

Université de Montréal

**Caractérisation des interactions d'inhibiteurs de l'entrée du VIH
dans un modèle de cellules dendritiques in vitro**

Par

Geneviève Bélanger Jasmin

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

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

Décembre 2003

©, Geneviève Bélanger Jasmin, 2003



W

4

U58

2004

V.086

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Facultés des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Caractérisation des interactions d'inhibiteurs de l'entrée du VIH
dans un modèle de cellules dendritiques in vitro

Présenté par :
Geneviève Bélanger Jasmin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Denis Phaneuf

Directrice de recherche : Cécile Tremblay

Membre du jury : Cécile Tremblay

Membre du jury : Madeleine Ravaoarinoro

Mémoire accepté le: _____

Sommaire

Les cellules dendritiques (DCs) jouent un rôle primordial au niveau de la dissémination et de la propagation du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) lors d'une primo-infection. Suite à une exposition mucoale, le virus exploite les fonctions immunitaires de la cellule dendritique afin d'être transporté aux ganglions lymphatiques pour infecter ses cellules cibles, les cellules lymphocytes T CD4⁺. Deux modes d'infection de la DC sont connus, en *cis* et en *trans*. Pareillement à l'entrée du VIH dans les lymphocytes T CD4⁺, l'infection en *cis* des DCs s'établit grâce à la liaison de la protéine d'enveloppe virale gp120 avec le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 et/ou CXCR4 en surface de la cellule dendritique. Ces liaisons provoquent un changement conformationnel de gp120, et ultérieurement de gp41 menant à la fusion des membranes et à l'entrée du VIH dans la cellule dendritique. Le virus peut alors poursuivre son cycle de réplication et produire des virions infectieux. Lors de l'infection en *trans*, le virus exploite les récepteurs d'antigènes à la surface des cellules dendritiques. Plusieurs récepteurs possédant cette fonction sont exprimés en surface des cellules dendritiques. Le mieux caractérisé jusqu'à maintenant est DC-SIGN, une lectine de type-C qui reconnaît certains hydrates de carbone. Lié à cette lectine par sa gp120, le VIH est rapidement internalisé au niveau d'endosomes, protégé contre la dégradation et les anticorps neutralisants et recyclé à la membrane cellulaire une fois rendu aux sites riches en lymphocytes T CD4⁺. Bien que les mécanismes d'échappement du virus à la voie endocytaire de la cellule dendritique et du transfert des virions aux cellules T CD4⁺ par DC-SIGN soient encore inconnus, il

n'en demeure pas moins que l'infection en *trans* entraîne une production virale fulgurante des lymphocytes T CD4⁺.

Il a été démontré que des molécules inhibitrices de l'entrée du VIH au niveau des lymphocytes T CD4⁺ empêchaient l'infection de celles-ci, et ce, de façon synergique. Dans cette étude, nous avons évalué l'effet de ces inhibiteurs, un inhibiteur de liaison au corécepteur (SCH-C) et un inhibiteur de fusion (T-20) ainsi que des anticorps dirigés contre DC-SIGN sur l'infection des cellules dendritiques et par conséquent, la transmission du VIH aux cellules T CD4⁺. Pour ce faire, nous avons infecté des cellules dendritiques avec le virus BAL en présence et en absence des inhibiteurs. Au jour 3 post infection des cellules T ont été ajoutés aux DCs pour évaluer l'infection en *trans*. L'infection a été détectée par la recherche de l'antigène p24. Les résultats de cette étude démontrent que les molécules utilisées parviennent à bloquer l'infection de la cellule dendritique, et que cet effet se répercute sur l'infection en *trans* des lymphocytes T CD4⁺.

Mots clés

VIH-1, cellules dendritiques, DC-SIGN, infection en *cis*, infection en *trans*, inhibiteurs d'entrée du VIH-1, SCH-D, T20.

