. et al. Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors (CTLp) interacting with autologous tumor via the T-cell receptor: limiting dilution analysis of specific CTLp in peripheral blood and tumor-invaded lymph nodes of melanoma patients. *Int. J. Cancer* **58**, 330 (1994).
290. Sensi, M. & Parmiani, G. Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses. *Immunol. Today* **16**, 588 (1995).
291. Hanagiri, T., van Baren, N., Neyns, B., Boon, T. & Coulie, P. Analysis of one of the rare melanoma patients with a spontaneous CTL response to a MAGE-A3 peptide presented by HLA-A1. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 178 (2006).
292. Lonchay, C., van der Bruggen, P., Connerotte, T., Hanagiri, T. & Coulie, P. Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14631 (2004).
293. Jager, E., Nagata, Y., Gnjatic, S., Wada, H. & Stockert, E. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4760 (2000).
294. Jager, E., Gnjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E. & Jager, D. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12198 (2000).
295. Valmori, D., Dutoit, V., Lienard, D., Rimoldi, D. & Pittet, M. Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res.* **60**, 4499 (2000).
296. Griffioen, M., Borghi, M., Schrier, P. & Osanto, S. Detection and quantification of CD8+ T cells specific for HLA-A*0201-binding melanoma and viral peptides by the IFN- γ -ELISPOT assay. *Int. J. Cancer* **93**, 549 (2001).
297. Zorn, E. & Hercend, T. A MAGE-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing human primary melanoma lesion. *Eur. J. Immunol.* **29**, 602 (1999).
298. Ferradini, L., Mackensen, A., Genevee, C., Bosq, J. & Duvillard, P. Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion. *J. Clin. Invest.* **91**, 1183 (1993).
299. Mackensen, A., Ferradini, L., Carcelain, G., Triebel, F. & Faure, F. Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer Res.* **53**, 3569 (1993).
300. Germeau, C., Ma, W., Schiavetti, F., Lurquin, C. & Henry, E. High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J. Exp. Med.* **201**, 241 (2005).
301. Dunbar, P., Smith, C., Chao, D., Salio, M. & Shepherd, D. A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J. Immunol.* **165**, 6644 (2000).

302. Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., Nagorsen, D. & Schmittel, A. High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int. J. Cancer* **87**, 659 (2000).
303. Halpern, A. & Schuchter, L. Prognostic models in melanoma. *Semin. Oncol.* **24**, S2 (1997).
304. Clemente, C. et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* **77**, 1303 (1996).
305. Mihm, M., Clemente, C. & Cascinelli, N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab. Invest.* **74**, 43 (1996).
306. Vesalainen, S., Lipponen, P., Talja, M. & Syrjanen, K. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer* **30A**, 1797 (1994).
307. Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A. & Saigenji, K. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**, 3491 (1998).
308. Schumacher, K., Haensch, W., Roefzaad, C. & Schlag, P. Prognostic significance of activated CD8+ T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* **61**, 3932 (2001).
309. Zhang, L., Conejo-Garcia, J., Katsaros, D., Gimotty, P. & Massobrio, M. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 203 (2003).
310. Molldrem, J., Lee, P., Wang, C., Felio, K. & Kantarjian, H. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* **6**, 1018 (2000).
311. van Oijen, M., Bins, A., Elias, S., Sein, J. & Weder, P. On the role of melanoma-specific CD8+ T-cell immunity in disease progression of advanced-stage melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4754 (2004).
312. Marincola, F., Jaffee, E., Hicklin, D. & Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* **74**, 181 (2000).
313. Garcia-Lora, A., Algarra, I. & Garrido, F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell. Physiol.* **195**, 346 (2003).
314. Kageshita, T., Ishihara, T., Campoli, M. & Ferrone, S. Selective monomorphic and polymorphic HLA class I antigenic determinant loss in surgically removed melanoma lesions. *Tissue Antigens* **65**, 419 (2005).
315. Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K. & Borsellino, G. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.* **201**, 1257 (2005).
316. Gorelik, L. & Flavell, R. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- signaling in T cells. *Nat. Med.* **7**, 1118 (2001).
317. Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V. & Colau, D. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* **9**, 1269 (2003).

318. Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N., Toscano, M. & Ilarregui, J. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: a potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* **5**, 241 (2004).
319. Dong, H., Strome, S., Salomao, D., Tamura, H. & Hirano, F. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793 (2002).
320. van den Eynde, B. & van der Bruggen, P. Peptide database of T-cell defined tumor antigens. *Cancer Immunol.* cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm (2005).
321. Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M. & Wolfel, C. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269**, 1281 (1995).
322. Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A. & Tucker, M. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat. Genet.* **12**, 97 (1996).
323. Linard, B., Bezieau, S., Benlalam, H., Labarriere, N. & Guilloux, Y. A ras-mutated peptide targeted by CTL infiltrating a human melanoma lesion. *J. Immunol.* **168**, 4802 (2002).
324. Davis, I., Chen, W., Jackson, H., Parente, P. & Shackleton, M. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4+ and CD8+ T cell responses in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10697 (2004).
325. Sharkey, M., Lizee, G., Gonzales, M., Patel, S. & Topalian, S. CD4+ T-cell recognition of mutated B-RAF in melanoma patients harboring the V599E mutation. *Cancer Res.* **64**, 1595 (2004).
326. De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. & Szikora, J. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* **40**, 360 (1994).
327. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C. & De Plaen, E. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643 (1991).
328. Chomez, P. et al. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* **61**, 5544 (2001).
329. Haas, G., D'Cruz, O. & De, B. L. Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* **18**, 47 (1988).
330. Ruault, M. et al. New BAGE (B melanoma antigen) genes mapping to the juxtacentromeric regions of human chromosomes 13 and 21 have a cancer/testis expression profile. *Eur. J. Hum. Genet.* **10**, 833 (2002).
331. De Backer, O., Arden, K., Boretti, M., Vantomme, V. & De Smet, C. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res.* **59**, 3157 (1999).
332. Lethe, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C. & Godelaine, D. LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int. J. Cancer* **76**, 903 (1998).

