



Santé
Canada

Health
Canada

Le rôle des marqueurs substitués de l'infection à VIH

**Rapport préparé par : C.M. Tsoukas, M. Sc., M.D.,
FRCP(C) Directeur adjoint Centre sida McGill Montréal
(Québec) Canada**

Canada

Le rôle des marqueurs substitués de l'infection au VIH

**FRCP(C) Directeur adjoint Centre SIDA McGill
Montréal (Québec) Canada**

**Santé Canada
Automne 1995**

Notre mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes à
maintenir et à améliorer leur état de santé.

Santé Canada

© Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1995
Cat. H42-2/66-1995F
ISBN 0-662-99161-3

Collaborateurs :

D^r Jacques Bouchard, Santé Canada (Ottawa)

Ce rapport a été préparé par le D^r C.M. Tsoukas, M. Sc., M.D., FRCP(C), à la demande du Bureau des médicaments, Direction générale de la protection de la santé, Santé Canada.

Le rapport a été étudié et approuvé par le comité consultatif expert sur la thérapie du VIH.

Les opinions et recommandations présentées ici sont celles de l'auteur et des collaborateurs et ne représentent pas nécessairement la position de Santé Canada.

Automne 1995

Table des matières

1.	Introduction	6
1.1	Marqueurs substitués	6
1.2	Déplétion lymphocytaire	7
1.3	Au sujet du rapport	7
2.	Pathophysiologie	9
2.1	Stade précoce (phase immunocompétente)	9
2.2	Stade avancé (phase d'immunodéficience)	10
3.	Marqueurs sérologiques de l'activation des lymphocytes T	12
3.1	Bêta ₂ -microglobuline	12
3.1.1	Dosage	12
3.1.2	Rapport entre la β_2 -M et l'infection à VIH :	12
3.2	Néoptérine	14
3.2.1	Dosage	15
3.2.2	Rapport entre la néoptérine et l'infection à VIH	15
3.3	Récepteur soluble de l'interleukine-2 (IL-2R)	16
3.3.1	Dosage	16
3.3.2	Rapport entre l'IL-2R et l'infection à VIH	17
4.	Marqueurs sérologiques de l'activation des cellules B	19
4.1	Interleukine-6	19
4.2	Immunoglobulines	19
4.3	Complexes immuns circulants	20
5.	Anticorps anti-VIH	21
5.1	Anti-p24	21
5.2	Anti-gp120	22
5.3	Anti-p17	22
5.4	Anti-gp41	22
5.5	Anti-NEF	22
6.	Autres anticorps	24
6.1	Anticorps contre le lupus anticoagulant et anticardiolipine	24
6.2	Anticorps anti-leucocytes	24
6.3	Anticorps anti-CD4 solubles et anti-CD8 solubles	24

Table des matières

(suite)

7.	Autres marqueurs sérologiques	26
7.1	Le facteur de nécrose tumorale (TNF- α)	26
7.2	L'interféron acido-labile des leucocytes humains et la 2-5A synthétase (IFN- α)	26
8.	Marqueurs antigéniques	27
8.1	L'antigène p24	27
9.	Marqueurs de surface cellulaire reflétant l'activation des lymphocytes T	29
10.	Lymphocytes T CD4+	30
10.1	Technologie	30
10.2	Méthodes et normalisation	30
10.2.1	Définition des lymphocytes T	31
10.2.2	Détermination du degré de dysfonction immunologique	31
10.3	Effets des médicaments	34
11.	Discussion et recommandations	35
12.	Glossaire	38
13.	Bibliographie	40

1. Introduction

L'infection causée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est caractérisée par une première phase asymptomatique de durée variable durant laquelle on observe un taux faible ou inexistant de réplication du virus, un dénombrement stable ou légèrement à la baisse de lymphocytes T auxiliaires et des anomalies qualitatives du fonctionnement des lymphocytes T. Pendant plusieurs années, la destruction progressive, lente et irréversible du système immunitaire ne s'accompagne généralement d'aucune manifestation clinique. Il est, en outre, difficile de prédire la probabilité et le stade du développement du syndrome d'immunodéficience acquise (sida) à la suite de la séroconversion. En raison de l'expression clinique variable de cette maladie, l'utilisation de marqueurs non cliniques de la maladie (marqueurs substitués) revêt aujourd'hui une grande importance pour la gestion des cas.

Le spectre complet de l'infection à VIH, incluant le stade initial asymptomatique, est étroitement associé aux anomalies quantifiables observées en laboratoire^{111,112}. Par exemple, la dysfonction du système immunitaire à un stade avancé de la maladie est clairement reliée à une diminution prononcée du nombre de lymphocytes T auxiliaires ainsi qu'à une augmentation de l'antigénémie et de la virémie associées au VIH¹⁵⁰.

1.1 Marqueurs substitués

Par définition, les marqueurs substitués de l'infection à VIH sont des facteurs qui présentent une corrélation avec l'issue de l'infection. Bien que plusieurs marqueurs aient été décrits, quelques-uns seulement s'avèrent prometteurs. Idéalement, ces marqueurs devraient réunir les qualités suivantes :

- 1.** Permettre de reconnaître les personnes présentant le risque le plus élevé de progression de la maladie.
- 2.** Renseigner sur la durée de l'infection.
- 3.** Aider à reconnaître les stades de la maladie.
- 4.** Permettre de prévoir l'apparition de maladies indicatrices (infections opportunistes du sida).
- 5.** Fournir des mesures *in vitro* de l'efficacité thérapeutique des immuno-modulateurs ou des antiviraux.

Ces marqueurs doivent aussi être :

- ! facilement quantifiables
- ! fiables
- ! cliniquement accessibles
- ! abordables

1.2 Déplétion lymphocytaire

La principale caractéristique du sida est la déplétion sélective des CD4+, un sous-groupe de lymphocytes T auxiliaires-inducteurs. Le taux de déplétion CD4+ est le facteur déterminant utilisé à l'heure actuelle dans la formulation des recommandations concernant le traitement aux antirétroviraux. Dans le cas de la plupart des protocoles thérapeutiques expérimentaux, les sujets sont recrutés en fonction du dénombrement de cellules T CD4+, en fonction de la présence ou de l'absence d'une antigénémie, ou en fonction de ces deux critères. L'utilisation de ces marqueurs substituts est également primordiale pour déterminer le moment de l'intervention médicale, pour prévoir les incidences actuarielles et pour planifier les dépenses futures en matière de soins de santé.

1.3 Au sujet du rapport

Le présent rapport porte sur l'état actuel des connaissances ainsi que sur l'utilité clinique et le rôle des marqueurs substituts dans l'histoire naturelle et le traitement de l'infection à VIH.

Outre l'introduction, le rapport est divisé en 11 chapitres.

- ! Le chapitre 2, *Pathophysiologie+, décrit les stades de l'infection à VIH.
- ! Le chapitre 3, *Marqueurs sérologiques de l'activation des lymphocytes T+, décrit le dosage et le rapport avec l'infection à VIH des marqueurs suivants : bêta₂-microglobuline, néoptérine et récepteur de l'interleukine-2 soluble.
- ! Le chapitre 4, *Marqueurs sérologiques de l'activation des cellules B+, décrit l'utilité de divers marqueurs dont l'interleukine-6, les immunoglobulines et les complexes immuns circulants.
- ! Le chapitre 5, *Anticorps anti-VIH+, décrit les anticorps p24, gp120, p17, gp41 et NEF.
- ! Le chapitre 6, *Autres anticorps+, décrit d'autres phénomènes auto-immuns liés au VIH.
- ! Le chapitre 7, *Autres marqueurs sérologiques+, décrit le TNF, l'interféron acido-labile humaine des leukocytes et la 2-5A synthétase.
- ! Le chapitre 8, *Marqueurs antigéniques+, décrit certains marqueurs comme celui de l'antigène p24.

- ! Le chapitre 9, *Marqueurs de surface cellulaire reflétant l'activation des lymphocytes T+, décrit le lien entre les marqueurs d'activation sérologiques et les marqueurs de surface.
- ! Le chapitre 10, *Lymphocytes T CD4+, décrit les techniques, le protocole et les autres éléments liés à l'utilisation des lymphocytes T CD4+ comme marqueurs substitués de l'infection à VIH.
- ! Le chapitre 11, *Discussion et recommandations+, décrit les avantages de l'utilisation des marqueurs substitués ainsi que les critères permettant de définir des marqueurs substitués adéquats et de choisir un marqueur.
- ! Le chapitre 12, *Glossaire+, contient la définition des sigles employés dans le rapport.
- ! Le chapitre 13, *Bibliographie+, donne toutes les références citées dans le document.

2. Pathophysiologie

Des études prospectives de cohortes de grande envergure visant à établir l'histoire naturelle de l'infection à VIH nous permettent de mieux comprendre la pathophysiologie de cette maladie^{46,71,112,197}. Les recherches ont porté sur les marqueurs substitués de deux stades de l'infection à VIH :

- ! précoce (phase immunocompétente)
- ! avancé (phase d'immunodéficience)

2.1 Stade précoce (phase immunocompétente)

Au début de l'infection, la plupart des personnes ont des numérations de leucocytes, de lymphocytes et de lymphocytes T normales. Cependant, des changements surviennent dans les sous-ensembles de lymphocytes T très tôt après la séroconversion. On remarque une augmentation marquée des taux de lymphocytes T CD8+ peu après la séroconversion et un retour rapide à un niveau légèrement supérieur à la valeur de départ¹¹². Cette augmentation est peut-être attribuable à la lutte des lymphocytes contre l'infection à VIH.

Dès les premiers stades de l'infection à VIH, le système immunitaire est sollicité, ce qui se manifeste par l'activation des cellules immunitaires effectrices. Conséquemment, les lymphocytes T deviennent activés et expriment à leur surface cellulaire un nombre accru de récepteurs pour l'IL-2 et d'antigènes présentés par les complexes majeurs d'histocompatibilité de type HLA-DR¹⁵⁵. Des molécules solubles sécrétées par les cellules T activées, ainsi que des anticorps dirigés contre les protéines de l'enveloppe et de noyau du VIH, sont retrouvées en concentrations plus élevées dans le sérum d'individus récemment infectés par le VIH^{6,56}.

Le tableau 2-A énumère les marqueurs et leurs mécanismes d'action pour le stade précoce (phase immunocompétente) de l'infection à VIH.

Tableau 2-A
Marqueurs et mécanismes – Stade précoce (phase immunocompétente)

Type de marqueur (activation)	Mécanisme (dépendant de l'hôte)
Marqueurs cellulaires	HLA-DR+ IL-2R+ Lymphocytes T
Marqueurs solubles	β_2 -M, Néoptérine IL-2R sol. CD4 sol. CD8 sol.
Production d'anticorps	Anti-gp120 Anti-p24 IgA

2.2 Stade avancé (phase d'immunodéficience)

Le stade avancé de l'infection, qui précède le sida proprement dit, se caractérise par :

- ! des modifications de la production de cytokines
- ! une diminution marquée de la capacité de réponse aux néoantigènes¹¹¹
- ! une diminution du nombre de lymphocytes T CD4+¹¹²

On assiste également à une antigénémie et une virémie indicatives d'une réplication virale.

Le tableau 2-B énumère les marqueurs et leurs mécanismes pour le stade avancé (phase d'immunodéficience) de l'infection à VIH.

Tableau 2-B
Marqueurs et mécanismes – Stade avancé (phase d'immunodéficience)

Type de marqueur (dysfonction immunitaire)	Mécanisme (dépendant du virus)
Déplétion des cellules	CD4+ Lymphocytes T
Déplétion des cytokines	IFN IL-2
Déplétion des anticorps	Anti-p24 Anti-gp120

3. Marqueurs sérologiques de l'activation des lymphocytes T

Les trois marqueurs sérologiques de l'activation des lymphocytes T sont

- ! la bêta₂-microglobuline (β_2 -M)
- ! la néoptérine
- ! le récepteur soluble de l'interleukine-2 (IL-2R sol.)

3.1 Bêta₂-microglobuline

La bêta₂-microglobuline (β_2 -M) est un polypeptide constitué de 100 acides aminés (poids moléculaire de 11,8 kilodaltons). Avec la chaîne lourde encodée par le complexe majeur d'histocompatibilité, la β_2 -M contribue à la composition des molécules de classe 1, telles que HLA-A, HLA-B et HLA-C, qui sont exprimées à la surface de la plupart des cellules nucléées⁹⁴. La β_2 -M se retrouve également dans la plupart des fluides biologiques, en faibles concentrations. La protéine β_2 -M est éliminée par les reins où, après filtration glomérulaire, elle est réabsorbée et catabolisée dans les cellules des tubules proximaux. La clairance est très efficace : moins de 0,1 p. 100 de la β_2 -M filtrée est excrétée dans l'urine des personnes en bonne santé. La concentration sérique de la β_2 -M augmente lorsque la filtration glomérulaire diminue ou lorsque la production de cette protéine augmente à la suite de maladies rénales, néoplasiques, inflammatoires ou immunitaires⁷⁴. L'excrétion de la β_2 -M dans l'urine augmente avec le traitement aux antinéoplasiques, antimicrobiens et anti-inflammatoires⁵⁴.

3.1.1 Dosage

La bêta₂-microglobuline est mesurée dans les liquides biologiques au moyen de dosages immunologiques *compétitifs+ quantitatifs commercialement disponibles. On peut utiliser soit la technique immuno-enzymatique (test ELISA) ou la technique de radio-immunodosage compétitif. Dans le cas de la seconde technique, la capacité compétitive de la substance à l'essai est comparée à celle d'étalons de β_2 -M de concentration connue.

3.1.2 Rapport entre la β_2 -M et l'infection à VIH :

En 1982, au début de l'épidémie du sida, les chercheurs ont signalé une augmentation du taux de β_2 -M chez les hommes homosexuels atteints du sida^{22,26,72,182}. À cette époque, le sida était diagnostiqué uniquement à partir des constatations cliniques, mais on utilisait des analyses de laboratoire pour appuyer le diagnostic dans les cas présumés. La grande difficulté était alors de reconnaître la maladie au cours de la phase asymptomatique ou sub-clinique, avant l'apparition des infections opportunistes ou du sarcome de Kaposi. Le VIH n'ayant pas encore été identifié comme

cause du sida, les marqueurs substitués de l'évolution de cette maladie sont apparus prometteurs et on a donc entrepris de les étudier.

Dans une des premières études réalisées, l'augmentation des taux de β_2 -M caractérisait clairement les hommes homosexuels et toxicomanes atteints ou soupçonnés d'être atteints du sida. La quantification de β_2 -M est alors apparue comme un indicateur valable pour le dépistage du sida chez les groupes à risques élevés²¹⁵. Dans deux groupes d'hommes homosexuels, évalués prospectivement en 1983 et 1985, une élévation de la β_2 -M du sang a été constatée chez 64 p. 100 des personnes infectées par le VIH contre 6,7 p. 100 seulement des personnes non infectées¹⁰⁴. Des taux de β_2 -M supérieurs à 3,0 mg/L dans le groupe des personnes infectées furent associés à la progression du sida.