Summary

Dendritic cells play an important role in the dissemination and propagation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) during acute infection. Following mucosal exposition, the virus exploits the immune functions of the DCs in order to be transported to the lymph nodes where it will infect its target cells, the CD4⁺ T lymphocytes. So far, two pathways of HIV-1 penetration into DCs have been described resulting in *cis*- and *trans*-infection. Similarly to HIV entry in CD4⁺ T cells, *cis*-infection of DCs occurs when the gp120 viral envelope interacts first with the CD4 coreceptor and then with the CCR5 and/or CXCR4 coreceptor at the surface of the DC. These binding events trigger conformational changes in gp120 and subsequently to gp41 leading to membrane fusion and to HIV entry in the DC. The HIV-1 then continues its replication cycle resulting in the production of infectious virions. During the *trans*-infection, the virus exploits the antigen internalization receptors at the surface of DCs. Several receptors harboring this function are expressed at the surface of DCs. One of the best characterized is DC-SIGN, a C-type lectin that recognizes some carbohydrates. Linked to this lectin by the gp120, HIV is rapidly internalized into endosomes, protected against degradation and neutralizing antibodies, and recycled at the cellular membrane once it has reached a CD4⁺ T lymphocytes rich area. Although the mechanisms of viral release through the DCs endocytic pathway and of transfer to the CD4⁺ T cells by DC-SIGN are still unknown, *trans*-infection of CD4⁺ T lymphocytes results in an important burst of viral production.

It has been shown that some inhibitors of the HIV entry can block infection of CD4⁺ T lymphocytes in a synergistic manner. In this study, we have evaluated the inhibitory effects of a coreceptor inhibitor (SCH-D), a fusion inhibitor (T-20) as well as antibodies direct against DC-SIGN, on DCs infection, and subsequently on the transmission of HIV-1 to CD4⁺ T cells. Dendritic cells have been infected by the laboratory virus BAL with or without these drugs. To evaluate *trans*-infection, T cells have been added to DCs at day 3 post infection. Infection have been detected by the search of p24 antigen. The results of our study demonstrate that the drugs used have been able to efficiently block DCs infection, and that this effect has a repercussion on the *trans*-infection of the T CD4⁺ lymphocytes.

Key words

HIV-1, dendritic cells, DC-SIGN, *cis*-infection, *trans*-infection, entry inhibitor, SCH-C, T20.

Table des matières

Sommaire	iii
Mots clés	v
Summary	vi
Key words	viii
Table des matières	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xv
Liste des abréviations	xviii
1. INTRODUCTION	1
1.1 Introduction générale	2
1.2 Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	5
1.2.1 Généralités.....	5
1.2.2 Cycle d'infection du VIH-1	7
1.3 Les cellules dendritiques	9
1.3.1 Généralités.....	9
1.3.2 Fonctions	10
1.3.3 Immatures versus matures	12

1.3.4	Implication dans la pathogénèse de certains micro-organismes.....	14
1.4	Les cellules dendritiques et le VIH-1.....	16
1.4.1	Infection en <i>cis</i> versus <i>trans</i>	16
1.4.2	DC-SIGN.....	19
1.4.2.1	<i>Généralités</i>	19
1.4.2.2	<i>Fonctions immunologiques</i>	21
1.4.3	DC-SIGN et VIH-1	23
1.5	Inhibiteurs de l'infection à VIH.....	26
1.5.1	Généralités.....	27
1.5.2	Nouvelle classe d'agent antirétroviraux	28
1.5.2.1	<i>Généralités</i>	28
1.5.2.2	<i>Inhibiteurs d'attachement</i>	30
1.5.2.3	<i>Inhibiteurs de fusion</i>	32
1.5.2.4	<i>Caractérisation des inhibiteurs d'entrée dans un modèle de lymphocytes T</i>	33
1.5.2.5	<i>Caractérisation des inhibiteurs d'entrée dans un modèle de DCs immatures</i>	35
2.	ARTICLE	37
	<i>Article #1</i>	38
	<i>Characterization of HIV-1 entry inhibitors interactions in an in vitro model of dendritic cells</i>	38
3.	DISCUSSION	65

4. CONCLUSION 74

5. BIBLIOGRAPHIE..... 76

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Tableau I : Mise à jour de l'épidémiologie du VIH _____ 2

Tableau II : Liste des agents antirétroviraux ciblant l'entrée du VIH _____ 29

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1 : Virion du VIH-1	5
Figure 2 : Attachement et pénétration du VIH-1	8
Figure 3 : Fonctions immunologiques des cellules dendritiques	11
Figure 4 : Infection en cis et en trans des cellules dendritiques par le VIH-1	16
Figure 5 : Schématisation de la molécule DC-SIGN	19
Figure 6 : Interaction entre DC-SIGN et ICAM-2/3	21
A : Migration (ICAM-2)	21
B : Interaction cellule dendritique et cellule T (ICAM-3)	22
Figure 7 : Infection en trans et en cis via DC-SIGN	23
Figure 8 : Infection en cis via DC-SIGN	25
Figure 9 : Schéma des sites d'actions des agents antirétroviraux actuels	26
Figure 10 : Mécanisme d'action de l'inhibiteur de fusion T20	32