333. Chen, Y., Scanlan, M., Sahin, U., Tureci, O. & Gure, A. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1914 (1997).
334. Gure, A., Wei, I., Old, L. & Chen, Y. The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. *Int. J. Cancer* **101**, 448 (2002).
335. Gure, A., Tureci, O., Sahin, U., Tsang, S. & Scanlan, M. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int. J. Cancer* **72**, 965 (1997).
336. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V. & Dreno, B. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int. J. Cancer* **80**, 219 (1999).
337. Coulie, P., Karanikas, V., Colau, D., Lurquin, C. & Landry, C. A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10290 (2001).
338. Karanikas, V., Lurquin, C., Colau, D., van Baren, N. & De Smet, C. Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus. *J. Immunol.* **171**, 4898 (2003).
339. Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D. & Keikavoussi, P. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* **190**, 1669 (1999).
340. Godelaine, D., Carrasco, J., Lucas, S., Karanikas, V. & Schuler-Thurner, B. Polyclonal CTL responses observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with a MAGE-3.A1 peptide. *J. Immunol.* **171**, 4893 (2003).
341. Gajewski, T., Fallarino, F., Ashikari, A. & Sherman, M. Immunization of HLA-A2+ melanoma patients with MAGE-3 or MelanA peptide-pulsed autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12. *Clin. Cancer Res.* **7**, S895 (2001).
342. Chianese-Bullock, K., Pressley, J., Garbee, C., Hibbitts, S. & Murphy, C. MAGE-A1-, MAGE-A10-, and gp100-derived peptides are immunogenic when combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and montanide ISA-51 adjuvant and administered as part of a multi-peptide vaccine for melanoma. *J. Immunol.* **174**, 3080 (2005).
343. Bettinotti, M., Panelli, M., Ruppe, E., Mocellin, S. & Phan, G. Clinical and immunological evaluation of patients with metastatic melanoma undergoing immunization with the HLA-Cw*0702-associated epitope MAGE-A12:170-178. *Int. J. Cancer* **105**, 210 (2003).
344. Marchand, M., Punt, C., Aamdal, S., Escudier, B. & Kruit, W. Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report. *Eur. J. Cancer* **39**, 70 (2003).
345. Kruit, W., van Ojik, H., Brichard, V., Escudier, B. & Dorval, T. Phase 1/2 study of subcutaneous and intradermal immunization with a recombinant MAGE-3 protein in patients with detectable metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* **117**, 596 (2005).

346. Zhang, Y., Sun, Z., Nicolay, H., Meyer, R. & Renkvist, N. Monitoring of anti-vaccine CD4 T cell frequencies in melanoma patients vaccinated with a MAGE-3 protein. *J. Immunol.* **174**, 2404 (2005).
347. Schuler-Thurner, B., Schultz, E., Berger, T., Weinlich, G. & Ebner, S. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**, 1279 (2002).
348. Zhang, Y., Renkvist, N., Sun, Z., Schuler-Thurner, B. & Glaichenhaus, N. A polyclonal anti-vaccine CD4 T cell response detected with HLA-DP4 multimers in a melanoma patient vaccinated with MAGE-3.DP4-peptide-pulsed dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1066 (2005).
349. van Baren, N., Bonnet, M.-C., Dréno, B., Khammari, A. & Dorval, T. Tumoral and immunological responses following vaccination of metastatic melanoma patients with an ALVAC virus encoding two Mage antigens recognized by T cells. *J. Clin. Oncol.* **23**, 9008-21 (2006).
350. Ikeda, H., Lethé, B., Lehmann, F., van Baren, N. & Baurain, J. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* **6**, 199 (1997).
351. Kessler, J., Beekman, N., Bres-Vloemans, S., Verdijk, P. & van Veelen, P. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* **193**, 73 (2001).
352. Schmitz, M., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F. & Stevanovic, S. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* **60**, 4845 (2000).
353. Schmidt, S., Schag, K., Muller, M., Weck, M. & Appel, S. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood* **102**, 571 (2003).
354. Vonderheide, R., Hahn, W., Schultze, J. & Nadler, L. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **10**, 673 (1999).
355. Parkhurst, M. et al. Immunization of patients with the hTERT:540-548 peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4688 (2004).
356. Ayyoub, M., Migliaccio, M., Guillaume, P., Lienard, D. & Cerottini, J. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8+ T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2642 (2001).
357. Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C. & De Plaen, E. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **178**, 489 (1993).
358. Coulie, P., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T. & Schneider, J. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **180**, 35 (1994).
359. Bakker, A., Schreurs, M., de Boer, A., Kawakami, Y. & Rosenberg, S. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **179**, 1005 (1994).

360. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P. & Rivoltini, L. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **180**, 347 (1994).
361. Yee, C., Thompson, J., Roche, P., Byrd, D. & Lee, P. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of T cell-mediated vitiligo. *J. Exp. Med.* **192**, 1637 (2000).
362. Kawakami, Y. et al. The use of melanosomal proteins in the immunotherapy of melanoma. *J. Immunother.* **21**, 237 (1998).
363. Speiser, D., Lienard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V. & Rimoldi, D. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J. Clin. Invest.* **115**, 739 (2005).
364. Yu, Z., Theoret, M., Touloukian, C., Surman, D. & Garman, S. Poor immunogenicity of a self/tumor antigen derives from peptide-MHC-I instability and is independent of tolerance. *J. Clin. Invest.* **114**, 551 (2004).
365. Parkhurst, M., Salgaller, M., Southwood, S., Robbins, P. & Sette, A. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J. Immunol.* **157**, 2539 (1996).
366. Pass, H., Schwarz, S., Wunderlich, J. & Rosenberg, S. Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay. *Cancer J. Sci. Am.* **4**, 316 (1998).
367. Clay, T., Custer, M., McKee, M., Parkhurst, M. & Robbins, P. Changes in the fine specificity of gp100209-217-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.1 anchor residue. *J. Immunol.* **162**, 1749 (1999).
368. Valmori, D., Fonteneau, J., Lizana, C., Gervois, N. & Lienard, D. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J. Immunol.* **160**, 1750 (1998).
369. Rivoltini, L., Squarcina, P., Loftus, D., Castelli, C. & Tarsini, P. A superagonist variant of peptide MART1/Melan A27-35 elicits anti-melanoma CD8+ T cells with enhanced functional characteristics: implication for more effective immunotherapy. *Cancer Res.* **59**, 301 (1999).
370. Valmori, D., Levy, F., Miconnet, I., Zajac, P. & Spagnoli, G. Induction of potent antitumor CTL responses by recombinant vaccinia encoding a melan-A peptide analogue. *J. Immunol.* **164**, 1125 (2000).
371. Dutoit, V., Rubio-Godoy, V., Pittet, M., Zippelius, A. & Dietrich, P. Degeneracy of antigen recognition as the molecular basis for the high frequency of naive A2/Melan-A peptide multimer+ CD8+ T cells in humans. *J. Exp. Med.* **196**, 207 (2002).
372. Ayyoub, M., Zippelius, A., Pittet, M., Rimoldi, D. & Valmori, D. Activation of human melanoma reactive CD8+ T cells by vaccination with an immunogenic peptide analog derived from Melan-A/melanoma antigen recognized by T cells. *Clin. Cancer Res.* **9**, 669 (2003).
373. Chen, J., Dunbar, P., Gileadi, U., Jager, E. & Gnjatic, S. Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J. Immunol.* **165**, 948 (2000).

374. Romero, P., Dutoit, V., Rubio-Godoy, V., Lienard, D. & Speiser, D. CD8+ T-cell response to NY-ESO-1: relative antigenicity and in vitro immunogenicity of natural and analogue sequences. *Clin. Cancer Res.* **7**, S766 (2001).
375. Cebon, J., Jager, E., Shackleton, M., Gibbs, P. & Davis, I. Two phase I studies of low dose recombinant human IL-12 with Melan-A and influenza peptides in subjects with advanced malignant melanoma. *Cancer Immun.* **3**, 7 (2003).
376. Slingluff, C., Petroni, G., Yamshchikov, G., Hibbitts, S. & Grosh, W. Immunologic and clinical outcomes of vaccination with a multiepitope melanoma peptide vaccine plus low-dose interleukin-2 administered either concurrently or on a delayed schedule. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4474 (2004).
377. Slingluff, C., Petroni, G., Yamshchikov, G., Barnd, D. & Eastham, S. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4016 (2003).
378. Mitchell, M., Harel, W., Kempf, R., Hu, E. & Kan-Mitchell, J. Active-specific immunotherapy for melanoma. *J. Clin. Oncol.* **8**, 856 (1990).
379. Rosenberg, S., Yang, J. & Restifo, N. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* **10**, 909 (2004).
380. Banchereau, J., Palucka, A., Dhodapkar, M., Burkeholder, S. & Taquet, N. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* **61**, 6451 (2001).
381. Hersey, P., Menzies, S., Halliday, G., Nguyen, T. & Farrelly, M. Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 125 (2004).
382. Butterfield, L., Ribas, A., Dissette, V., Amarnani, S. & Vu, H. Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* **9**, 998 (2003).
383. de Vries, I., Lesterhuis, W., Scharenborg, N., Engelen, L. & Ruiter, D. Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5091 (2003).
384. Lau, R., F, W., Jeffery, G., Marty, V. & Kuniyoshi, J. Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* **24**, 66 (2001).
385. Baldo, M., Schiavon, M., Cicogna, P., Boccato, P. & Mazzoleni, F. Spontaneous regression of subcutaneous metastasis of cutaneous melanoma. *Plast. Reconstr. Surg.* **90**, 1073 (1992).
386. Rosenberg, S. & Dudley, M. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14639 (2004).
387. Speiser, D., Kyburz, D., Stubi, U., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. Discrepancy between in vitro measurable and in vivo virus neutralizing cytotoxic T cell reactivities. Low T cell receptor specificity and avidity sufficient for in vitro proliferation or cytotoxicity to peptide-coated target cells but not for in vivo protection. *J. Immunol.* **149**, 972 (1992).