Maladies virales et syndromes lymphoprolifératifs

Des taux élevés de β_2 -M ont été signalés chez des sujets souffrant de nombreuses maladies virales, notamment l'infection à CMV, ainsi que chez des sujets atteints de syndromes lymphoprolifératifs tels que les lymphomes⁵⁴. Étant donné que ces deux états pathologiques peuvent être présents au stade avancé de l'infection à VIH, il est important que l'interprétation des valeurs de β_2 -M dans le sang se fasse en fonction d'un tableau clinique complet. On a constaté une élévation du taux de β_2 -M chez des personnes non infectées appartenant à certains groupes à risques élevés, notamment les hémophiles et les toxicomanes^{20,56,159,175}. Chez ces personnes, la concentration sérique anormale de β_2 -M présentait une bonne corrélation avec l'accroissement des transaminases et l'hépatite chronique sous-jacente, plutôt qu'avec l'utilisation de concentrés de facteurs ou de drogues par voie intraveineuse.

Études longitudinales de groupes à risques élevés

Les résultats de plusieurs études longitudinales menées auprès de groupes à risques élevés démontrent également que la β_2 -M est un marqueur précoce de l'infection à VIH. On a constaté chez la plupart des sujets infectés des concentrations sériques au-dessus de la valeur de base dans les six mois suivant la séroconversion^{11,12,26,48,49,67,75,76,77,78,92}. Si les taux de β_2 -M sont élevés (ou faibles) à la fin de la première année, ils le demeurent pendant plusieurs années.

L'ampleur de la déplétion des lymphocytes T CD4+ n'est pas liée à l'augmentation initiale de β_2 -M durant la première année. Cependant, deux à trois ans après la séroconversion, l'augmentation initiale du taux de β_2 -M montrait une corrélation inversement proportionnelle au taux de déplétion des CD4+. ⁷⁶ L'augmentation des taux de β_2 -M chez les hommes homosexuels constituait l'indicateur le plus puissant de la progression du sida parmi les cohortes européennes, la cohorte de la *Multicenter AIDS Cohort Study+ à Los Angeles et la cohorte du *San Francisco General Hospital+¹³⁵.

Liquide céphalo-rachidien (LCR)

Le rapport [β_2 -M du LCR]/[β_2 -M du sang] peut être d'une certaine utilité comme marqueur pour déceler les troubles neurologiques associés au VIH. Ce rapport semble supérieur, à cet égard, à la concentration de β_2 -M du LCR seulement⁸². Une étude récente, de faible envergure, a révélé la présence de β_2 -M dans le LCR de sujets atteints du syndrome de démence associé au sida⁴⁵.

Autres facteurs

On a remarqué que les taux de β_2 -M dans le sang de femmes enceintes séropositives étaient plus élevés que chez les femmes enceintes séronégatives. Ces taux étaient directement reliés à l'infection à VIH et non à la grossesse, indépendamment de l'âge gestationnel¹¹⁰.

Bien que l'on n'ait remarqué aucune différence ethnique, raciale ou de sexe chez les utilisateurs de drogues injectables séronégatifs, les personnes de race blanche séropositives montraient des taux de β_2 -M plus élevés que les personnes de race noire qui utilisent des drogues injectables et ce, malgré des numérations de lymphocytes T CD4+ comparables²⁰⁸.

Traitement à la zidovudine (AZT)

Les sujets atteints du sida ou du SAS (syndrome associé au sida) traités à l'AZT montrent une baisse de la β_2 -M après 8 à 12 semaines de traitement^{86,87,88}. Toutefois, cette diminution ne dure pas et deux études distinctes montrent que la β_2 -M revient aux valeurs de base observées avant le traitement dans un délai de six mois^{86,87,88}.

Utilité de la β_2 -M comme marqueur de la progression de la maladie chez les enfants

L'utilité du taux sérique de β_2 -M comme marqueur de la progression de la maladie a été étudiée au stade précoce de l'infection à VIH acquise verticalement en période périnatale. Bien qu'à l'âge de six mois les nourrissons infectés ne montrent pas toujours une diminution du nombre de CD4+, la plupart affichent une augmentation du taux sérique de β_2 -M. Les enfants ayant les taux les plus élevés de β_2 -M sont les plus susceptibles de développer le sida^{35,41,116,117,203,204}.

3.2 Néoptérine

La néoptérine (6-D-érythro-trihydroxypropylptérine) est un composé de faible poids moléculaire dérivé de la dihydronéoptérine triphosphate. Ce composé est un intermédiaire de la synthèse de la tétrahydrobioptérine à partir du GPT. Avant l'épidémie du sida, des taux élevés de néoptérine dans le sérum et dans l'urine n'étaient constatés que chez les personnes souffrant de phénylcétonurie atypique, une déficience congénitale de l'hydroxylation de la phénylalanine⁴⁴.

Une augmentation des taux de néoptérine a aussi été signalée dans des états faisant intervenir un renouvellement cellulaire rapide et l'activation du système immunitaire^{81,141}. Les personnes qui reçoivent des modificateurs de réponses biologiques tels que l'interféron alpha, l'interféron gamma, l'interleukine-2 ou le facteur de nécrose tumorale (TNF α), présentent des taux élevés de néoptérine. Les monocytes-macrophages sont une source importante de néoptérine, en particulier ceux qui proviennent des cellules ayant été stimulées par l'interféron gamma⁸¹. La production de néoptérine augmente dans de nombreux syndromes infectieux et inflammatoires comme les infections virales, bactériennes et fongiques, la méningo-encéphalite aseptique, le rejet de greffes rénales, les réactions aiguës du greffon contre l'hôte, les collagénoses vasculaires ainsi que certains stades avancés de certaines maladies malignes^{80,81,141,142}.

On ignore la fonction de la néoptérine.

3.2.1 Dosage

La néoptérine peut être mesurée dans l'urine et dans le sérum²¹¹. On peut déterminer la concentration de néoptérine dans l'urine au moyen d'une technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse¹⁹⁴. Il existe une trousse commerciale de radio-immunodosage pour déterminer la concentration de néoptérine dans le sérum, le plasma et le LCR⁶¹.

3.2.2 Rapport entre la néoptérine et l'infection à VIH

Néoptérine servant de marqueur précoce

Les sujets atteints du sida et du syndrome associé au sida peuvent être facilement distingués des sujets séronégatifs à partir des mesures de néoptérine dans l'urine et le sérum^{1,8,17,18,32,48,49,57,58,59,60,62,63,176}. Les taux de néoptérine dans le sérum et dans l'urine étaient élevés aussi chez les sujets atteints de lymphadénopathie généralisée persistante reliée au VIH et chez les sujets séropositifs asymptomatiques. Par conséquent, il semble qu'un taux élevé de néoptérine dans le sang ou l'urine soit un marqueur très précoce de l'infection à VIH^{98,107,108,162,163}.

Néoptérine et progression de la maladie

Les études longitudinales indiquent une corrélation entre la quantité de néoptérine et la progression de la maladie^{62,99}. Les données de la *Multicentre AIDS Cohort Study+ ont démontré que les taux sériques de néoptérine étaient les indicateurs les plus puissants de la progression du sida. En effet, les taux de néoptérine ont permis non seulement de prévoir la progression de la maladie, mais également le taux de réduction du nombre de lymphocytes T CD4+ jusqu'à trois ans à l'avance¹²⁶.

Sang et LCR

Des augmentations du taux de néoptérine dans le sang et le LCR sont également constatées chez des sujets montrant des complications neurologiques associées au VIH. Ces augmentations sont peut-être l'expression de l'activation des macrophages dans le système nerveux central¹⁸⁴.

Enfants et femmes enceintes

Il n'existe encore aucune certitude sur la valeur de prédiction des taux de néoptérine mesurés chez les femmes enceintes séropositives ou encore chez les enfants ayant contracté le VIH en période périnatale.

3.3 Récepteur soluble de l'interleukine-2 (IL-2R)

L'IL-2R de haute affinité est composé de deux peptides différents liant l'IL-2 : IL-2R α (poids moléculaire de 55 KD) et IL-2R β (poids moléculaire de 75 KD). Après activation des lymphocytes T par un antigène ou un mitogène, l'IL-2R (également connu sous le nom de peptide Tac), est libéré dans le surnageant des cultures cellulaires *in vitro*. Des taux sériques élevés d'IL-2R α se retrouvent aussi *in vivo*, en présence d'affections cliniques associées à l'activation des lymphocytes, notamment la leucémie T de l'adulte, la leucémie à tricholeucocytes, la leucémie lymphoblastique aiguë, la leucémie lymphoïde chronique, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la sarcoïdose et la sclérose en plaques¹⁶⁸.

3.3.1 Dosage

L'IL-2R soluble peut être mesuré dans le sérum par un test ELISA¹⁷³ de type sandwich avec fluorescence¹⁷³ ou un radio-immunos dosage compétitif¹⁹².

3.3.2 Rapport entre l'IL-2R et l'infection à VIH

L'IL-2, ou facteur de croissance des lymphocytes T, est une lymphokine qui est générée par les lymphocytes T activés par un mitogène ou antigène. Cette substance agit biologiquement par interaction avec les récepteurs spécifiques de haute affinité situés à la surface d'autres lymphocytes T activés. L'IL-2R soluble est dérivé de ces lymphocytes T activés. Étant donné que l'activation des lymphocytes T peut amplifier la réplication du VIH, le dépistage des personnes ayant des taux élevés d'IL-2R soluble peut s'avérer important pour le pronostic de la maladie^{79,84}.

La moitié des donneurs de sang séropositifs testés dans le cadre d'une étude montraient une augmentation des taux d'IL-2R soluble comparativement aux témoins séronégatifs¹⁵⁵. Les chercheurs de l'étude ont observé une relation inverse entre les taux de l'IL-2R soluble et la numération des lymphocytes T CD4+.

Dans une autre étude, 73 p. 100 des sujets atteints du sida, 80 p. 100 des personnes atteintes du syndrome associé au sida (SAS) et entre 75 et 85 p. 100 des personnes séropositives asymptomatiques montraient une élévation des taux d'IL-2R soluble⁹⁶. Les taux sériques d'IL-2R soluble correspondaient à la classification du CDC et on a trouvé une corrélation négative avec les lymphocytes T CD4+, la numération lymphocytaire et le rapport CD4+/CD8+, mais non avec la numération des leucocytes ou des cellules B⁷⁹. Les taux les plus élevés d'IL-2R soluble ont été observés chez les sujets atteints de la maladie du groupe IV_D de la classification du CDC (1006 ± 289 U/ml). Des différences significatives ont été observées aussi bien entre les catégories de la classification du CDC qu'entre les personnes séropositives asymptomatiques et les personnes non infectées (210 ± 149 U/ml versus 74 ± 24 U/ml; P < 0,001). L'étude indique que l'augmentation des taux d'IL-2R soluble dans les cas de sida ne résultait pas de la sécrétion du récepteur par la cellule, mais probablement de la destruction de lymphocytes T activés ou de cellules CD4+.

Les sujets atteints de leucémie T associée au HTLV-1 montrent une augmentation des taux sériques d'IL-2R soluble. La quantification de ce marqueur est utile pour établir le diagnostic et prévoir la réaction à la chimiothérapie. Chez les sujets hémophiles, infectés par le VIH et montrant une augmentation des taux sériques d'IL-2R soluble, il peut y avoir un lien avec l'infection par EBV ou CMV plutôt qu'avec un des stades de l'infection à VIH¹³⁸. Il faut faire preuve de prudence dans l'interprétation des résultats sérologiques concernant ce groupe.

Il reste à déterminer si l'IL-2R soluble sera un indicateur utile de la progression de la maladie. On n'a mené aucune étude de cohortes de grande envergure sur l'utilité de la mesure de l'IL-2R soluble dans les liquides biologiques comme marqueur substitut de l'apparition du sida. Bien que ce composé soit associé à l'activation du système immunitaire, son dosage est plus complexe que celui d'autres marqueurs sérologiques. En outre, les systèmes de dosage de l'IL-2R soluble ne sont pas facilement accessibles.

4. Marqueurs sérologiques de l'activation des cellules B

4.1 Interleukine-6

L'activation des cellules B et l'hypergammaglobulinémie ont été observées dans les cas d'infection à VIH. L'IL-6, un facteur de stimulation des cellules B, est présente en plus grande quantité dans le plasma des personnes infectées par le VIH¹³⁷. Aucune corrélation n'a été établie entre la production d'IL-6 et l'état de l'infection à VIH ou la présence d'infections opportunistes. L'IL-6 est produite par les cellules du sarcome de Kaposi et peut agir comme facteur de croissance pour ces cellules¹²¹. Il n'existe aucune information sur la signification de ce marqueur du point de vue du pronostic du développement du sida.

4.2 Immunoglobulines

Des anomalies fonctionnelles des cellules B, y compris l'activation des cellules B polyclonales, l'hypergammaglobulinémie, des titres élevés d'anticorps dirigés contre divers pathogènes et des auto-antigènes, ont été rapportés dès le début de l'épidémie de sida³. Une augmentation des immunoglobulines sériques est également constatée dans l'infection à VIH asymptomatique. La présence d'anticorps IgM anti-p24 est notée entre le 16^e et le 122^e jour qui suivent la séroconversion et la concentration des anticorps IgG anti-VIH augmente entre le 18^e et le 144^e jour^{34,90}. La sécrétion cellulaire spontanée d'immunoglobulines tend à être corrélée négativement avec le pourcentage – mais pas avec le nombre absolu – de lymphocytes T CD4+. ¹³⁰ Au stade avancé de l'infection à VIH, les concentrations sériques d'immunoglobulines peuvent diminuer. Les personnes atteintes du sida montrent une déficience relative ou absolue en IgG₂ et en IgG₄.⁷ La concentration des immunoglobulines de la sous-classe des IgG₂ accuse une baisse importante chez les personnes atteintes du sida et d'une infection pyogène concomitante¹⁴⁹. On ne sait pas encore clairement si l'augmentation des taux d'IgG et d'IgM a une valeur pronostique dans le cas de l'infection à VIH.

Bien que l'on ait constaté une augmentation des taux sanguins d'IgA chez les sujets atteints du sida^{50,53,93,181}, cette augmentation ne se manifeste généralement pas au stade précoce de l'infection à VIH. Une élévation des taux d'IgA peut refléter une réponse immune au VIH, aux pathogènes opportunistes ou à une perte de suppression immunorégulatrice de la production d'IgA. Des études menées auprès de vastes cohortes, telles que la *Vancouver Lymphadenopathy Study+ (VLAS) portant sur des hommes homosexuels^{177,178}, la *Toronto Sexual Contact Study+²⁹, la *Canadian National Hemophilia Immune Study+¹⁹⁷, ont indiqué une corrélation entre l'élévation des taux d'IgA et la progression ultérieure de la maladie.