ARTICLE

Figure 1 : Cis-infection of dendritic cells with 10,000 TCID50 of	52
A : X4 isolate IIIb	52
B : R5 isolate BAL	52
Figure 2 : Trans-infection of PBMCs mediated by dendritic cells	53
Figure 3 : Purity of dendritic cells	53

Figure 4 : Dose-response of SCH-D, a CCR5 inhibitor on	54
<i>A : cis-infection of dendritic cells with an R5 virus</i>	54
<i>B : trans-infection of PBMCs by dendritic cells</i>	54
Figure 5 : Dose-response of T-20, a fusion inhibitor on	55
<i>A : cis-infection of dendritic cells with an R5 virus</i>	55
<i>B : trans-infection of PBMCs by dendritic cells</i>	55
Figure 6 : Dose-response of single drugs versus SCH-D + T-20 combined	56

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
14a Pre	: Isolat clinique du VIH-1 à tropisme X4
ADNc	: ADN complémentaire
Ag	: Antigène
AMD-3100	: Drogue qui inhibe l'attachement du VIH-1 au CXCR4
ARN	: Acide ribonucléique
ART	: Thérapie antirétrovirale
AutoMACS	: «Automated bench-top magnetic cell sorter»
BAL	: Souche de laboratoire du VIH-1 à tropisme R5
Ca ²⁺	: Calcium
CCL-11	: «Curtis C-type lectin clone 11»
CCR5	: «chemokine (C-C motif) receptor 5»
CD14	: Marqueur de différenciation en surface des monocytes
CD19	: Marqueur de différenciation en surface des cellules B
CD3	: Marqueur des cellules T. Associé au TCR
CD4	: Corécepteur pour les CMH II
CD40	: Récepteur de signal de costimulation
CD54	: ICAM-1, molécule d'adhésion intercellulaire
CD58	: LFA-3, molécule d'adhésion
CD8	: Corécepteur pour les CMH I
CD80	: Costimulateur, ligand de CD28 et CTLA-4
CD83	: Marqueur faiblement exprimé sur DCs immatures
CD86	: Marqueur exprimé sur DCs
CI	: Index de combinaison
CLR	: Récepteur de lectine de type C
CMH-I/II	: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II
CO ₂	: Gaz carbonique
CPAs	: Cellules présentatrices d'antigènes
CRD	: Domaine reconnaissant les hydrates de carbone

CXCR4	: «chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DCN46	: Anticorps monoclonal dirigé contre DC-SIGN, IgG2 _b
DCs	: Cellules dendritiques
DC-SIGN	: «Dendritic cell specific-ICAM-3 grabbing non-integrin»
DC-SIGN(R)	: «DC-SIGN related»
EDTA	: «Ethylenediaminetetraacetic acid»
EGTA	: «Ethylbis(oxyethylenitrilo)tetraacetic acid»
ELISA	: «Enzyme-linked immunosorbent assay»
FDA	: «Food and drug administration
FITC	: «Fluorescein isothiocyanate fluorochrome»
GM-CSF	: Facteur stimulant les colonies granulocytes-macrophages
gp120	: Glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1
gp41	: Sous unité de la gp120 du VIH-1
HAART	: «Highly active antiretroviral therapy»
HCV	: Virus de l'hépatite C
HEPES	: «2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid»
HLA-DM	Gène d'histocompatibilité de classe II, locus DMA
HLA-DR	: Paire de gènes pour les chaînes α et β de classe II
IC ₅₀	: «50% inhibitory concentrations»
ICAM-2	: Molécule d'adhésion intercellulaire 2
ICAM-3	: Molécule d'adhésion intercellulaire 3
IgG	: Immunoglobuline de type G
IL-2	: Interleukine 2
Il-4	: Interleukine 4
IN	: Protéine intégrase du VIH
INF-1	: Interféron de type 1
kb	: Kilobase
LC	: Cellules de Langerhans
MDDCs	: Cellules dendritiques dérivées des monocytes
mg	: Milligramme
MIIC	: Compartiments intracellulaires riches en CMH de classe II