388. Wang, E., Miller, L., Ohnmacht, G., Mocellin, S. & Perez-Diez, A. Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. *Cancer Res.* **62**, 3581 (2002).
389. Carter, H. R. *Yellow Fever: An Epidemiological and Historical Study of Its Place of Origin* (ed. Wilkins, W. a.) (Baltimore, 1931).
390. Garrison, F. H. *An Introduction to the History of Medicine with Medical Chronology, Suggestions for Study, an Bibliographical Data* (ed. Saunders, W.) (Philadelphia, 1929).
391. Powell, J. H. *Bring Out Your Dead* (University of Pennsylvania Press, Philadelphia, 1949).
392. Duffy, J. *Sword of Pestilence* (LSU Press, Baton Rouge, LA, 1966).
393. Coleman, W. *Yellow Fever in the North* (University of Wisconsin Press, Madison, 1987).
394. Finlay, C. El mosquito hipoteticamente considerado como agente de transmision de la fiebre amarilla. *Anal Real Acad Ciencias Med Fisicas Naturales* **18**, 147 (1881).
395. Robertson, S. E. et al. Yellow fever: a decade of reemergence. *Jama* **276**, 1157-62 (1996).
396. Barnett, E. D. Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* **44**, 850-6 (2007).
397. Querec, T. 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* **203**, 413-24 (2006).
398. WHO. Progress in the control of yellow fever in Africa. *Wkly Epidemiol Rec* **80**, 50-5 (2005).
399. Monath, T. in *Vaccines* (ed. Orenstein, W. A.) 1095-1176 (Saunders, Philadelphia, 2004).
400. Reiter, P. et al. First recorded outbreak of yellow fever in Kenya, 1992-1993. II. Entomologic investigations. *Am J Trop Med Hyg* **59**, 650-6 (1998).
401. Monath, T. P. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines* **4**, 553-74 (2005).
402. Monath, T. P. Yellow fever: a medically neglected disease. Report on a seminar. *Rev Infect Dis* **9**, 165-75 (1987).
403. Berry, G. P. & Kitchen, S. F. Yellow fever accidentally contracted in the laboratory: a study of seven cases. *Am J Trop Med Hyg* **11**, 365 (1931).
404. Kerr, J. A. *The clinical aspects and diagnosis of yellow fever* (ed. Stronde, G.) (McGraw-Hill, New York, 1951).
405. Beeuwkes, H. Clinical manifestations of yellow fever in the West African native as observed during four extensive epidemics of the disease in the Gold Coast and Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1**, 61 (1936).
406. Arroyo, J. I. et al. Effect of human gamma interferon on yellow fever virus infection. *Am J Trop Med Hyg* **38**, 647-50 (1988).
407. Stephen, E. L. et al. Effect of a nuclease-resistant derivative of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid complex on yellow fever in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Infect Dis* **136**, 122-6 (1977).
408. Co, M. D., Terajima, M., Cruz, J., Ennis, F. A. & Rothman, A. L. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine:

- identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology* **293**, 151-63 (2002).
409. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. in *Fields' Virology. Vol I* (ed. Howley, P. M.) (Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001).
410. Brennan, J. L. et al. Bionanoconjugation via click chemistry: The creation of functional hybrids of lipases and gold nanoparticles. *Bioconjug Chem* **17**, 1373-5 (2006).
411. Muylaert, I. R., Chambers, T. J., Galler, R. & Rice, C. M. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology* **222**, 159-68 (1996).
412. Muylaert, I. R., Galler, R. & Rice, C. M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J Virol* **71**, 291-8 (1997).
413. Schlesinger, J. J., Brandriss, M. W., Putnak, J. R. & Walsh, E. E. Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. *J Gen Virol* **71** (Pt 3), 593-9 (1990).
414. Nestorowicz, A., Chambers, T. J. & Rice, C. M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: effects on proteolytic processing, viral replication, and evidence for alternative processing of the NS2A protein. *Virology* **199**, 114-23 (1994).
415. Kummerer, B. M. & Rice, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* **76**, 4773-84 (2002).
416. Turell, M. J. in *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology* (ed. Monath, T. P.) 127-152 (CRC Press, Boca Raton, FL, 1988).
417. Tigertt, W. D., Berge, T. O. & Gochenour, W. S. Experimental yellow fever. *Trans N Y Acad Sci* **22**, 323 (1960).
418. Monath, T. P., Brinker, K. R., Chandler, F. W., Kemp, G. E. & Cropp, C. B. Pathophysiologic correlations in a rhesus monkey model of yellow fever with special observations on the acute necrosis of B cell areas of lymphoid tissues. *Am J Trop Med Hyg* **30**, 431-43 (1981).
419. Klotz, O. & Belt, T. H. Pathology of the liver in yellow fever. *Am J Pathol* **6**, 663 (1930).
420. Monath, T. P., Ballinger, M. E., Miller, B. R. & Salaun, J. J. Detection of yellow fever viral RNA by nucleic acid hybridization and viral antigen by immunocytochemistry in fixed human liver. *Am J Trop Med Hyg* **40**, 663-8 (1989).
421. De Brito, T. et al. Human fatal yellow fever. Immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. *Pathol Res Pract* **188**, 177-81 (1992).
422. Cannel, D. E. Myocardial degenerations in yellow fever. *Am J Pathol* **4**, 431 (1928).
423. Lloyd, W., Theiler, M. & Ricci, N. I. Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **29**, 481 (1936).
424. Sawyer, W. A. Persistence of yellow fever immunity. *J Prev Med* **5**, 413 (1931).