4.3 Complexes immuns circulants

La réponse humorale à l'infection à VIH entraîne l'augmentation des taux de complexes immuns circulants (CIC). Plusieurs études ponctuelles ont signalé une prévalence accrue de CIC chez les personnes infectées par le VIH^{73,123,213}. L'étude VLAS indique des taux plus élevés de CIC chez les hommes dont l'état évolue vers le sida^{177,178}, tandis que, selon la *San Francisco Men's Health Study+, l'augmentation des taux de CIC n'est pas une indication de la progression de la maladie¹⁷².

5. Anticorps anti-VIH

Le système produit des anticorps anti-VIH dès le début de l'infection. La réponse humorale contre le virus est faiblement neutralisante. Les anticorps qui sont formés sont dirigés contre les principaux produits géniques, à savoir les produits gp120 et gp41 du gène *env*, p66, p51, p33 du gène *pol* et p55, p24, p18 et p15 du gène *gag*.

Les études portant sur la réponse immunitaire de l'organisme au début de l'infection, menées au moyen de différents essais visant à détecter les anticorps, tels que le dosage immuno-enzymatique (ELISA), l'immunofluorescence indirecte (IFA), la radio-immunoprécipitation (RIPA) ou le transfert Western, montrent clairement des différences de sensibilité entre ces essais^{42,43,158}. La toute première réponse humorale est dirigée contre gp160 et p24⁶⁵. Depuis que le premier test permettant le dépistage du VIH a été autorisé par la *United States Food and Drug Administration+, on a tenté d'identifier des profils d'anticorps spécifiques associés à différents stades de la maladie^{144,159}.

Les recherches ont porté, entre autres, sur les anticorps suivants :

- ! anti-p24
- ! anti-gp120
- ! anti-p17
- ! anti-gp41
- ! anti-NEF

5.1 Anti-p24

La progression vers le sida est souvent associée à la diminution, dans le sérum, des titres d'anticorps anti-VIH, en particulier les anticorps anti-p24 dirigés contre les protéines de noyau du VIH^{114,179}. La diminution des anti-p24 précède l'antigénémie p24 et signifie un pronostic défavorable chez les personnes infectées par le VIH^{15,16,55}. Dans une étude prospective britannique menée sur une période de quatre ans auprès de personnes infectées par le VIH, les sujets ne révélant aucun anticorps anti-p24 ou montrant des baisses séquentielles des anticorps anti-p24 avaient le pronostic le plus défavorable. Ces signes pouvaient se manifester dès le 27^e mois qui précédait le diagnostic du sida²¹⁰. Cette étude n'a révélé aucune association entre les anticorps anti-gp41 et anti-gp120 et le dénouement clinique de la maladie, et aucune chute des titres de ces anticorps n'a été observée dans le temps. Les titres neutralisants trouvés n'étaient pas reliés aux titres anti-p24; on a conclu que l'effet protecteur de l'anti-p24 n'était pas le fait d'une neutralisation.

5.2 Anti-gp120

Une étude sur la réponse humorale dirigée contre le VIH chez des hémophiles révèle une corrélation importante entre l'absence d'anticorps gp120 et la progression clinique conduisant au syndrome associé au sida; le dosage de ces anticorps pourrait donc avoir une valeur pronostique²⁴. Il faut noter, cependant, que la corrélation n'était évidente que pour les anticorps détectés par transfert Western avec un tampon réducteur. Cette méthode n'est pas la méthode de dosage généralement utilisée dans le dépistage des personnes atteintes du sida.

Environ 70 p. 100 des femmes enceintes séropositives n'ont pas transmis l'infection verticalement à leur enfant. Il y a corrélation entre l'absence de transmission verticale et les taux élevés d'anticorps neutralisants pour les déterminants antigéniques gp120 qui ne sont pas associés à la fixation des CD4²⁰⁵.

5.3 Anti-p17

Dans une étude menée aux Pays-Bas auprès d'un échantillon restreint d'hommes homosexuels, une réactivité anti-p17 a été observée dans les 10 mois précédant l'apparition de la maladie, et celle-ci précédait la chute des anti-p24¹¹⁴. Les anticorps anti-p17 peuvent avoir une certaine capacité de neutralisation virale, et une diminution des titres peut indiquer un contrôle réduit de la pathogenèse du VIH.

5.4 Anti-gp41

La protéine d'enveloppe gp41 du VIH montre une homologie de séquence avec la p15E, un peptide dérivé d'une protéine d'enveloppe rétrovirale de type C qui a montré des propriétés immunosuppressives. On a émis l'hypothèse que les anticorps anti-PHIVIS, un peptide 17-mère dérivé de la gp41, pourrait neutraliser l'action immunodépressive de ce peptide et influencer ainsi sur le dénouement de l'infection à VIH et sur le développement du sida²⁵. Deux études menées auprès d'hommes homosexuels n'ont pas permis de trouver une association entre les anticorps anti-PHIVIS et la progression de l'infection^{23,113}.

Les anticorps anti-gp41 pourraient contribuer à prévenir la transmission verticale du VIH aux nouveau-nés²⁰⁵.

5.5 Anti-NEF

Certains produits géniques accessoires du VIH comme le facteur négatif (NEF) sont aussi antigéniques. Le NEF joue peut-être un rôle dans la régulation de l'expression des protéines virales structurales. Une étude longitudinale portant sur une cohorte de 194 personnes asymptomatiques

infectées par le VIH et de 72 personnes ayant subi une séroconversion, a révélé qu'il y avait des réponses humorales dirigées contre le NEF chez 80 p. 100 des sujets. Les anticorps anti-NEF figuraient parmi les premières réponses humorales contre le VIH. Chez deux des personnes ayant subi la séroconversion, ces anticorps ont été trouvés avant la séroconversion avec les anticorps anti-GAG. L'absence de réponse ou la réponse transitoire au NEF a été associée à l'absence ou à la disparition des anticorps anti-noyau, à la réapparition de l'antigène de noyau du VIH et à la chute du nombre de cellules CD4⁺^{165,166}. Cette association accompagnée de profils des marqueurs traduisant un pronostic défavorable suggère l'existence d'une corrélation entre la réponse humorale spécifique contre le NEF et la progression de la maladie. Un examen plus poussé a révélé que la corrélation n'était pas significative.

On a décelé la présence d'anticorps anti-NEF chez les groupes non à risque d'infection à VIH¹⁶⁰. Dans une étude réalisée au moyen d'une technique sensible de radio-immunodosage en phase liquide portant sur des sérums obtenus consécutivement chez 12 personnes après la séroconversion et chez 32 hémophiles infectés par le VIH, les anticorps anti-NEF n'ont pu être détectés indépendamment de l'apparition des anticorps anti-*gag*, anti-*pol* ou anti-*env*¹⁰.

6. Autres anticorps

On sait maintenant que le VIH provoque de nombreux phénomènes auto-immuns¹³³, notamment l'apparition :

- ! d'anticorps anticoagulants contre le lupus anticoagulant et anticardiolipine,
- ! d'anticorps anti-leucocytes,
- ! d'anticorps anti-CD4 solubles,
- ! d'anticorps anti-CD8 solubles.

6.1 Anticorps contre le lupus anticoagulant et anticardiolipine

On a observé des taux élevés d'anticorps contre le lupus anticoagulant et anticardiolipine chez des individus infectés par le VIH dans des groupes à risques élevés^{14,148}. Bien qu'on ait d'abord pensé qu'il s'agissait d'auto-anticorps précoces, ils constitueraient plus vraisemblablement une réponse *antiphospholipide+ à l'infection virale en général et ils n'ont pas de valeur ou de signification pronostique^{30,31,83}.

6.2 Anticorps anti-leucocytes

Les anticorps anti-leucocytes observés chez certaines personnes infectées par le VIH n'ont aucune signification pronostique^{95,142,145,189}. Des anticorps anti-plaquettaires sanguins ont été observés chez des hommes homosexuels infectés par le VIH^{132,188}. Le purpura thrombocytopénique à médiation immunitaire a été reconnu au début de l'épidémie et constituait l'un des critères utilisés pour diagnostiquer le syndrome associé au sida^{89,132,151}. Lorsque le purpura thrombocytopénique auto-immun s'accompagne d'anticorps IgG anti-plaquettaires se liant aux plaquettes, le purpura thrombocytopénique observé chez les personnes atteintes du sida ou du syndrome associé au sida est généralement causé par un dépôt non spécifique des compléments C₃ et C₄, et de complexes immuns sur les plaquettes.

La neutropénie d'origine immunitaire peut, dans une certaine mesure, s'expliquer par des mécanismes semblables²⁰⁹.

6.3 Anticorps anti-CD4 solubles et anti-CD8 solubles

Le principal changement immunitaire constaté au cours de l'infection à VIH est la détérioration fonctionnelle et la déplétion des lymphocytes T CD4+. Il est possible que des mécanismes de destruction cellulaire indirects, comme la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, interviennent dans ce processus. C'est pourquoi on a recherché la présence d'anticorps anti-CD4 chez des sujets à divers stades de l'infection à VIH à l'aide de méthodes de dosage avec des anti-CD4 solubles recombinants.

On a décelé la présence d'anticorps anti-CD4 solubles dans seulement 5 à 12 p. 100 des sérums d'individus infectés par le VIH^{193,212}. Dans une étude réalisée auprès d'une cohorte de 253 sujets séropositifs, l'apparition et l'évolution temporelle des anticorps anti-CD4 solubles n'avaient aucun effet sur la numération des lymphocytes T CD4+ ni sur la progression de la maladie¹⁹³.

Les dosages immuno-enzymatiques (ELISA) peuvent être utiles pour détecter la libération des molécules CD8 par les lymphocytes T humains⁶⁴. Les taux de CD8 solubles circulants ont été examinés à tous les stades de l'infection à VIH¹⁴⁶. Indépendamment des symptômes, la plupart des sujets avaient des valeurs supérieures à 95 p. 100 des témoins normaux. Les taux d'anticorps anti-CD8 solubles ne permettaient pas de distinguer les sujets atteints du sida des sujets séropositifs asymptomatiques. Il est fort probable, donc, que l'utilité de cet anticorps comme marqueur substitut précoce de l'évolution clinique de la maladie soit limitée¹²⁰.

7. Autres marqueurs sérologiques

Les autres marqueurs sérologiques pour l'infection à VIH comprennent :

- ! le facteur de nécrose tumorale (TNF- α),
- ! l'interféron acido-labile des leucocytes humains (IFN- α),
- ! la 2-5A synthétase.

7.1 Le facteur de nécrose tumorale (TNF- α)

Le TNF- α fait partie d'un réseau complexe de cytokines impliquées dans le contrôle du système immunitaire⁹. Le TNF- α est produit par les macrophages et monocytes en réponse aux infections courantes. Cette cytokine rehausse le potentiel cytotoxique des macrophages et des lymphocytes T cytotoxiques^{183,188}. Des niveaux élevés de TNF- α se retrouvent dans le sérum d'individus chez qui on a diagnostiqué le sida, mais cette cytokine n'est pas nécessairement élevée au cours des premiers stades de l'infection à VIH^{105,129,161,162,163,171,214}.

Le TNF- α pourrait s'avérer responsable des dommages causés à la myéline au cours de l'encéphalopathie associée au VIH¹²⁹ et pourrait servir de marqueur substitut pour suivre les manifestations neurologiques de l'infection à VIH. Le rôle du TNF- α dans la pathogenèse de l'infection à VIH n'est pas entièrement élucidé. De nouveaux dosages immunologiques sont présentement à l'essai pour dépister le TNF- α dans des échantillons de sérum recueillis de façon longitudinale, afin de vérifier le potentiel du TNF- α comme marqueur de la maladie.

7.2 L'interféron acido-labile des leucocytes humains et la 2-5A synthétase (IFN- α)

Les taux d'interféron (IFN- α) acido-labile des leucocytes humains et de 2-5A synthétase sont plus élevés chez les hommes homosexuels infectés par le VIH^{28,37}. Dans l'étude torontoise (*Toronto Sexual Contact Study+), les taux d'IFN- α et de 2-5A synthétase ont montré une corrélation avec la lymphadénopathie cervicale et avec la progression vers le sida¹¹⁵. L'IFN- α présent dans le sérum de patients atteints du sida peut induire l'expression de récepteurs pour le TNF- α sur les monocytes circulants chez les patients infectés par le VIH; cette induction est plus prononcée aux stades avancés de la maladie. Cette activation du système TNF pourrait contribuer à certaines des perturbations physiologiques observées au cours du sida¹¹⁵.

8. Marqueurs antigéniques

8.1 L'antigène p24

L'antigène p24, produit du gène gag encodé par le VIH, est l'une des premières molécules encodées par ce virus à être détectée en circulation chez les individus infectés. Cet antigène est présent de façon provisoire à la suite de l'infection initiale par le VIH et réapparaît tard durant la maladie^{33,169}. Peu de sujets montrent une antigénémie p24 persistante. Bien que la présence de cet antigène puisse être un signe pronostique défavorable, de nombreux sujets ne manifesteront pas le sida avant plusieurs années après la détection de l'antigène p24 en circulation^{85,125,136}.

Une thérapie à l'AZT à long-terme peut prolonger la survie et réduire la fréquence des infections opportunistes, en particulier la pneumonie^{51,143,174}. Le traitement à l'AZT réduit les niveaux de l'antigène p24 en circulation, suggérant que la mesure de ce marqueur peut s'avérer utile pour évaluer de nouveaux agents antirétroviraux^{145,185}. Cependant, une étude fait mention que l'amélioration dans le nombre de lymphocytes T CD4+ et dans l'antigénémie du p24 après traitement à l'AZT, ne permet pas de prédire l'évolution clinique chez les patients atteints de sida ayant contracté antérieurement une pneumonie¹⁸⁶.

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré une nette corrélation entre la chute de la numération des lymphocytes T CD4+ et l'apparition du sida. Cette chute des CD4+ semble refléter une réplification accrue du VIH qui se traduit par une corrélation avec une hausse des concentrations sériques d'antigène p24⁴⁰. Dans une étude évaluant des marqueurs de prédiction du sida chez les hémophiles, l'antigénémie p24 et les faibles numérations de lymphocytes T CD4+ étaient indépendamment de très bons indicateurs de la progression de la maladie. Chez 17 à 18 p. 100 des hémophiles séropositifs, on a décelé des antigènes p24 dans le sérum^{47,118,119}. L'incidence actuarielle du sida sur une période de deux ans était la suivante :

- ! 24 p. 100 après la détection de l'antigène p24
- ! 16 p. 100 après la perte des anticorps p24
- ! 20 p. 100 après la perte des anticorps anti-gp120
- ! 31 p. 100 après la chute du nombre de lymphocytes T CD4+ en dessous de 200/mm³

L'incidence du sida sur une période de deux ans augmenta fortement pour atteindre 67 p. 100 chez les sujets qui étaient à la fois positifs à l'égard de l'antigène p24 et dont la numération en lymphocytes T CD4+ avait chuté en bas de 200 cellules/mm³.

Bien que l'antigène p24 seul ait été hautement spécifique à l'égard du sida, la sensibilité était faible. Lorsque la présence de l'antigène p24 fut combinée à une faible numération de lymphocytes T CD4+, la spécificité augmenta à près de 100 p. 100, mais la sensibilité diminua jusqu'à 25 p. 100. Les résultats de cette étude portant sur des hémophiles américains concordent avec ceux d'autres

études publiées concernant des hémophiles ou des hommes homosexuels dans le sens qu'ils indiquent que l'antigénémie p24 et la numération de lymphocytes T CD4+ étaient deux éléments indépendants qui permettent de prévoir la progression du sida^{39,40,135,170}.

De plus, l'étude indiqua que les sujets montrant une antigénémie p24 et un très faible dénombrement de lymphocytes T CD4+ étaient exposés à un risque élevé de développer le sida, environ 50 p. 100 d'entre eux dans un délai d'un an et 67 p. 100 dans un délai de deux ans⁴⁷. Cependant, ces résultats ne concordent pas avec ceux d'une étude menée auprès d'hémophiles français, qui attribue une valeur prédictive à l'antigène p24, mais non à la numération des lymphocytes T CD4+.²

Dans une vaste étude prospective multicentrique de cohortes regroupant 1 219 sujets atteints d'hémophilie ou d'affections apparentées, les taux cumulés moyens de sida sur une période de huit ans étaient les suivants :

- ! 13 p. 100 chez les sujets de 1 à 17 ans
- ! 28 p. 100 chez les sujets de 18 à 34 ans
- ! 44 p. 100 chez les sujets de 35 à 70 ans

Les taux sériques élevés d'interféron et d'antigènes p24, la baisse ou l'absence des anti-p24 ou des anti-gp120 ont tous une valeur prédictive pour ce qui est de l'apparition du sida^{71,150}. Chez les adultes de plus de 35 ans, la diminution du nombre de lymphocytes CD4+ était plus fréquente que chez les sujets plus jeunes, tandis que les adolescents avaient la plus faible incidence de sida après la perte des anticorps anti-p24^{71,153}.

9. Marqueurs de surface cellulaire reflétant l'activation des lymphocytes T

Le lien entre quatre marqueurs d'activation sérologiques (IL-2R soluble, β_2 -M sérique, néoptérine sérique et CD8 soluble) et des sous-classes de lymphocytes T a été étudié chez 64 sujets infectés par le VIH et 61 témoins séronégatifs¹⁵⁶. Des comparaisons par paire ont permis de mettre en évidence des corrélations significatives entre les quatre marqueurs au sein du groupe séropositif. Même si les numérations de lymphocytes T CD4+ présentaient une corrélation négative avec les quatre marqueurs sérologiques, l'étude n'a décelé aucune corrélation entre le nombre de lymphocytes T CD8+ et les marqueurs substitués.

On a observé des corrélations significatives entre les marqueurs d'activation à la surface des cellules et les marqueurs d'activation sérologiques. La proportion de lymphocytes T CD8+ CD45RA+ présentait une corrélation négative avec la néoptérine et la β_2 -M, tandis que la proportion de cellules CD8+ HLA-DR+ présentait une corrélation positive avec les taux de β_2 -M et d'IL-2R soluble. La proportion de lymphocytes T CD8+ CD38+ a été corrélée positivement avec les quatre marqueurs d'activation sérologiques¹⁵⁶. Une analyse phénotypique des lymphocytes CD8+ a révélé que l'infection par le VIH entraîne un déplacement (*shift+) phénotypique de la classe naïve des CD8+ (CD45RA+CD45RO-) vers une classe mnémorique des CD8+ (CD45RA-CD45RO+)¹⁵⁷. L'expression des marqueurs Leu-2 et Leu-7 associés aux lymphocytes T a été décelée chez des hémophiles séropositifs^{195,196}.

10. Lymphocytes T CD4+

10.1 Technologie

Les progrès technologiques, au début des années 80, aboutissant au développement et à la mise en disponibilité commerciale d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes spécifiques de la surface cellulaire de lymphocytes, ont permis de mieux comprendre les syndromes immunodéficients et lymphoprolifératifs. Ces maladies sont connues pour être associées à des populations de lymphocytes anormaux. Le diagnostic et la gestion d'un grand nombre de ces syndromes dépendent d'une surveillance sérielle appropriée de ces populations de cellules.

En raison de sa sensibilité, de sa rapidité et de sa capacité quantitative précise, la cytométrie en flux est devenue la méthode privilégiée pour l'immunophénotypage. Le transfert technologique du laboratoire de recherche au milieu clinique est attribuable, dans une large mesure :

- ! à une meilleure instrumentation,
- ! à une plus grande facilité d'utilisation des équipements,
- ! à des méthodes d'étalonnage simplifiées,
- ! au développement continu de nouveaux anticorps monoclonaux et fluorochromes.

Le travail de classification et d'analyse des populations de cellules a été facilité par l'introduction de micro-ordinateurs rapides, puissants, abordables et fiables.

10.2 Méthodes et normalisation

Au fur et à mesure que les applications cliniques de cette technologie se multiplient, la nécessité de normaliser les méthodes de travail et d'instituer des mesures de contrôle se fait de plus en plus pressante. L'immunophénotypage est une épreuve sensible dont les résultats peuvent être compromis si les méthodes de prélèvement, de transport et de préparation des échantillons sont inappropriées. Les échantillons doivent être traités rapidement avec toutes les précautions de sécurité qui s'imposent. Des témoins positifs et négatifs sont essentiels pour le contrôle de la qualité, et le fonctionnement des instruments doit être évalué tous les jours^{52,66,70,97,167}.

Plusieurs facteurs tendent à influencer sur les sous-populations de lymphocytes, notamment les variations diurnes, le stress, l'effort, les infections aiguës et les thérapies concomitantes. On peut réduire le plus possible les fluctuations résultant de certains de ces facteurs en normalisant les techniques de prélèvement de sang et en veillant à ce que les méthodes de laboratoire varient le moins possible.

10.2.1 Définition des lymphocytes T

Il est de pratique courante aujourd'hui d'utiliser des combinaisons à deux couleurs pour définir les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ comme de véritables sous-ensembles des lymphocytes T CD3+. En outre, il a été proposé qu'une *somme lymphocytaire+ soit réalisée lorsque les cellules T, B et NK totales approchent 100 p. 100¹⁰⁹. Une deuxième somme des lymphocytes T CD4+ et CD8+ devrait être égale au nombre total de lymphocytes T CD3+ \pm 10 p. 100.

10.2.2 Détermination du degré de dysfonction immunologique

Étant donné que le VIH s'attaque aux lymphocytes T CD4+, l'essai le plus utile pour déterminer le degré de dysfonction immunologique dans l'infection à VIH est l'analyse des phénotypes des lymphocytes des sujets¹⁴⁰. Tous les lymphocytes T ont à leur surface des glycoprotéines distinctives qui sont importantes pour leur reconnaissance. Elles expriment à leur surface le récepteur CD3, une glycoprotéine antérieurement connue sous le nom de T3 ou OKT3. Ces cellules exprimant le récepteur CD3 peuvent en outre se subdiviser en cellules porteuses du récepteur CD4 ou CD8. Les lymphocytes T CD4+ ont généralement des fonctions d'auxiliaire, tandis que les lymphocytes T CD8+ ont des fonctions cytotoxiques ou suppressives¹⁶⁴.

Au début de l'épidémie de sida, avant l'identification du VIH en tant que pathogène, les personnes soupçonnées d'être exposées au sida subissaient des tests de dépistage dans le but de déterminer le rapport entre les cellules auxiliaires et les cellules suppressives, ou rapport CD4+/CD8+. Les valeurs faibles (inférieures à 1,0) chez les individus à risques élevés faisaient soupçonner l'immunodéficience. L'identification du VIH comme cause du sida et la démonstration subséquente que l'enveloppe du VIH (gp120) se lie à la molécule CD4+ ont permis de confirmer l'importance des lymphocytes T CD4+ comme cibles du virus¹²⁴. La déplétion progressive constante des lymphocytes T CD4+, (tant en pourcentage qu'en nombre absolu) a été clairement associée à la gravité de la maladie associée au VIH. La plupart des études de cohortes les plus importantes ont confirmé cette corrélation, et il est également apparu que ces marqueurs cellulaires étaient des indicateurs indépendants et puissants de la progression au stade du sida^{49,135}.

Nombre de lymphocytes T CD4+ et nombre absolu de cellules

Le pourcentage de lymphocytes T CD4+, le nombre absolu de lymphocytes T CD4+ et le rapport CD4+/CD8+ ont tous une excellente valeur pronostique pour la prédiction du sida et sont fortement corrélés entre eux^{13,134,139,187,190,191}. On recommande donc d'utiliser, de préférence, le pourcentage de CD4+ comme marqueur pronostique, car sa variabilité est moins grande que celle du nombre absolu de lymphocytes T CD4+. L'utilisation du pourcentage de lymphocytes T CD4+ comme marqueur évite les coûts qu'entraîne la numération globulaire.

Cependant, dans la plupart des cas d'infection à VIH, il est recommandé de surveiller non seulement l'hémoglobine et le nombre de lymphocytes T CD4+ mais aussi le nombre total de leucocytes et de plaquettes sanguines. Le nombre absolu de CD4+ est aujourd'hui largement utilisé

aussi bien par les cliniciens que par les sujets eux-mêmes, à tel point qu'il serait difficile de décourager son utilisation et de ne surveiller que les pourcentages de CD4+. Dans la plupart des essais cliniques, le nombre absolu de lymphocytes T CD4+ constitue une exigence d'admission et même une mesure des résultats obtenus⁴.

Prédiction de l'immunodéficience progressive

Le taux de lymphocytes T CD4+ a une excellente valeur prédictive comme marqueur de l'immunodéficience progressive grave^{108,139}. La pneumonie à *Pneumocystis carinii*, la pneumonie à cytomégalovirus et les infections pulmonaires à *Cryptococcus neoformans* ou *Mycobacterium avium intracellulare* surviennent rarement chez les sujets infectés par le VIH dont le nombre de lymphocytes T CD4+ est supérieur à 250/mm³ ou dont le pourcentage de CD4+ est de 20 à 25 p. 100¹⁵⁴. Cette information peut aider à orienter le traitement prophylactique chez les personnes à risques élevés de contracter une pneumonie à *Pneumocystis carinii*.

Les personnes séronégatives tendent à avoir une numération de base de lymphocytes T CD4+ qui se maintient à long terme sans grande fluctuation. Dès les six mois qui suivent la séroconversion, le nombre de CD4+ chute^{19,178} et, dans une période de deux ans, 30 à 50 p. 100 du nombre initial de lymphocytes T CD4+ sont détruits¹⁰⁹. Un grand nombre de personnes séropositives asymptomatiques conservent pendant de nombreuses années des niveaux stables d'environ 600/mm³.¹⁰⁹ Cependant, certaines études de cohortes ont démontré une baisse lente mais continue des lymphocytes T CD4+, même durant les périodes de latence cliniquement stables¹¹³. Les personnes asymptomatiques en bonne santé, sans antigénémie p24 et dont le nombre moyen de CD4+ est d'environ 520/mm³ peuvent, à court terme, enregistrer une baisse mensuelle de 5 à 6 cellules/mm³ par mois¹⁹⁸. Une diminution rapide du nombre de lymphocytes T CD4+ est un signe pronostique défavorable et peut annoncer l'apparition d'infections opportunistes¹³⁹. Après le diagnostic du sida, le nombre de lymphocytes T CD4+ reste très faible et peut chuter à des niveaux non mesurables avant le décès.

Dans une étude menée auprès d'hémophiles britanniques, les sujets dont la numération de lymphocytes T CD4+ était de 200/mm³ avaient un risque cumulé de 5 p. 100 de contracter le sida. Cette probabilité augmente considérablement pour atteindre 50 p. 100 et 81 p. 100 lorsque les numérations chutent à 50/mm³ et à 10/mm³, respectivement^{119,152}.

On pensait initialement que certains sous-groupes fonctionnels de lymphocytes T CD4+, tels qu'ils sont définis par Leu 8, 2H4 ou 4B4, fourniraient des renseignements additionnels sur la progression de la maladie³⁶. Le terme 2H4 définit le sous-groupe de lymphocytes T CD4+ qui induisent une suppression, tandis que 4B4 définit le sous-groupe de lymphocytes T CD4+ auxiliaires qui induisent une activation du système immunitaire¹³¹. On a démontré depuis que tous les sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ sont progressivement détruits et qu'aucune autre information prédictive ne peut être obtenue par la subdivision des CD4+.^{68,69,207} Toutefois,

l'activation sélective de sous-ensembles de lymphocytes T CD8+, et plus particulièrement de lymphocytes HLA-DR+, CD38+ et Leu-8-CD8+, était associée à la baisse des lymphocytes T CD4+ et à la progression au stade du sida⁶⁸.

Effets de l'AZT

Les effets bénéfiques de l'AZT sur le plan clinique ont été démontrés chez les personnes atteintes du sida et du syndrome associé au sida et chez les personnes asymptomatiques ayant des numérations de CD4+ inférieures à 500/mm³.^{199,200,202,206} Grâce à cette information, de larges segments de populations infectées par le VIH sont traités actuellement au moyen de ce médicament. On pense communément que l'efficacité de l'AZT pour le traitement des affections causées par le VIH pourrait être attribuable au fait que le nombre de lymphocytes CD4+ augmente ou qu'il diminue plus lentement. De modestes augmentations d'environ 50/mm³ ont été observées chez les personnes asymptomatiques traitées à l'AZT, dont la numération de base est inférieure à 500/mm³.²⁰⁶ Chez les personnes dont la numération est supérieure à 500/mm³, aucune augmentation semblable n'a été observée et une diminution globale de 8,6 mm³/mois a été constatée sur une période de trois ans de traitement à l'AZT²⁰⁰. La numération des CD4+ chez des hémophiles traités de façon analogue au moyen de l'AZT a chuté rapidement peu après le début du traitement⁹¹.