425. Bauer, J. H. & Hudson, N. P. Duration of immunity in human yellow fever as shown by protective power of serum. *J Prev Med* **4**, 177 (1930).
426. Mathews, J. H. et al. T-helper cell and associated antibody response to synthetic peptides of the E glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus. *J Virol* **65**, 5141-8 (1991).
427. Rothman, A. L., Kurane, I. & Ennis, F. A. Multiple specificities in the murine CD4+ and CD8+ T-cell response to dengue virus. *J Virol* **70**, 6540-6 (1996).
428. Lobigs, M., Arthur, C. E., Mullbacher, A. & Blanden, R. V. The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology* **202**, 195-201 (1994).
429. Spertzl, R. O., Kosch, P. C. & Gilbertson, S. H. *Annual Progress Report* (ed. Diseases, A. M. R. I. o. I.) (Fort Detrick, MD, U.S., 1972).
430. Hindle, E. A experimental study of yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **22**, 405 (1928-1929).
431. Theiler, M. & Smith, H. H. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. *J Exp Med* **65**, 801 (1937).
432. Theiler, M. & Smith, H. H. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation fo human immunization. *J Exp Med* **65**, 787 (1937).
433. Smith, H. H., Penna, H. A. & Paoliello, A. Yellow fever vaccination with cultured virus (17D) without immune serum. *Am J Trop Med Hyg* **18**, 437 (1938).
434. Hahn, C. S., Dalrymple, J. M., Strauss, J. H. & Rice, C. M. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2019-23 (1987).
435. Fatal viral encephalitis following 17D yellow fever vaccine inoculation. Report of a case in a 3-year-old child. *Jama* **198**, 671-2 (1966).
436. Jennings, A. D. et al. Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine-associated human encephalitis. *J Infect Dis* **169**, 512-8 (1994).
437. Pletnev, A. G., Bray, M. & Lai, C. J. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* **67**, 4956-63 (1993).
438. Ryman, K. D., Ledger, T. N., Campbell, G. A., Watowich, S. J. & Barrett, A. D. Mutation in a 17D-204 vaccine substrain-specific envelope protein epitope alters the pathogenesis of yellow fever virus in mice. *Virology* **244**, 59-65 (1998).
439. Chambers, T. J. & Nickells, M. Neuroadapted yellow fever virus 17D: genetic and biological characterization of a highly mouse-neurovirulent virus and its infectious molecular clone. *J Virol* **75**, 10912-22 (2001).
440. van Der Most, R. G., Murali-Krishna, K., Ahmed, R. & Strauss, J. H. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol* **74**, 8094-101 (2000).
441. Schlesinger, J. J. et al. Replication of yellow fever virus in the mouse central nervous system: comparison of neuroadapted and non-neuroadapted virus and partial sequence analysis of the neuroadapted strain. *J Gen Virol* **77** (Pt 6), 1277-85 (1996).
442. Ryman, K. D., Xie, H., Ledger, T. N., Campbell, G. A. & Barrett, A. D. Antigenic variants of yellow fever virus with an altered neurovirulence phenotype in mice. *Virology* **230**, 376-80 (1997).

443. Tesh, R. B. et al. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. *J Infect Dis* **183**, 1431-6 (2001).
444. Xiao, S. Y., Zhang, H., Guzman, H. & Tesh, R. B. Experimental yellow fever virus infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *J Infect Dis* **183**, 1437-44 (2001).
445. McArthur, M. A., Suderman, M. T., Mutebi, J. P., Xiao, S. Y. & Barrett, A. D. Molecular characterization of a hamster viscerotropic strain of yellow fever virus. *J Virol* **77**, 1462-8 (2003).
446. Dunster, L. M. et al. Molecular and biological changes associated with HeLa cell attenuation of wild-type yellow fever virus. *Virology* **261**, 309-18 (1999).
447. Barrett, A. D. Yellow fever vaccines. *Biologicals* **25**, 17-25 (1997).
448. Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. & Harrison, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**, 291-8 (1995).
449. Mandl, C. W., Allison, S. L., Holzmann, H., Meixner, T. & Heinz, F. X. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J Virol* **74**, 9601-9 (2000).
450. Louis, J. J., Chopard, P. & Larbre, F. Un cas d'encephalite après vaccination anti-amarile par la souche 17D. *Pediatric* **36**, 547-50 (1981).
451. Stuart, G. in *Yellow Fever Vaccination* (ed. Smithburn, K.) (Organisation mondiale de la santé, Genève, 1956).
452. Kitchener, S. Viscerotropic and neurotropic disease following vaccination with the 17D yellow fever vaccine, ARILVAX. *Vaccine* **22**, 2103-5 (2004).
453. Scherer, C. A. et al. Distinct gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients infected with vaccinia virus, yellow fever 17D virus, or upper respiratory infections. *Vaccine* **25**, 6458-73 (2007).
454. Brandler, S. et al. Replication of chimeric yellow fever virus-dengue serotype 1-4 virus vaccine strains in dendritic and hepatic cells. *Am J Trop Med Hyg* **72**, 74-81 (2005).
455. Wu, S. J. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* **6**, 816-20 (2000).
456. Hamberger, J. F., Chen, W. & Myers, G. A. Biodistribution of ChimeriVax(TM)-West Nile vaccine following subcutaneous administration to cynomolgus macaques. *Am J Trop Med Hyg* **71** (Suppl.), 70 (2004).
457. Fagraeus, A., Ehrnst, A., Klein, E., Patarroyo, M. & Goldstein, G. Characterization of blood mononuclear cells reacting with K 562 cells after yellow fever vaccination. *Cell Immunol* **67**, 37-48 (1982).
458. Wheelock, E. F. & Sibley, W. A. Circulating Virus, Interferon and Antibody after Vaccination with the 17-D Strain of Yellow-Fever Virus. *N Engl J Med* **273**, 194-8 (1965).
459. Hacker, U. T., Erhardt, S., Tschop, K., Jelinek, T. & Endres, S. Influence of the IL-1Ra gene polymorphism on in vivo synthesis of IL-1Ra and IL-1beta after live yellow fever vaccination. *Clin Exp Immunol* **125**, 465-9 (2001).
460. Hacker, U. T. et al. In vivo synthesis of tumor necrosis factor-alpha in healthy humans after live yellow fever vaccination. *J Infect Dis* **177**, 774-8 (1998).