Les effets précoces du traitement à l'AZT sur cinq marqueurs viraux et immunologiques de l'activité du VIH ont été examinés chez 90 sujets atteints du sida ou du SAS. Ces sujets ont été suivis pendant deux ans ou jusqu'à leur décès⁸⁸. On a conclu que les changements dans les numérations de CD4+ et de lymphocytes et dans les concentrations sériques de β_2 -M, après 8 à 12 semaines de thérapie, pourraient constituer des indicateurs substituts de l'issue clinique de la maladie dans les essais cliniques. Chez 33 des sujets qui avaient le meilleur pronostic avant le traitement, le taux de survie sur 24 mois a été de 88 p. 100 s'ils montraient une bonne réponse pour les deux marqueurs substituts en début de traitement. Ceux dont la réponse était faible envers l'un ou l'autre des marqueurs avaient un taux de survie inférieur à 50 p. 100.

10.3 Effets des médicaments

Il est souhaitable de déterminer de façon rapide et exacte les effets des médicaments sur les personnes traitées contre l'infection à VIH. Il est préférable de tirer rapidement les conclusions sur les effets bénéfiques possibles des médicaments et de ne pas attendre de constater des différences de survie; cela permettrait d'accélérer les recherches en vue d'obtenir des médicaments efficaces et d'accélérer également leur autorisation. D'autres études sont en cours dans le but de déterminer si un changement de la valeur des marqueurs dans le temps est relié à la survie à long terme des sujets. Il est urgent d'obtenir cette information. Des essais comparatifs de grande envergure avec placebo permettront de déterminer si les marqueurs sont des indicateurs significatifs sur le plan clinique.

11. Discussion et recommandations

L'utilité de marqueurs substitués de la progression clinique de la maladie est bien établie dans divers domaines de recherche. Les mesures de la tension artérielle et des taux de cholestérol ont une valeur clinique démontrée pour prévoir l'issue à long terme des maladies cardio-vasculaires. L'utilisation de marqueurs substitués comme indicateurs dans les essais cliniques sur le VIH pourrait permettre de réduire aussi bien la taille des cohortes requises pour les études que la durée de chaque essai²⁰¹. La capacité de réaliser des études rapides auprès de cohortes restreintes revêt un intérêt non seulement pour les sujets, mais aussi pour les chercheurs cliniciens et les compagnies pharmaceutiques. L'industrie bénéficierait d'évaluations rapides et donc moins coûteuses. Les organismes gouvernementaux responsables de la réglementation des médicaments pourraient aussi s'intéresser à de tels essais puisqu'ils permettraient d'autoriser rapidement les médicaments.

Pourquoi alors les marqueurs substitués ne sont-ils pas utilisés comme indicateurs dans les essais cliniques relatifs au VIH? Essentiellement, parce que les chercheurs manquent de connaissances sur cette maladie. Les changements cliniques n'étant apparents que plusieurs années après l'infection, l'étude de ces marqueurs et les tentatives pour comprendre leur utilité dans l'histoire naturelle de cette maladie se sont fait attendre pendant des années. Par ailleurs, les traitements anti-VIH sont encore récents et, par conséquent, les effets de la thérapie sur ces marqueurs sont mal connus.

Pour être utiles du point de vue clinique, les marqueurs substitués doivent remplir plusieurs conditions :

- ! Ils doivent avoir une relation logique et pathophysiologique claire avec la maladie.
- ! Il faut pouvoir démontrer, pour chacun des marqueurs, un rôle constant pour le suivi de l'histoire naturelle de l'infection à VIH.
- ! Ils doivent être présents chez la majorité des personnes infectées.
- ! Ils doivent se modifier, de façon mesurable, avec l'état clinique tant dans la progression que dans la rémission de la maladie.
- ! Ils doivent changer de façon quantifiable à la suite d'un traitement réussi ou ne pas changer en cas d'échec.

À ce jour, aucun des marqueurs ne réunit toutes ces qualités. Aussi n'est-il pas surprenant que les marqueurs substitués ne soient pas considérés comme des indicateurs primaires acceptables dans les essais cliniques. Ce n'est que récemment que leur utilisation a été proposée dans les études de la phase II, mais non de la phase III^{21,127}.

L'évaluation des marqueurs substitués de la maladie associée au VIH devrait avoir une place dans le traitement de l'infection à VIH précoce et modérée. Ces marqueurs peuvent indiquer l'état de la

fonction immunitaire chez les personnes infectées et asymptomatiques. Ils devraient être utilisés conjointement avec les mesures cliniques comme l'indice de qualité de vie, l'état fonctionnel et le poids, qui ne sont pas propres à la maladie associée au VIH. La mesure de ces marqueurs pourra peut-être aussi aider à déterminer les effets des médicaments dans les semaines qui suivent le début de la thérapie^{38,88,106,180}.

Dans les études sur l'histoire naturelle de l'infection à VIH, les marqueurs substitués les plus communément utilisés montrent une corrélation avec le temps de survie. Il reste donc à établir si les traitements qui rétablissent les niveaux à ceux des personnes non infectées améliorent le temps de survie. En effet, le traitement précoce à l'AZT améliore la survie, mais on n'a pas décelé d'effet bénéfique à long terme sur le nombre de lymphocytes T CD4+. ⁹¹ Il a été démontré récemment qu'un changement temporel des valeurs des marqueurs substitués au début du traitement à l'AZT avait une corrélation avec la survie à long terme⁸⁸. De telles études doivent être validées par des études comparatives de cohortes plus importantes (avec placebo) avant que leur utilisation puisse être acceptée dans ce contexte.

On a récemment évalué la valeur pronostique de trois marqueurs cellulaires et de cinq marqueurs sérologiques dans l'infection à VIH. Les lymphocytes T CD4+ exprimés soit par leur nombre absolu, soit par leur pourcentage par rapport au nombre de lymphocytes, soit par le rapport CD4/CD8, étaient les meilleurs indicateurs de la progression au stade du sida. Une analyse multivariée échelonnée a indiqué que les meilleurs indicateurs étaient, par ordre décroissant :

- ! le niveau de lymphocytes CD4+
- ! le taux sérique de néoptérine ou de β_2 -M
- ! le taux d'IgA
- ! les IL-2R solubles
- ! l'antigène p24

Les auteurs ont conclu que, parmi tous les marqueurs étudiés, c'est la combinaison du nombre de CD4+ et des taux sériques de néoptérine ou de β_2 -M qui permet de prévoir le plus exactement possible la progression vers le sida⁴⁹.

Le nombre de CD4+, la β_2 -M, la néoptérine et l'antigène p24 sont désormais mesurés dans les cliniques et sont utilisés seuls ou en association pour suivre les sujets et prendre des décisions thérapeutiques comme entreprendre une thérapie antirétrovirale ou une prophylaxie dirigée contre la pneumocystose^{5,6,47,48,49,51,88,100,101,102,143}.

Si ces marqueurs doivent être utilisés comme indicateurs primaires dans les études cliniques, les questions suivantes devront être résolues. La normalisation des tests est impérative. Il faudra établir un consensus en ce qui a trait aux méthodes, aux réactifs et au matériel utilisés. Il faut encourager l'adoption de normes rigoureuses en matière de contrôle de la qualité. Des étendues de valeurs normales doivent être définies pour chaque laboratoire, et des essais concomitants avec

témoins positifs et négatifs doivent être effectués parallèlement aux essais portant sur les sujets. Une vérification de la compétence des laboratoires ainsi qu'une forme d'homologation devraient être exigées, en particulier dans le cas des essais multicentriques. Dans chaque lieu d'expérimentation, il est important de procéder à des échantillonnages séquentiels, puisque des mesures isolées n'ont que peu de signification. Bien que les tendances observées puissent avoir une valeur, un consensus doit être établi pour fixer des *balises+ précises dans les études cliniques. Ces indicateurs de laboratoire doivent être confirmés par des échantillonnages répétés à court terme. Chaque marqueur doit être validé dans tous les groupes à risques élevés avec les rectifications appropriées. La stabilité des marqueurs sérologiques dans les échantillons congelés doit être démontrée et les tests sérologiques devraient porter sur des échantillons prélevés de manière séquentielle par le biais d'un traitement par lots. Par exemple, une numération absolue de CD4+ de 200/mm³ ou un pourcentage de 20 p. 100 de lymphocytes CD4+ pourrait être un indicateur de l'absence d'effet sur la maladie asymptomatique. Cet indicateur doit être confirmé par au moins deux autres numérations du même ordre dans une période de deux à quatre semaines.

L'évaluation directe de l'état de la déficience immunitaire par le dénombrement des lymphocytes T CD4+, sous forme de pourcentage ou de valeur absolue, demeurera, dans un avenir rapproché, la méthode de choix, car elle a l'avantage d'être largement accessible, abordable et mieux connue. Il est peu probable que les mesures indirectes de l'activité de la maladie comme les mesures de la β_2 -M ou de la néoptérine seront acceptables prochainement comme indicateurs dans les essais cliniques. Bien qu'elles soient plus acceptables, les mesures directes de l'activité du virus, comme les mesures de la virémie, ne sont généralement pas disponibles et sont très coûteuses.

12. Glossaire

(Les abréviations et les acronymes suivants apparaissent en anglais car la communauté scientifique internationale les reconnaît ainsi.)

β_2 -M	Beta ₂ -microglobulin
2H4	Marker for suppressor inducer CD4 subset
4B4	Marker for helper inducer CD4 subset
ARC	AIDS-related complex
AZT	Zidovudine
C1q mAb	Monoclonal antibody to the C1q component of complement
CD4	T helper subset marker
CD8	T cytotoxic/suppressor subset marker
CIC	circulating immune complex (complexe immun circulant)
CMV	cytomegalovirus
CSF	cerebrospinal fluid (liquide céphalo-rachidien)
EBV	Epstein-Barr virus
ELISA	Enzyme linked immunoassay (dosage par la méthode E.L.I.S.A.)
FDA	Food and Drug Administration
GTP	guanosine triphosphate
HPLC	high-performance liquid chromatography (chromatographie liquide à hautepression)
HTLV-1	Human T-lymphotropic Virus type 1
IFA	immunofluorescence assays
IFF-	gamma-interferon
IFN- α	alpha-interferon (acid-labile human leukocyte interferon)
Ig (IgG, IgM, IgA)	Immunoglobulin
IL-2	interleukin-2 (T cell growth factor)
IL-2R	interleukin-2 receptor

IL-2R α	interleukin-2 receptor alpha chain (Tac peptide)
IL-2R β	interleukin-2 receptor Beta chain
IL-6	interleukin-6 (a B cell stimulatory factor)
Leu 8	T cell subset marker
mAbs	monoclonal antibodies
MHC	major histocompatibility complex (CMH : complexe majeur d'histocompatibilité)
NEF	negative factor
pHIVIS	17-mer peptide of HIV gp41
RIPA	radio-immunoprecipitation
sCD4	soluble CD4
sCD8	soluble CD8
sIL-2R	soluble interleukin-2 receptor
TNF α	tumor necrosis factor alpha
VIH	virus de l'immunodéficience
VLAS	Vancouver Lymphadenopathy Study

13. Bibliographie

1. ABITA J.P., COST H., MILSTIEN S. et coll. 1985, *Urinary neopterin and biopterin levels in patients with AIDS and AIDS-related complex+, *Lancet*, **2** : 51-2.
2. ALLAIN J.P., LAURIAN Y., PAUL D.A. et coll. 1987, *Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p25 and gp41 in patients with haemophilia. Potential clinical importance+, *New Engl. J. Med.*, **317** : 1114-21.
3. AMADORI A. et CHIECO-BIANCHI L. 1990, *B cells activation in HIV infection: deeds and misdeeds+, *Immunology Today*, **11** : 374-9.
4. AMERICAN FOUNDATION FOR AIDS (AMFAR) *AIDS/HIV Treatment Directory*, 1990, **4**.
5. ANDERSON R.E., LANG W., SHEPPARD H.W. et coll. 1990a, *Longitudinal analysis of laboratory markers during HIV infection+, (S.B.532) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
6. ANDERSON R.E., LANG W., SHIBOSKI S. et coll. 1990b, *Use of β_2 -microglobulin level and CD4 lymphocyte count to predict development of acquired immunodeficiency syndrome in persons with human immunodeficiency virus infection+, *Arch. Intern. Med.*, **150** : 73-7.
7. AUCOUTRIER P., COUDESC L.J., GOUET D. et coll. 1986, *Serum immunoglobulin G dysbalances in lymphadenopathy syndrome and acquired immunodeficiency syndrome+, *Clin. Exp. Immunol.*, **63** : 234-40.
8. BAGASRA O., FITZHARRIS J.W. et BAGASRA T.R. 1988, *Neopterin: an early marker of development of pre-AIDS conditions in HIV seropositive individuals+, *Clin. Immunol. Newsletter*, **9** : 197-9.
9. BALKWIL F.R. et BURKE F. 1989, *The cytokine network+, *Immunol. Today*, **10** : 299-304.
10. BARHAOUI E., BENJOUAD A., SABATIER J.M., et coll. 1990, *Relevance of anti-NEF antibody detection as an early serologic marker of human immunodeficiency virus infection+, *Blood*, **76** : 257-64.
11. BETHEA M. et FORMAN D.T. 1990, * β_2 -microglobulin: its significance and clinical usefulness+, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **20** : 163-8.
12. BHALLA R.B., SAFAI B., PAHWA S. et Schwartz M.K. 1985, * β_2 -microglobulin as a prognostic marker for development of AIDS (letter)+, *Clin. Chem.*, **31** : 411-2.
13. BIDDISON W.E. et SHAW S. 1989, *CD4 expression and function in HLA Class II-specific T cells+, *Immunol. Rev.*, **109** : 5-15.
14. BLOOM E.J., ABRAMS D.I., et RODGERS G. 1986, *Lupus anticoagulant in the acquired immunodeficiency syndrome+, *J. Amer. Med. Assoc.*, **256** : 491-3.
15. BOTTIGER B., BLOMBACK M., BERNTORP E., et coll. 1988, *HIV serology and lymphocyte subsets in relation to therapy and clinical development in haemophiliacs+, *Eur. J. Haematol.*, **41** : 459-66.