461. Reinhardt, B., Jaspert, R., Niedrig, M., Kostner, C. & L'Age-Stehr, J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol* **56**, 159-67 (1998).
462. Sweet, B. H., Wisseman, C. L., Jr. & Kitaoka, M. Immunological studies with group B arthropod-borne viruses. II. Effect of prior infection with Japanese encephalitis virus on the viremia in human subjects following administration of 17D yellow fever vaccine. *Am J Trop Med Hyg* **11**, 562 (1962).
463. Liprandi, F. Isolation of plaque variants differing in virulence from the 17D strain of yellow fever virus. *J Gen Virol* **56**, 363-70 (1981).
464. Xie, H., Ryman, K. D., Campbell, G. A. & Barrett, A. D. Mutation in NS5 protein attenuates mouse neurovirulence of yellow fever 17D vaccine virus. *J Gen Virol* **79** (Pt 8), 1895-9 (1998).
465. Gould, E. A., Buckley, A., Cane, P. A., Higgs, S. & Cammack, N. Use of a monoclonal antibody specific for wild-type yellow fever virus to identify a wild-type antigenic variant in 17D vaccine pools. *J Gen Virol* **70** (Pt 7), 1889-94 (1989).
466. Pugachev, K. V., Ocran, S. W., Guirakhoo, F., Furby, D. & Monath, T. P. Heterogeneous nature of the genome of the ARILVAX yellow fever 17D vaccine revealed by consensus sequencing. *Vaccine* **20**, 996-9 (2002).
467. Lhuillier, M., Sarthou, J. L. & Cordellier, R. Émergence endémique de la fièvre jaune en Côte d'Ivoire: place de la détection des IgM antiamariles dans la stratégie de surveillance. *Bull World Health Organ* **64**, 415 (1983).
468. Lhuillier, M. & Sarthou, J. L. Intérêt des IgM antiamariles dans le diagnostic et la surveillance épidémiologique de la fièvre jaune. *Ann Virol (Inst Pasteur)* **134E**, 349 (1983).
469. Monath, T. P., Cropp, C. B., Muth, D. J. & Calisher, C. H. Indirect fluorescent antibody test for the diagnosis of yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **75**, 282-6 (1981).
470. Poland, J. D., Calisher, C. H., Monath, T. P., Downs, W. G. & Murphy, K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ* **59**, 895-900 (1981).
471. Monath, T. P. et al. Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine* **20**, 1004-18 (2002).
472. Monath, T. P. et al. Limitations of the complement-fixation test for distinguishing naturally acquired from vaccine-induced yellow fever infection in flavivirus-hyperendemic areas. *Am J Trop Med Hyg* **29**, 624-34 (1980).
473. Monath, T. P. et al. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. *Am J Trop Med Hyg* **66**, 533-41 (2002).
474. Tauraso, N. M. et al. Yellow fever vaccine. IV. Reactogenicity and antibody response in volunteers inoculated with a vaccine free from contaminating avian leukosis viruses. *Proc Soc Exp Biol Med* **139**, 439-46 (1972).
475. Groot, H. & Riberiro, R. B. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine. *Bull World Health Organ* **27**, 699-707 (1962).

476. Freestone, D. S., Ferris, R. D., Weinberg, A. L. & Kelly, A. Stabilized 17D strain yellow fever vaccine: dose response studies, clinical reactions and effects on hepatic function. *J Biol Stand* **5**, 181-6 (1977).
477. Lopes Ode, S., Guimaraes, S. S. & de Carvalho, R. Studies on yellow fever vaccine. III--Dose response in volunteers. *J Biol Stand* **16**, 77-82 (1988).
478. Wisseman, C. L., Jr., Sweet, B. H., Kitaoka, M. & Tamiya, T. Immunological studies with group B arthropod-borne viruses. I. Broadened neutralizing antibody spectrum induced by strain 17D yellow fever vaccine in human subjects previously infected with Japanese encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg* **11**, 550-61 (1962).
479. Rosenzweig, E. C., Babione, R. W. & Wisseman, C. L., Jr. Immunological studies with group B arthropod-borne viruses. IV. Persistence of yellow fever antibodies following vaccination with 17D strain yellow fever vaccine. *Am J Trop Med Hyg* **12**, 230-5 (1963).
480. Receveur, M. C. et al. Yellow fever vaccination of human immunodeficiency virus-infected patients: report of 2 cases. *Clin Infect Dis* **31**, E7-8 (2000).
481. Moss-Blundell, A. J. et al. A clinical study of stabilized 17D strain live attenuated yellow fever vaccine. *J Biol Stand* **9**, 445-52 (1981).
482. Ambrosch, F. et al. Combined vaccination against yellow fever and typhoid fever: a comparative trial. *Vaccine* **12**, 625-8 (1994).
483. Mouchon, D. et al. Étude de la vaccination combinée rougeole-fièvre jaune chez l'enfant Africain âgé de 6 à 10 mois. *Bull Soc Pathol Exot* **83**, 537-51 (1990).
484. Meyer, H. M., Jr. et al. Response of Volta Children to Jet Inoculation of Combined Live Measles, Smallpox and Yellow Fever Vaccines. *Bull World Health Organ* **30**, 783-94 (1964).
485. Yvonnet, B. et al. Simultaneous administration of hepatitis B and yellow fever vaccines. *J Med Virol* **19**, 307-11 (1986).
486. Draper, C. C. A yellow fever vaccine free from avian leucosis viruses. *J Hyg (Lond)* **65**, 505-13 (1967).
487. Tauraso, N. M. et al. Effect of interval between inoculation of live smallpox and yellow-fever vaccines on antigenicity in man. *J Infect Dis* **126**, 362-71 (1972).
488. Bancroft, W. H. et al. Dengue virus type 2 vaccine: reactogenicity and immunogenicity in soldiers. *J Infect Dis* **149**, 1005-10 (1984).
489. Georges, A. J. et al. Thermostability and efficacy in the field of a new, stabilized yellow fever virus vaccine. *Vaccine* **3**, 313-5 (1985).
490. Roche, J. C. et al. Comparative clinical study of a new 17D thermostable yellow fever vaccine. *Vaccine* **4**, 163-5 (1986).
491. Soula, G. et al. Étude d'un nouveau vaccin combiné contre la fièvre jaune et la rougeole chez des enfants âgés de 6 à 24 mois au Mali. *Bull Soc Pathol Exot* **84**, 885-97 (1991).
492. Lhuillier, M. et al. Study of combined vaccination against yellow fever and measles in infants from six to nine months. *J Biol Stand* **17**, 9-15 (1989).
493. Coursaget, P., Fritzell, B., Blondeau, C., Saliou, P. & Diop-Mar, I. Simultaneous injection of plasma-derived or recombinant hepatitis B vaccines with yellow fever and killed polio vaccines. *Vaccine* **13**, 109-11 (1995).