16. BOTTIGER B., MORFELDT-MANSON L., PUTKONEN, P. et coll. 1989, *Predictive markers of AIDS: a follow-up of lymphocyte subsets and HIV serology in a cohort of patients with lymphadenopathy+, *Scand. J. Infect. Dis.*, **21** : 507-14.
 17. BREUSTEDT W., RABE H., VOLK D. et PORSTMANN P. 1989, *Neopterin—a prognostic marker in HIV infection+, *Dermatol. Monatsschr.*, **175** : 226-31.
 18. BRUHWEILER J., LEDERGERBER B., JOLLER-JEMELKA H. et coll. 1989, *Power of serum beta₂-microglobulin and serum neopterin in detecting advanced HIV disease+, (Th.B.O.27) V Intl. Conf. AIDS, QC.
 19. BRUNDAGE J., GARDNER L., MCNEIL J., et coll. 1990, *Progression of HIV disease during the early stages estimating rates of decline of CD4+ T-lymphocytes+, (Th.C.628) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
 20. BURKES R.L., SHERROD A.E., STEWART M.L. et coll. 1990, *Serum β₂-microglobulin levels in homosexual men with AIDS and with persistent, generalized lymphadenopathy+, *Cancer*, **57** : 2190-2.
 21. BYAR D.P., SCHOENFELD D.A., GREENE S.B. et coll. 1990, *Design considerations for AIDS trials+, *New Engl. J. Med.*, **323** : 1343-8.
 22. CALABRESE L.H., PROFFITT M.R., GUPTA M. et coll. 1984, *Serum β₂-microglobulin and interferon in homosexual males: relationship to clinical findings and serologic status to the human T-lymphotropic virus (HTLV-III)+, *AIDS Res.*, **1** : 423-38.
 23. CHEINGSONG-POPOV R., PANAGIOTIDI C., CAUN K. et coll. 1990, *Antibodies to a putative HIV gp41 immunosuppressive peptide, pHIVIS (583-599), do not correlate significantly with outcome in HIV infection+, *J. AIDS*, **4** : 251-3.
 24. CHOU M.-J., LEE T.H., HATZAKIS A. et coll. 1988, *Antibody responses in early human immunodeficiency virus type I infection in haemophiliacs+, *J. Inf. Dis.*, **157** : 805-11.
 25. CIANCIOLO G., BOGERD H. et SNYDERMAN R., 1988, *Human retrovirus-related synthetic peptides inhibit T-lymphocyte proliferation+, *Immunol. Letters*, **19** : 7-14.
 26. CLARKSON R.C., FLEGG P.F., BIRD A.G. et coll. 1990, *β₂-microglobulin (β₂-M) levels in Edinburgh drug users+, (Th.C.650) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
 27. COATES R., FAREWELL V., RABOUD J. et coll. 1990, *Predictors of progression to AIDS in the Toronto Sexual Contacts Study+, (Th.C.669) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
 28. COATES R.A., READ S.E., FANNING M.M. et coll. 1986, *The relationship between 2-5A synthetase levels and persistent lymphadenopathy in homosexual men with antibodies to HTLV-III+, *Clin. and Invest. Med.*, **9** : 59-64.
 29. COATES R.A., FAREWELL V.T., RABOUD J. et coll. 1992, *Using serial observations to identify predictors of progression to AIDS in the Toronto Sexual Contact Study+, *J. Clin. Epidemiol.*, **45** : 245-53.
 30. COHEN A.J., PHILIPS T.M. et KESSLER C.M. 1986, *Circulating coagulation inhibitors in the acquired immunodeficiency syndrome+, *Ann. Int. Med.*, **104** : 175-180.
-

31. COHEN H., MACKIE I.J., ANAGNOSTOPOULOS N. et coll. 1989, *Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies, and human immunodeficiency virus in haemophilia+, *J. Clin. Pathol.*, **42** : 629-33.
32. COOKE R.A. 1989, *Neopterin and Alpha and Beta interleukin-1 levels in sera of patients with human immunodeficiency virus infection+, *J. Clin. Microbiol.*, **27** : 1919-23.
33. COOMBS R.W., COLLIER A.C., ALLAIN J.P., et coll. 1989, *Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection+, *N. Engl. J. Med.*, **321** : 626-31.
34. COOPER D.A., GOLD J., MACLEAN P. et coll. 1985, *Acute AIDS retrovirus infection: definition of a clinical illness associated with seroconversion+, *Lancet*, **1** : 537-40.
35. COURPOTIN C., LEVERGER G., DORMONT D. et coll. 1990, *Biological parameters of predictive value in the follow-up of HIV-infected infants from HIV positive mothers+, (F.B.444) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
36. DE PAOLI P., CARBONE A., BATTISTIN S. et coll. 1987, *Selective depletion of the OKT 4+ 4B4+ subset in lymph nodes from HIV+ patients+, *Immunol. Letters*, **16** : 71-3.
37. DE STEFANO E., FRIEDMAN R.M., FRIEDMAN-KIEN A.E. et coll. 1982, *Acid-labile human leukocyte interferon in homosexual men with Kaposi's sarcoma and lymphadenopathy+, *J. Inf. Dis.*, **146** : 451-5.
38. DE WIT R., BAKKER P.J.M., REISS P. et coll. 1990, *Temporary increase in serum β_2 -microglobulin during treatment with interferon-alpha for AIDS-associated Kaposi's sarcoma+, *J. AIDS*, **4** : 459-62.
39. DE WOLFE F., LANGE J.M.A., HOUWELLING J.T.M. et coll. 1988, *Numbers of CD4+ cells and the levels of core antigens of antibodies to the human immunodeficiency virus as predictors of AIDS among seropositive homosexual men+, *J. Inf. Dis.*, **158** : 615-22.
40. DE WOLFE F., ROOS M., LANGE J.M.A. et coll. 1988, *Decline in CD4+ cell numbers reflects increase in HIV-1 replication+, *AIDS Res. and Human Retroviruses*. **4** : 433-40.
41. DI MARIA H., TOUBERT M.E., SCHLAGETER M.H. et coll. 1989, *Predictive value of beta₂- microglobulin level in serum from children born to HIV-infected mothers+, (M.B.O.5.) V Intl. Conf. AIDS, QC.
42. DOS SANTOS J.I. et CASTRO B.G. 1989a, *Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays and alternative tests for the detection of HIV antibodies in Brazilian sera+, *J. AIDS*, **3** : 544-5.
43. DOS SANTOS J.I., FERNANDEZ J.C. et GALVAO-CASTRO B. 1989b, *Specificity of HIV antigen capture assays+, *J. AIDS*, **3** : 545.
44. Editorial 1988, *Neopterins in clinical medicine+, *Lancet*, **1** : 509-12.
45. ELOVAARA I., IIVANAINEN M., POUTIAINEN E. et coll. 1989, *CSF and serum β_2 -microglobulin in HIV infection related to neurological dysfunction+, *Acta. Neurol. Scand.*, **79** : 81-7.

46. EL-SADR W., MARMOR M., S. ZOLLA-PAZNER et coll. 1987, *Four year prospective study of homosexual men: correlation of immunologic abnormalities, clinical status, and serology to human immunodeficiency virus+, *J. Inf. Dis.*, **155** : 789-93.
47. EYSTER M.E., BALLARD J.O., GAIL M.H. et coll. 1989, *Predictive markers for the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in haemophiliacs: persistence of p24 antigen and low T4 cell count+, *Ann. Intern. Med.*, **110** : 963-9.
48. FAHEY J.L., TAYLOR J.M., DETELS R. et coll. 1990a, *The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1+, *New Engl. J. Med.*, **322** : 166-72.
49. FAHEY J.L., TAYLOR J.M.G., DETELS R. et coll. 1990b, *Natural history of immune activation in HIV infection: serum beta₂-microglobulin (β₂-M) and neopterin prior to the development of AIDS+, (Th.C.668) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
50. FAUCI, A.S., MACHER A.M. et LONGO D.L. 1984, *Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations+, *Ann. Intern. Med.*, **100** : 92-106.
51. FISCHL M.E., RICHMAN D.D., HANSEN N. et coll. 1990, *The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection: a double-blind, placebo-controlled trial+, *Ann. Int. Med.*, **112** : 727-37.
52. FLETCHER M.A., AZEN S.P., ADELSBERG B. et coll. 1989, *Immunophenotyping in a multicentre study: the transfusion safety experience+, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **52** : 38-47.
53. FLING J.A., FISCHER J.R., BOSWELL R.N. et REID M.J. 1988, *The relationship of serum IgA concentration to human immunodeficiency virus (HIV) infection: a cross-sectional study of HIV-seropositive individuals detected by screening in the United States Air Force+, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **82** : 965-70.
54. FORMAN D.T. 1982, *β₂-microglobulin—an immunogenetic marker of inflammatory and malignant origin+, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **12** : 447-52.
55. FORSTER S.M., OSBORNE L.M., CHEINGSONG-POPOV R. et coll. 1987, *Decline of anti-p24 antibody precedes antigenaemia as correlate of prognosis in HIV-1 infection+, *J. AIDS*, **1** : 235-40.
56. FRANZETTI F., CAVALLI G., C. UBERTI FOPPA et coll. 1988, *Raised serum β₂-microglobulin levels in different stages of human immunodeficiency virus infection+, *J. Clin. Lab. Immunol.*, **27** : 133-7.
57. FUCHS D., DIERICH M.P. et WACHTER H. 1988, *Predicting AIDS+, *Brit. Med. J.*, **97** : 1547.
58. FUCHS D., HAUSEN A., REIBNEGGER G. et coll. 1988, *Neopterin as a marker in HIV infection+, *Clin. Chem.*, **34** : 466-7.
59. FUCHS D., BANEKOVICH M., HAUSEN A. et coll. 1988, *Neopterin estimation compared with the ratio of T cell subpopulations in persons infected with human immunodeficiency virus-1+, *Clin. Chem.*, **34** : 2415-7.
60. FUCHS D., HAUSEN A., REIBNEGGER G. et coll. 1988, *Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection+, *Immunol. Today*, **9(5)** : 150-5.
61. FUCHS D., CHIODI F., ALBERT J. et coll. 1989a, *Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum

- of individuals infected with HIV-1+, *J. AIDS*, **3** : 285-8.
62. FUCHS D., SPIRA T.J., HAUSEN A. et coll. 1989b, *Neopterin as a predictive marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection+, *Clin. Chem.*, **35** : 1746-9.
63. FUCHS D., ARTNER-DWORZAK E., HAUSEN A., et coll. 1990, *Urinary excretion of porphyrins is increased in patients with HIV-1 infection+, *J. AIDS*, **4** : 341-4.
64. FUJIMOTO J., LEVY S. et LEVY R., 1983. *Spontaneous release of the leu-2 (T8) molecule from human T cells+, *J. Exp. Med.*, **159** : 752-66.
65. GAINES H., SONNERBORG A., CZAJKOWSKI J. et coll. 1987, *Antibody response in primary human immunodeficiency virus infection+, *Lancet*, **1** : 1249-53.
66. GELMAN R. et EUDEY L. 1989, *Biostatistical consideration for quality assessment of immunologic measurements used in clinical and longitudinal studies+, Ann. Conf. Clin. Immunol., VA.
67. GERVAIS F., TSOUKAS C., SHUSTER J. et coll. 1985, *Beta₂-microglobulin levels before and after HTLV-III seroconversion+, *Clin. Invest. Med.*, **8** : A40 #C10.
68. GIORGI J.V. et DETELS R. 1989a, *T cell subset alterations in HIV infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS Cohort Study+, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **52** : 10-8.
69. GIORGI J.V., NISHANIAN P.G., AFRASIABI R. et coll. 1989b, *T subset alterations in homosexual men: relationship to HTLV-111/LAV infection+, V Intl. Conf. AIDS, QC.
70. GIORGI J.V., CHEUNG H.-L., MARGOLICK J.B. et coll. 1990, *Quality control in the flow cytometric measurement of T-lymphocyte subsets: The multicenter AIDS cohort study experience+, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **55** : 173-86.
71. GOEDERT J.J., KESSLER C.M., ALEDORT L.M. et coll. 1989, *A prospective study of human immunodeficiency virus type I infection and the development of AIDS in subjects with haemophilia+, *New Engl. J. Med.*, **321** : 1141-8.
72. GRIECO M.H., REDDY M.M., KOTHARI H.B. et coll. 1984, *Elevated β_2 -microglobulin and lysozyme levels in patients with acquired immune deficiency syndrome+, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **32** : 174-84.
73. GUPTA S. et LICORISH K., 1984, *Circulating immune complexes in AIDS+, *New Engl. J. Med.*, **310** : 1530-1.
74. HANSEN P.B., et OLSEN N.V. 1989, *7 β_2 microglobulin in medical disease+, *Ugeskr. Laeger*, **151** 2960-2.
75. HOFMANN B., MELMED R.N., TAYLOR J.M.G. et coll. 1988, *Comparison of immune activation parameters during HIV infection: 7 β_2 -microglobulin and serum neopterin differ from soluble IL-2R+, (#40) III Ann. Conf. Clin. Immunol., San Francisco.

76. HOFMANN B., BYGBJERG I., DICKMEISS E. et coll. 1989a, *Prognostic value of immunologic abnormalities and HIV antigenemia in asymptomatic HIV-infected individuals: proposal of immunologic staging+, *Scand. J. Infect. Dis.*, **21** : 633-43.
 77. HOFMANN B., CUMBERLAND W., DETELS R. et FAHEY J.L., 1989b, *Differences in immune activation parameters during and after HIV seroconversion: serum beta₂-microglobulin, neopterin, and soluble IL-2R+, (Th.B.0.25) V Intl. Conf. AIDS, QC.
 78. HOFMANN B., WANG Y., CUMBERLAND W.G., DETELS R., BOZORGMEHRI M., FAHEY J.L., 1990, *Serum 7β₂-microglobulin level increases in HIV infection: relation to seroconversion, CD4 T cell fall and prognosis+, *J. AIDS*, **4** : 207-14.
 79. HONDA M., KITAMURA K., MATSUDA K. et coll. 1989, *Soluble IL-2 receptor in AIDS: correlation of its serum level with the classification of HIV-induced diseases and its characterization. *J. Immunol.*, **142** : 4248-55.
 80. HUBER C., FUCHS D., HAUSEN A., et coll. 1983, *Pteridines as a new marker to detect human T cells activated by allogeneic or modified self major histocompatibility complex (MHC) determinants+, *J. Immunol.*, **130** : 1047-50.
 81. HUBER C., BATCHELOR J.R., FUCHS D. et coll. 1984, *Immune response-associated production of neopterin: release from macrophages primarily under control of interferon-gamma+, *J. Exp. Med.*, **160** : 310-16.
 82. IMBERCIADORI G., PIERSANTELLI N., CALDERISI S. et coll. 1990, *Study of 7β₂-microglobulin and neopterin in serum and cerebrospinal fluid of HIV-infected patients+, *Acta. Neurol. (Napoli)*, **12** : 58-61.
 83. INTRATOR L., OKSENHENDLER E., DESFORGES L., et BIERLING P., 1988, *Anticardiolipin antibodies in HIV-infected patient with or without immune thrombocytopenic purpura+, *Brit. J. Haematol.*, **59** : 269.
 84. JACSON A.L., HOFMANN B., CUMBERLAND W. et coll. 1990, *In vitro production, membrane expression, and serum levels of sIL-2R in HIV infection. (Th.C.671) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
 85. JACKSON J.B., SANNERUD K.J. et BALFOUR Jr. H.H. 1989, *Comparison of two serum HIV antigen assays for selection of asymptomatic antigenemic individuals into clinical trials+, *J. AIDS*, **2** : 394-7.
 86. JACOBSON M.A., ABRAMS D.I., VOLBERDING P.A. et coll. 1989, *Serum 7β₂-microglobulin decreases in patients with AIDS or ARC treated with azidothymidine+, *J. Infect. Dis.*, **159** : 1029-36.
 87. JACOBSON M.A., BACCHETTI P., KOLOKATHIS A. et coll. 1990, *Surrogate markers for survival in patients with AIDS and AIDS-related complex treated with Zidovudine+, Proceedings of the Third Annual Conf. on Clin. Immunol., San Francisco.
 88. JACOBSON M.A., BACHETTI P., KOLOKATHIS A. et coll. 1991, *Surrogate markers for survival in patients with AIDS and AIDS-related complex treated with Zidovudine+, *Brit. Med. J.* **302** : 74-8.
 89. JOKELA J., FLYNN T., et HENRY K. 1987, *Thrombotic thrombocytopenic purpura in a human immunodeficiency virus (HIV) seropositive homosexual man+, *Amer. J. Hematol.*, **25** : 341-3.
 90. JOLLER-JEMELKA H.I., JOLLER P.W., MULLER F. et coll. 1987, *Anti-HIV IgM antibody analysis during early manifestations of HIV infections+, *J. AIDS*, **1** : 45-7.
-

91. JONES P. 1989, *Zidovudine: experience at the Newcastle Haemophilia Center+, *J. of Infection*, 18 Suppl., **1** : 53-8.
92. JULANDER I., VON STEDINGK L., MOBERG L. et coll. 1987, *7 β_2 -microglobulin serum levels in patients with HIV infection+, *Chemioterapia.*, **6(2 supp)** : 638.
93. KALISH S.B., OSTROW D.G. et GOLDSMITH J. 1984, *The spectrum of immunologic abnormalities and clinical findings in homosexually active men+, *J. Infect. Dis.*, **149** : 148-56.
94. KARLSSON F.A., GROTH T., SEGE K. et WIBBEL L. 1980, *Turnover in humans of beta $_2$ -microglobulin: the constant chain of HLA-antigen+, *Eur. J. of Clin. Invest.*, **10** : 293-300.
95. KIPROV D.D., ANDERSON R.E., MORAND P.R. et coll. 1985, *Antilymphocyte antibodies and seropositivity for retroviruses in groups at high risk for AIDS+, *New Engl. J. Med.*, **312** : 1517-9.
96. KLOSTER B.E., JOHN P.A., MILLER L.E. et coll. 1987, *Soluble interleukin-2 receptors are elevated in patients with AIDS or at risk of developing AIDS+, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **45** : 440.
97. KOEPKE J.A. et LANDAY A.L. 1989, *Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts+, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **52** : 19-27.
98. KOFFLER H., FUCHS D., HINTNER H., et coll., 1987, *Urinary neopterin: an early marker of HIV infection+, *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **6** : 698-9.
99. KRAMER A., WIKTOR S.Z., FUCHS D. et coll. 1989a, *Neopterin a predictive marker of acquired immune deficiency syndrome in human immunodeficiency syndrome in man+, *J. AIDS*, **2** : 291-6.
100. KRAMER A., ROSENBERG P.S., FUCHS D. et coll. 1989b, *Immunologic markers model the risk of AIDS+, (M.A.O.45) V Intl. Conf. AIDS, QC.
101. KRAMER A., BIGGAR R.J., FUCHS D. et coll. 1990a, *AIDS risk can be predicted with CD4 percent, neopterin and beta $_2$ -microglobulin only one (1) year after HIV seroconversion+, (Th.C.624) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
102. KRAMER A., BIGGAR R.J., GOEDERT J.J. 1990b, *Markers of risk in HIV-1+, *New Engl. J. Med.*, **322** : 1866-7.
103. KROWKA J.F., STITES D.P., MOSS A.R. et coll. 1988, *Interrelations of lymphocyte subset values, human immunodeficiency virus antibodies, and HIV antigen levels of homosexual males in San Francisco+, *Diag. and Clin. Immunol.*, **5** : 381-7.
104. LACEY C.J.N., FORBES M.A., WAUGH M.A. et coll. 1987, *Serum 7 β_2 -microglobulin and human immunodeficiency virus infection+, *J. AIDS*, **1** : 123-7.
105. LAHDERVITA T.A., MAURY C.P., TEPPA A.M., et REPO H. 1988, *Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome+, *Am. J. Med.*, **85** : 289-91.
106. LAMBERT J.S., SEIDLIN M., REICHMAN R.C. et coll. 1990, *2',3'-dideoxyinosine (ddi) in patients with acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. A phase I trial+, *New Engl. J. Med.*, **322** : 1333-

- 45.
107. LAMBIN P., DESJOBERT H., DEBBIA M. et coll. 1986, *Serum neopterin and $7\beta_2$ -microglobulin in anti-HIV positive blood donors+, *Lancet*, **2** : 1216-7.
108. LAMBIN P., LEFRERE J.J., DOINEL C., FINE J.M. et coll. 1988, *Neopterin and $7\beta_2$ -microglobulin in serum of HIV seropositive subjects during a two year follow-up+, *Clin. Chem.*, **34** : 1367-8.
109. LANDAY A., OHLSSON-WILHELM B., et GIORGI J.V., 1990, *Application of flow cytometry to the study of HIV infection+, *J. AIDS*, **4** : 479-97.
110. LANDERS D.V., COYNE B.A., CROMBLEHOLME W.R. et coll. 1990, *Serum beta₂-microglobulin and interleukin-2 receptor levels in HIV (+) women+, (F.B.460) VI Intl Conf AIDS, San Francisco.
111. LANE H.C., DEPPER J.M., GREENE W.C. et coll. 1985, *Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: evidence for a selective defect in soluble antigen recognition+, *New Engl. J. Med.*, **313** : 79-84.
112. LANG W., PERKINS H., ANDERSON R.E. et coll. 1989, *Patterns of T-lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS+, *J. AIDS*, **2** : 63-9.
113. LANGE J., VAHINE A., DEKKER J. et coll. 1989, *Antibodies to an HIV-1 synthetic peptide with partial homology to MuLV p15E do not protect against AIDS+, *J. AIDS*, **3** : 402-3.
114. LANGE J.M.A., DE WOLF F., KRONE W.J.A. et coll. 1987, *Decline of antibody reactivity to outer viral core protein p17 is an earlier serological marker of disease progression in human immunodeficiency virus infection than anti-p24 decline+, *J. AIDS*, **1** : 155-9.
115. LAU AS DER S.D., READ S.E. et coll. 1991, *Regulation of tumor necrosis factor receptor expression by acid-labile interferon-alpha from AIDS sera+, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **7** : 545-52.
116. LAZARIN A., D'ARMINIO M.A., NOVATI R. et coll. 1990a, *Beta₂-microglobulin ($7\beta_2$ -M) and neopterin serum levels in infants born to seropositive mothers+, (F.B.448) IV Intl. AIDS Conf., San Francisco.
117. LAZARIN A., D'ARMINIO M.A., NOVATI R. et coll. 1990b, *Beta₂- microglobulin and neopterin serum levels in infants born to seropositive mothers+, Track B: Clin. Sci. and Trials, Milan, Italy.
118. LEE C.A., PHILLIPS A., ELFORD J. et coll. 1989, *The natural history of human immunodeficiency virus infection in a haemophiliac cohort+, *Brit. J. Haematol.* **73** : 228-34.
119. LEE C.A., PHILLIPS A.N., ELFORD J. et coll. 1990, *Ten year follow-up of a cohort of 111 anti-HIV seropositive haemophiliacs+, (Th.C.641) IV Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
120. LIEBES L. 1988, *Evaluation of the shed CD8, IL2, and T4 receptors in patients with human immunodeficiency virus infection+, Proceedings of the Third Annual Conf. on Clin. Immunol., San Francisco, CA.

121. MARTINEZ-MAZA O., November 1988, *Lymphokines/Cytokines in HIV infection interleukin-6 (IL-6)+, Proceedings of the Third Annual Conf. on Clin. Immunol., San Francisco, CA.
122. MASUR H., OGNIBENE F.P., YARCHOAN R. et coll. 1989, *CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection+, *Ann. Intern Med.* **111** : 223-31.
123. MCDUGAL J.S., HUBBARD M., NICHOLSON J.K.A. et coll. 1985, *Immune complexes in the acquired immunodeficiency syndrome: relationship to disease manifestation, risk group, and immunologic defect+, *J. Clin. Immunol.* **59** : 267-75.
124. MCDUGAL J.S., KENNEDY M.S., SLIGH J.M., et coll. 1986, *Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule+, *Science*, **231** : 282-5.
125. MCHUGH T., SCILLIAN J., WANG J., et coll. 1990, *Evaluation of HIV p24 antibody levels, determined with a flow cytometric immunoreactive bead (IRB) assay, in predicting disease progression+, (Th.C.670) IV Intl Conf AIDS, San Francisco.
126. MELMED R.N., TAYLOR J.M.G., DETELS R. et coll. 1989, *Serum neopterin changes in HIV-infected subjects: indicator of significant pathology, CD4 T cell changes, and the development of AIDS+, *J. AIDS.* **2** : 70-6.
127. MERIGAN T.G., 1990, *You can teach an old dog new tricks: how AIDS trials are pioneering new strategies+, *New Engl. J. Med.* **323** : 1341-3.
128. MING W.J., BERSANI L. et MANTOVI A. 1987, *Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes+, *J. Immunol.* **138** : 1469-74.
129. MINTZ M., RAPAPORT R., OLESKE J.M., et coll. 1989, *Elevated serum levels of tumor necrosis factor are associated with progressive encephalopathy in children with acquired immunodeficiency syndrome+, *AJDC*, **143** : 771-4.
130. MIZUMA H., LITWIN S. et ZOLLA-PAZNER S., 1988, *B cell activation in HIV infection: relationship of spontaneous immunoglobulin secretion to various immunological parameter+, *Clin. Exp. Immunol.*, **71** : 410-6.
131. MORIMOTO C., LETVIN N.L., BOYD A.W. et coll. 1985, *The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset+, *J. Immunol.* **134** : 3762-9.
132. MORRIS L., DISTENFELD A., AMOROSI E. et KARPATKIN S. 1982, *Autoimmune thrombocytopenic purpura in homosexual men+, *Ann. Intern. Med.* **96** : 714-7.
133. MORROW W.J.W., ISENBERG D.A., SOBOL R.E. et coll. 1991, *AIDS virus infection and autoimmunity: a perspective of the clinical, immunological, and molecular origins of the autoallergic pathologies associated with HIV disease+, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **58** : 163-80.
134. MOSS, A. 1990. "Surrogate markers for survival in patients with AIDS and AIDS-related complex treated with Zidovudine". VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.

135. MOSS A.R., BACCHETTI P., OSMOND D. et coll. 1988, *Seropositivity for HIV and the development of AIDS or AIDS-related condition: three year follow-up of the San Francisco General Hospital Cohort+, *Brit. Med. J.* **296** : 745-50.
136. MULDER J.W., KRIJNEN P., GOUDSMIT J. et coll. 1990, *HIV-1 p24 antigenemia does not predict time of survival in AIDS patients+, *Genitourin Med.* **66** : 138-41.
137. NAKAJIMA K., MARTINEZ-MAZA O., HIRANO T. et coll. 1989, *Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN-7 β_2) production by HIV+, *J. Immunol.* **142** : 531-6.
138. NELSON D.L. 1988, *Soluble Interleukin-2 receptors (Tac Protein): Biology and Pathology+, Proceedings of the Third Annual Conf. Clin. Immunol., San Francisco, CA.
139. NICHOLSON J.K.A., JONES B.M., ECHENBERG D.F. et coll. 1987, *Phenotypic distribution of T cells of patient who have subsequently developed AIDS+, *Clin. Immunol. and Immunopathol.* **43** : 82-7.
140. NICHOLSON J.K.A. et Jones B.M. 1989, *Lymphocyte immunophenotyping at the Centre for Disease Control: the program and special studies+, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **52** : 61-7.
141. NIEDERWIESER A., HUBER C., GRATWOHL G. et coll. 1984, *Neopterin as a new biochemical marker in the clinical monitoring of bone marrow transplant recipients+, *Transplantation*, **38** : 497-500.
142. NIEDERWIESER A., JOLLER P., SEGER R. et coll. 1986, *Neopterin in AIDS, other immunodeficiencies, and bacterial and viral infections+, *Klin Wochenschr*, **64** : 333-7.
143. ODELL T.W. et GREEN J.A. 1990, *Prolonged zidovudine therapy: confounded by pneumocystis carinii prophylaxis?+, *JAMA*, **263** : 1635-6.
144. ORGAD S., MALONE G., ZAIZOV R. et coll. 1987, *Antibodies to HIV in Israeli haemophiliacs: relationship between serological profile and disease developmen+, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **3** : 323-32.
145. ORHOLM M., PEDERSEN C., MATHIESEN L. et coll. 1989, *Suppression of p24 antigen in sera from HIV-infected individuals with low-dose alpha-interferon and Zidovudine: a pilot study+ *J. AIDS*, **3** : 97-100.
146. OSMOND D., BACCHETTI P., KRAMPF W. et coll. 1989, *A comparison of the prognostic value of 7 β_2 -microglobulin, neopterin, and soluble CD8 in HIV infection+, (M.A.P.100) V Intl. Conf. AIDS, QC.
147. OZTURK G.E., KOHLER P.F., C.R. HORSBURGH et coll. 1987, *The significance of antilymphocyte antibodies in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and their sexual partners+, *J. Clin. Immunol.* **7** : 130-9.
148. PANZER S., STAIN C., HARTL H. et coll. 1989, *Anticardiolipin antibodies are elevated in HIV-1 infected haemophiliacs but do not predict for disease progression+, *Thromb. Haemost.* **61** : 81-5.
149. PARKIN J.M., HELBERT M., HUGHES C.L. et PINCHING A.J. 1989, *Immunoglobulin G subclass deficiency and susceptibility to pyogenic infections in patients with AIDS-related complex and AIDS. *J. AIDS*, **3** : 37-9.
150. PAUL D.A., FALK L.A., KESSLER H.A. et coll. 1987, *Correlation of serum HIV antigen and antibody with clinical status in HIV-infected patients+, *J. Med. Virol.* **22** : 351-63.