494. Guerra, H. L., Sardinha, T. M., da Rosa, A. P. & Lima e Costa, M. F. Efetividade de vacina antiamarilica 17D: uma avaliação epidemiologica em serviços de saúde. *Rev Panam Salud Publica* **2**, 115-20 (1997).
495. Dumas, R., Forrat, R., Lang, J., Farinelli, T. & Loutan, L. Safety and immunogenicity of a new inactivated hepatitis A vaccine in concurrent administration with a typhoid fever vaccine or a typhoid fever + yellow fever vaccine. *Adv Ther* **14**, 160-7 (1997).
496. Osei-Kwasi, M. et al. Antibody response to 17D yellow fever vaccine in Ghanaian infants. *Bull World Health Organ* **79**, 1056-9 (2001).
497. Brandriss, M. W., Schlesinger, J. J. & Walsh, E. E. Immunogenicity of a purified fragment of 17D yellow fever envelope protein. *J Infect Dis* **161**, 1134-9 (1990).
498. Lobigs, M., Dalgarno, L., Schlesinger, J. J. & Weir, R. C. Location of a neutralization determinant in the E protein of yellow fever virus (17D vaccine strain). *Virology* **161**, 474-8 (1987).
499. OMS. *International Health Regulations (1969): Third Annotated Edition* (Organisation mondiale de la santé, Geneve, 1983).
500. Snijders, E. P., Postmus, S. & Schüffner, W. On the protective power of yellow fever sera and dengue sera against yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg* **14**, 519 (1930).
501. Arroyo, J. et al. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. *J Virol* **78**, 12497-507 (2004).
502. Bhatt, T. R., Crabtree, M. B., Guirakhoo, F., Monath, T. P. & Miller, B. R. Growth characteristics of the chimeric Japanese encephalitis virus vaccine candidate, ChimeriVax-JE (YF/JE SA14--14--2), in *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus*, and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* **62**, 480-4 (2000).
503. Guirakhoo, F. et al. Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. *Virology* **257**, 363-72 (1999).
504. Guirakhoo, F. et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol* **75**, 7290-304 (2001).
505. Pugachev, K. V. et al. Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool. *Am J Trop Med Hyg* **71**, 639-45 (2004).
506. Guirakhoo, F. et al. Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J Virol* **78**, 4761-75 (2004).
507. Molenkamp, R. et al. Yellow fever virus replicons as an expression system for hepatitis C virus structural proteins. *J Virol* **77**, 1644-8 (2003).
508. Monath, T. P. et al. Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. *J Infect Dis* **188**, 1213-30 (2003).

509. Tao, D. et al. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *J Exp Med* **201**, 201-9 (2005).
510. McAllister, A., Arbetman, A. E., Mandl, S., Pena-Rossi, C. & Andino, R. Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. *J Virol* **74**, 9197-205 (2000).
511. Levy, D. E., Marie, I., Smith, E. & Prakash, A. Enhancement and diversification of IFN induction by IRF-7-mediated positive feedback. *J Interferon Cytokine Res* **22**, 87-93 (2002).
512. Malmgaard, L., Salazar-Mather, T. P., Lewis, C. A. & Biron, C. A. Promotion of alpha/beta interferon induction during in vivo viral infection through alpha/beta interferon receptor/STAT1 system-dependent and -independent pathways. *J Virol* **76**, 4520-5 (2002).
513. Wachter, C. et al. Coordinated regulation and widespread cellular expression of interferon-stimulated genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the central nervous system after infection with distinct viruses. *J Virol* **81**, 860-71 (2007).
514. Meister, G. et al. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* **15**, 2149-55 (2005).
515. Gantier, M. P., Sadler, A. J. & Williams, B. R. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunol Cell Biol* **85**, 458-62 (2007).
516. Jinquan, T. et al. CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. *J Immunol* **165**, 1548-56 (2000).
517. Baker, K. M., Wei, G., Schaffner, A. E. & Ostrowski, M. C. Ets-2 and components of mammalian SWI/SNF form a repressor complex that negatively regulates the BRCA1 promoter. *J Biol Chem* **278**, 17876-84 (2003).
518. Basuyaux, J. P., Ferreira, E., Stehelin, D. & Buttice, G. The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner. *J Biol Chem* **272**, 26188-95 (1997).
519. Blumenthal, S. G. et al. Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1, cooperate with GATA3 and HTLV-I Tax1. *J Biol Chem* **274**, 12910-6 (1999).
520. Hagman, J. & Grosschedl, R. An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the mb-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8889-93 (1992).
521. Gallant, S. & Gilkeson, G. ETS transcription factors and regulation of immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **54**, 149-63 (2006).
522. Koizumi, H. et al. Identification of a killer cell-specific regulatory element of the mouse perforin gene: an Ets-binding site-homologous motif that interacts with Ets-related proteins. *Mol Cell Biol* **13**, 6690-701 (1993).
523. Steinman, R. M. & Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419-26 (2007).
524. Kuhn, K. et al. A novel, high-performance random array platform for quantitative gene expression profiling. *Genome Res* **14**, 2347-56 (2004).
525. Loyet, K. M., Ouyang, W., Eaton, D. L. & Stults, J. T. Proteomic profiling of surface proteins on Th1 and Th2 cells. *J Proteome Res* **4**, 400-9 (2005).

526. Jung, Y. O. et al. Toll-like receptor 2 and 4 combination engagement upregulate IL-15 synergistically in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett* **109**, 21-7 (2007).
527. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* **4**, 161-7 (2003).
528. Hawlisch, H. & Kohl, J. Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. *Mol Immunol* **43**, 13-21 (2006).
529. Colantonio, L. et al. Upregulation of integrin alpha6/beta1 and chemokine receptor CCR1 by interleukin-12 promotes the migration of human type 1 helper T cells. *Blood* **94**, 2981-9 (1999).
530. Frasca, L. et al. CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells. *Blood* **107**, 2392-9 (2006).
531. Luster, A. D. & Ravetch, J. V. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* **166**, 1084-97 (1987).
532. Monney, L. et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536-41 (2002).
533. Chizzolini, C., Chicheportiche, R., Burger, D. & Dayer, J. M. Human Th1 cells preferentially induce interleukin (IL)-1beta while Th2 cells induce IL-1 receptor antagonist production upon cell/cell contact with monocytes. *Eur J Immunol* **27**, 171-7 (1997).
534. Odemuyiwa, S. O. et al. Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol* **173**, 5909-13 (2004).
535. Zhang, X. R. et al. Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. *Cell Death Differ* **10**, 203-10 (2003).
536. Laabi, Y. et al. The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. *Nucleic Acids Res* **22**, 1147-54 (1994).
537. Okada, T., Maeda, A., Iwamatsu, A., Gotoh, K. & Kurosaki, T. BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity* **13**, 817-27 (2000).
538. Schluter, C. et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* **123**, 513-22 (1993).
539. Strainic, M. G. et al. Locally Produced Complement Fragments C5a and C3a Provide Both Costimulatory and Survival Signals to Naive CD4+ T Cells. *Immunity* **28**, 1-11 (2008).
540. Rual, J. F. et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**, 1173-8 (2005).
541. Cheng, P. L., Chang, M. H., Chao, C. H. & Lee, Y. H. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. *Oncogene* **23**, 7821-38 (2004).
542. Kretschmer, A. et al. Differential regulation of TGF-beta signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Oncogene* **22**, 6748-63 (2003).

543. Oikawa, K. et al. Neuronal calcium sensor protein visinin-like protein-3 interacts with microsomal cytochrome b5 in a Ca²⁺-dependent manner. *J Biol Chem* **279**, 15142-52 (2004).
544. Borthiry, G. R., Antholine, W. E., Kalyanaraman, B., Myers, J. M. & Myers, C. R. Reduction of hexavalent chromium by human cytochrome b5: generation of hydroxyl radical and superoxide. *Free Radic Biol Med* **42**, 738-55; discussion 735-7 (2007).
545. Rothenberg, E. V. & Taghon, T. Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol* **23**, 601-49 (2005).
546. Leveque, C., Marsaud, V., Renoir, J. M. & Sola, B. Alternative cyclin D1 forms a and b have different biological functions in the cell cycle of B lymphocytes. *Exp Cell Res* **313**, 2719-29 (2007).
547. Kobayashi, K. et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416**, 194-9 (2002).
548. Rufer, E., Leonhardt, R. M. & Knittler, M. R. Molecular architecture of the TAP-associated MHC class I peptide-loading complex. *J Immunol* **179**, 5717-27 (2007).
549. Schneider, P. et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* **189**, 1747-56 (1999).
550. Sakakibara, A., Hattori, S., Nakamura, S. & Katagiri, T. A novel hematopoietic adaptor protein, Chat-H, positively regulates T cell receptor-mediated interleukin-2 production by Jurkat cells. *J Biol Chem* **278**, 6012-7 (2003).
551. Irie, A. et al. Protein kinase D2 contributes to either IL-2 promoter regulation or induction of cell death upon TCR stimulation depending on its activity in Jurkat cells. *Int Immunol* **18**, 1737-47 (2006).
552. Dooms, H., Wolslegel, K., Lin, P. & Abbas, A. K. Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells. *J Exp Med* **204**, 547-57 (2007).
553. Gloire, G., Erneux, C. & Piette, J. The role of SHIP1 in T-lymphocyte life and death. *Biochem Soc Trans* **35**, 277-80 (2007).
554. Hu, W. H. et al. NIBP, a novel NIK and IKK(beta)-binding protein that enhances NF-(kappa)B activation. *J Biol Chem* **280**, 29233-41 (2005).
555. Arimilli, S., Johnson, J. B., Alexander-Miller, M. A. & Parks, G. D. TLR-4 and -6 agonists reverse apoptosis and promote maturation of simian virus 5-infected human dendritic cells through NFkB-dependent pathways. *Virology* **365**, 144-56 (2007).
556. Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D. A. & Tschopp, J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* **19**, 615-22 (2007).
557. Muruve, D. A. et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* **452**, 103-7 (2008).