151. PERKOCHA L.A. et RODGERS G.M. 1988, *Hematologic aspects of human immunodeficiency virus infection: laboratory and clinical considerations+, *Amer. J. Hematol.* **29** : 94-105.
152. PHILLIPS A., LEE C.A., ELFORD J. et coll. 1989, *Prediction of progression to AIDS by analysis of CD4 lymphocyte counts in a haemophilic cohort+, *J. AIDS*, **3** : 737-41.
153. PHILLIPS A., LEE C.A., ELFORD J. et coll. 1990, *Why the slower progression rate to AIDS in young HIV-infected patient?+ (Th.C.643) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
154. POLIS M.A. et MASUR H. 1990, *Predicting the progression to AIDS+, *Amer. J. Med.* **89** : 701-5.
155. PRINCE H.E., KLEINMAN S., WILLIAMS A.E. 1988, *Soluble IL-2 receptor levels in serum from blood donors seropositive for HIV-1+, *J. Immunol.* **140** : 1139-41.
156. PRINCE H.E., KLEINMAN S., CZAPLICKI C., et coll. 1990, *Interrelationships between serologic markers of immune activation and T-lymphocytes subsets in HIV infection+, *J. AIDS*, **3** : 525-30.
157. PRINCE H.E. et JENSEN E.R. 1991, *Three-colour cytofluorometric analysis of CD8 cell subsets in HIV-1 infection+, *J. AIDS*, **4** : 1227-32.
158. RAGNI M.V., O'BRIEN T.A., REED D. et coll. 1988, *Prognostic importance of antibodies to human immunodeficiency virus by recombinant immunoassay and Western Blot techniques in HIV antibody-positive haemophiliacs+, *AIDS Res. and Human Retroviruses*, **4** : 223-31.
159. RASKA K. Jr., KIM H.C., RASKA K. 3d et coll. 1989, *Human immunodeficiency virus (HIV) infection in haemophiliacs: long-term prognostic significance of the HIV serologic pattern+, *Clin. Exp. Immunol.*, **77** : 1-6.
160. RANKI A., JARVINEN K., VALLE S.L. et coll. 1990, *Antibodies to recombinant HIV-1 NEF protein detected in HIV-1 infection as well as in non-risk individual+, *J. AIDS*, **3** : 348-55.
161. REDDY M.M., SORRELL S.J., LANGE M. et GRIECO M.H. 1988, *Tumor necrosis factor and HIV p24 antigen levels in serum of HIV-infected populations+, *J. AIDS*, **1** : 436-40.
162. REDDY M.M., MCKINLEY G., ENGLARD A. et Grieco M.H. 1989a, *Effect of azidothymidine (AZT) on neopterin, beta₂-microglobulin, soluble CD8, soluble interleukin-2 receptor, tumor necrosis factor and HIV p24 antigen levels in patients with AIDS-related complex and AIDS+, (M.B.P.360) V Intl. Conf. AIDS, QC.
163. REDDY M.M. et GRIECHO M.H. 1989b, *Neopterin and alpha and beta interleukin-1 levels in sera of patients with human immunodeficiency virus infection+, *J. Clin. Microbiol.* **27** : 1919-23.
164. REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G. et SCHLOSSMAN S.F. 1979, *Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody+, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76** : 4061-6.
165. REISS P., DE RONDE A., LANGE J.M.A. et coll. 1989, *Antibody response to the viral negative factor (nef) in HIV-1 infection: a correlate of levels of HIV-1 expression+, *J. AIDS*, **3** : 227-33.

166. REISS P., LANGE J.M.A., DEKKER J. et coll. 1990, *Relevance of antibody response to HIV-1 non-structural proteins for understanding the pathogenesis and progression of infection+, (Th.C.664) VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
167. RICKMAN W.J., WAXDAL M.J., MONICAL C., et coll. 1989, *Lymphocyte phenotyping: quality assurance program+, Proceedings of the Ann. Conf. Clin. Immunol., VA.
168. ROBB R.J., A. MUNCK et K.A. SMITH, 1981. *T cell growth factor receptors: quantitation, specificity and biological relevance+, *J. Exp. Med.* **154** : 1455-xxx.
169. ROBERTS R.B., HOLLINGER F.B., PARKS W.P. et coll. 1990, *LAS Collaborative Group. A multicentre clinical trial of oral ribavirin in HIV-infected people with lymphadenopathy: virologic observation+, *J. AIDS*, **4** : 67-72.
170. ROLLAG H., EVENSEN S.A., FROLAND S.S. et GLOMSTEIN A. 1987, *The significance of HIV antigen and HIV antibodies specific against envelope and core proteins in serum of HIV-infected haemophiliacs+, *Eur. J. Haematol.* **39** : 353-5.
171. ROUX-LOMBARD P., MONDOUX C., CRUCHAUD A. et DAYER J.M. 1989, *Purified blood monocytes from HIV 1-infected patients produce high levels of TNF alpha and IL-1+, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **50** : 374-84.
172. ROY S., MORROW W.J.W., CHRISTIAN C., et coll. 1990, *Persistent immune complexes and abnormal CD4/CD8 ratios in HIV infection+, *J. AIDS*. **3** : 134-8.
173. RUBIN L.A., KURMAN C.C., FRITZ M.E. et coll. 1985, *Soluble interleukin-2 receptors are released from activated human lymphoid cells *in vitro*+, *J. Immunol.* **135** : 3172-7.
174. RUEDY J., SCHECHTER M. et MONTANER J.S.G. 1990, *Zidovudine for early human immunodeficiency virus (HIV) infection: Who, when, and how?+, *Ann. Intern. Med.* **112** : 721-3.
175. RUGMAN F.P., MANNION P.T., HAY C.R. et coll. 1989, *Cytomegalovirus, serum 7B₂-microglobulin, and progression to AIDS in HIV-seropositive haemophiliacs+, *Lancet*, **2** : 631.
176. SANTELLI G., MELILLO G., MARFELLA A. et coll. 1988, *Urinary neopterin and immunological features in patients with Kaposi's sarcoma+, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **2** : 1391-1396.
177. SCHECHTER M.T., BOYKO W.J., CRAIB K.J.P. et coll. 1987, *Effects of long-term seropositivity to human immunodeficiency virus in a cohort of homosexual men+, *J. AIDS*, **1** : 77-82.
178. SCHECHTER M.T., CRAIB K.J.P., LE T.N. et coll. 1989, *Progression to AIDS and predictors of AIDS in seroprevalent and seroincident cohorts in homosexual men+, *J. AIDS*, **3** : 347-53.
179. SCHUPBACK J., HALLER O., VOGT M. et coll. 1985, *Antibodies to HTLV-III in swiss patients with AIDS and pre-AIDS and in groups at risk for AIDS+, *New Engl. J. Med.*, **312** : 265-70.
180. SCHULOF R.S., PARENTI D.M., SIMON G.L. et al. 1990, *Clinical, virologic, and immunologic effects of combination therapy with ribavirin and isoprinosine in HIV-infected homosexual men+, *J. AIDS*, **3** : 485-92.

181. SELIGMAN M., CHESS L. et FAHEY J. 1984, *AIDS—an immunologic re-evaluation+, *New Engl. J. Med.*, **311** : 1286-92.
182. SHER R. 1984, *Short communication: 7 β_2 -microglobulin levels in homosexual men in Johannesburg, South Africa+, *AIDS Res.*, **1** : 271-4.
183. SHERRY B. et CERAMI A. 1988, *Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine and autocrine control of inflammatory responses+, *J. Cell. Biol.*, **107** : 1269-77.
184. SONNERBORG A.B., VON STEDINGK L.-V., HANSSON L.-O. et STRANNEGARD O.O. 1989, *Elevated neopterin and 7 β_2 -microglobulin levels in blood and cerebrospinal fluid occur early in HIV-1 infection+, *J. AIDS*, **3** : 277-83.
185. SPECTOR S.A., KENNEDY C., MCCUTCHAN J.A. et coll. 1989, *The anti-viral effect of Zidovudine and ribavirin in clinical trials and the use of p24 antigen levels as a virologic marker+, *J. Inf. Dis.*, **159** : 822-8.
186. STEINBERG J.P., SPEAR J.B., MURPHY R.L. et coll. 1989, *Predictors of outcome in AIDS patients receiving zidovudine+, *J. AIDS*, **2** : 229-34.
187. STITES D.P., MOSS A.R., BACCHETTI P., et coll. 1989, *Lymphocyte subset analysis to predict progression to AIDS in a cohort of homosexual men in San Francisco+, *Clin. Immunol. and Immunopathol.*, **52** : 96-103.
188. STRICKER P.B., ABRAMS D.I., CORASH L.C. et SHUMAN M.A. 1985, *Target platelet antigen in homosexual men with immune thrombocytopenia+, *New Engl. J. Med.*, **313** : 1375-80.
189. STRICKER R.B., MCHUGH T.M., MOODY D.J. et coll. 1987, *An AIDS-related cytotoxic antibody reacts with a specific antigen on stimulated CD4+ T cells+, *Nature*, **327** : 710-3.
190. TAYLOR J.M., FAHEY J.L., DETELS R. et GIORGI J.V. 1989, *CD4 percentage, CD4 number, and CD4:CD8 ratio in HIV infection: which to choose and how to use+, *J. AIDS*, **2** : 114-24.
191. TEITEL J.M., FREEDMAN J.J., GARVEY M.B. et KARDISH M. 1989, *Two-year evaluation of clinical and laboratory variables of immune function in 117 haemophiliacs seropositive or seronegative for HIV-1+, *Am. J. Hematol.*, **32** : 262-72.
192. TESHIGAWARA K., WANG H.M., KATO K. et SMITH K.A. 1987, *Interleukin-2 high-affinity receptor expression requires two distinct binding proteins+, *J. Exp. Med.*, **165** : 223-38.
193. THIRIART C., GOUDSMIT J., SCHELLEKENS P. et coll. 1988, *Antibodies to soluble CD4 in HIV-1 infected individuals+, *J. AIDS*, **2** : 345-51.
194. TOMSOVA Z. et UZOVA J. 1989, *Simple chromatographic determination of the neopterin marker in immunopathies+, *Cas. Lek. Cesk.*, **128** : 59-61.
195. TSOUKAS C., O'SHAUGHNESSY M. et GOLD P. 1985, *Relationship of the expression of the Leu-2+ Leu-7+ T cell subset and HTLV III antibody positivity+, Proceedings of the 6th Intl. Meeting of Sexually Transmitted Diseases, London.

196. TSOUKAS C., SAMPALIS J., SHUSTER J. et O'SHAUGHNESSY M. 1986, *Co-expression of T-lymphocyte-associated antigens Leu-2 Leu-7 in haemophiliacs with antibodies to HTLV III+, *Research In Clinic and Laboratory*, **16** : 87.
197. TSOUKAS C., STRAWCZNSKI H., GERVAIS F. et coll. 1987, *Five-year (1982-1987) prospective clinical and immune evaluation of haemophiliacs before and after exposure to HIV+, *Clin. Invest. Med.*, **10** : B49.
198. TSOUKAS C., ROBERTS R., GENT M., et coll. 1990a, *Short-term variability of T cell subsets in asymptomatic HIV disease+, *Clin. Invest. Med.*, **13** : B7.
199. TSOUKAS C., FRIEDMAN J., FANNING M., et coll. 1990b, *Long-term prospective evaluation of T cell subsets in asymptomatic HIV-infected individuals treated with Zidovudine+, *Clin. Invest. Med.*, **13** : B7.
200. TSOUKAS C., FRIEDMAN J., FANNING M. et coll. 1990c, *Three year prospective evaluation of T cell subsets in asymptomatic HIV-infected individuals treated with Zidovudine+, VI Intl. Conf. on AIDS, San Francisco.
201. TSOUKAS C. 1991, *Surrogate markers of HIV disease progression in persons with haemophilia and human immunodeficiency virus infection+, *Hemophilia and Von Willibrand's disease in the 1990s. A new decade of hopes and challenges*, J.M. Lusher et C.M. Craig, édés., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 413-9.
202. TSOUKAS C., FALUTZ J., WAINBERG M. et coll., sur presse 1992, *Long-term evaluation of CD4 T cell counts in asymptomatic HIV-infected individuals treated with Zidovudine+.
203. TUSET C., ELORZA J.F.J., TUSET L., et coll. 1990, *The utility of a number of AIDS evolution markers in the follow up of the vertical transmission of HIV-infection. Track B: Clin. Sci. and Trials, Valencia, Spain.
204. TUSET C., ELORZA J.F.J., TUSET L. et coll. 1990, *The utility of a number of AIDS evolution markers in the follow up of the vertical transmission of HIV infection (F.B.443)+, VI Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
205. UGEN K.E., GOEDERT J.J., BOYER, et coll. 1992, *Vertical transmission of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Reactivity of maternal sera with glycoprotein 120 and 41 peptides from HIV type 1+, *J. Clin. Invest.*, **89** : 1923-30.
206. VOLBERDING P.A., LAGAKOS S.W., KOCH M.A., et coll. 1990, *Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection: a controlled trial in persons with fewer than 500 CD4 positive cells per cubic millimetre+, *New Engl. J. Med.* **322** : 941-9.
207. VUILLIER F., LAPRESLE C. et DIGHIERO G. 1988, *Comparative analysis of CD4-4B4 and CD4-2H4 lymphocyte subpopulations in HIV negative homosexual, HIV seropositive and healthy subjects+, *Clin. Exp. Immunol.*, **71** : 8-12.
208. VRANIZAN K., GORTER R., OSMOND D., KEFFELEW A., WILLIAMS A., MOSS A.R. 1990, *Laboratory markers for HIV in intravenous drug users in San Francisco: Race and sex differences+. (F.C.554) VI. Intl. Conf. AIDS, San Francisco.
209. WALSH C.M., NARDI M.A. et KARPATKIN S. 1984, *On the mechanism of thrombocytopenia purpura in sexually active homosexual men+, *New Engl. J. Med.*, **311** : 635-9.

210. WEBER J.N., WEISS R.A., ROBERTS C., et coll. 1987, *Human immunodeficiency virus infection in two cohorts of homosexual men: neutralizing sera and association of anti-gag antibody with prognosis+, *Lancet*, **1** : 119-22.
211. WERNER E.R., BICHLER A., DEXENBICHER G., et coll. 1987, *Determination of neopterin in serum and urine+, *Clin. Chem.*, **33** : 62-6.
212. WILKS D., WALKER L.C., HABESHAW J.A., et coll. 1990, *Anti-CD4 autoantibodies and screening for anti-idiotypic antibodies to anti-CD4 monoclonal antibodies in HIV-seropositive people+, *J. AIDS*, **4** : 113-8.
213. WITKIN S.S., BONGIOVANNI A.M., YU I.R., et coll. 1983, *Humoral immune responses in healthy heterosexual and vasectomized men and in homosexual men with the acquired immunodeficiency syndrome+, *AIDS Res.*, **1** : 31-44.
214. WRIGHT S.C., JEWETT A., MITSUYASU R. et BONAVIDA B. 1988, *Spontaneous cytotoxicity and tumor necrosis factor production by peripheral blood monocytes from AIDS patients+ *J. Immunol.*, **141** : 99-104.
215. ZOLLA-PAZNER S., WILLIAM D., EL-SADR W., et coll. 1984, *Quantitation of 7 β_2 -microglobulin and other immune characteristics in a prospective study of men at risk for acquired immune deficiency syndrome+, *JAMA*, **251** : 2951-5.