ml	: Millilitre
mM	: Millimolaire
MMR	: Récepteur de mannose en surface des macrophages
ND	: «Nectin domain» sur DC-SIGN
p24	: Protéine 24 du virus VIH-1
PBMCs	: «Peripheral blood mononuclear cells»
PBS	: «Phosphate buffer saline»
PE	: «Phycoerytherin fluorochrome»
PHA	: «Phytohemagglutinin assay»
R5	: VIH à tropisme R5, entre via le corécepteur CCR5
RD	: Domaine répété sur DC-SIGN
RT	: Transcriptase inverse
SCH-D	: Antagoniste de CCR5
SIDA	: Syndrome de l'immunodéficience acquise humaine
SIV	: «Simian immunodeficiency virus»
T20	: Drogue qui inhibe la fusion des membranes
TCID ₅₀	: «50% tissue culture infective dose»
TCR	: Récepteur cellulaire en surface des cellules T
U	: Unité
VIH-1/2	: Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 ou 2
X4	: VIH à tropisme X4, entre via le corécepteur CXCR4
µg	: Microgramme
µl	: Microlitre

1. Introduction

1.1 Introduction générale

Tableau I : Mise à jour de l'épidémiologie du VIH (55)

Regional HIV/AIDS statistics and features, end of 2003				
	Adults & children living with HIV/AIDS	Adults & children newly infected with HIV	Adult prevalence rate [%] *	Adult & child deaths due to AIDS
Sub-Saharan Africa	25.0 – 28.2 million	3.0 – 3.4 million	7.5 – 8.5	2.2 – 2.4 million
North Africa & Middle East	470 000 – 730 000	43 000 – 67 000	0.2 – 0.4	35 000 – 50 000
South and South-East Asia	4.6 – 8.2 million	610 000 – 1.1 million	0.4 – 0.8	330 000 – 590 000
East Asia & Pacific	700 000 – 1.3 million	150 000 – 270 000	0.1 – 0.1	32 000 – 58 000
Latin America	1.3 – 1.9 million	120 000 – 180 000	0.5 – 0.7	49 000 – 70 000
Caribbean	350 000 – 590 000	45 000 – 80 000	1.9 – 3.1	30 000 – 50 000
Eastern Europe & Central Asia	1.2 – 1.8 million	180 000 – 280 000	0.5 – 0.9	23 000 – 37 000
Western Europe	520 000 – 680 000	30 000 – 40 000	0.3 – 0.3	2 600 – 3 400
North America	790 000 – 1.2 million	36 000 – 54 000	0.5 – 0.7	12 000 – 18 000
Australia & New Zealand	12 000 – 18 000	700 – 1 000	0.1 – 0.1	<100
TOTAL	40 million [34 – 46 million]	5 million [4.2 – 5.8 million]	1.1 % [0.9-1.3]	3 million [2.5 – 3.5 million]

* The proportion of adults [15 to 49 years of age] living with HIV/AIDS in 2003, using 2003 population numbers

The ranges around the estimates in this table define the boundaries within which the actual numbers lie, based on the best available information. These ranges are more precise than those of previous years, and work is under way to increase even further the precision of the estimates that will be published mid-2004.

Tableau I : Statistiques et prévisions régionales du VIH/SIDA à la fin de l'année 2003. 1^{ère} colonne rapporte le nombre de personnes, adultes et enfants, vivant avec le VIH/SIDA. La 2^e colonne présente le nombre de personnes, adultes et enfants, nouvellement infectés par le VIH. La 3^e colonne donne le ratio de prévalence d'infection chez les adultes et la 4^e colonne révèle le nombre de décès chez les adultes et les enfants dû au SIDA.

* La proportion d'adultes (15 à 49 ans) vivant avec le VIH/SIDA établie à partir de la population de l'année 2003. L'écart entourant les estimations présentes dans ce tableau définit les limites dans lesquelles le nombre actuel se situe, basée sur les meilleures informations disponibles. Ces écarts sont plus précis que ceux des années précédentes, et l'organisation mondiale de la santé travaille actuellement dans le but d'augmenter la précision des estimés qui seront publiés mi-2004.

Mondialement, en fin d'année 2003, 40 millions de personnes sont atteintes du VIH et 3.2 millions de ces cas concernent des enfants (tableau I) (55). En une seule année, 5 millions de cas de primo-infection ont été répertoriés globalement et environ 45000 de ces nouvelles infections touchent l'Amérique du Nord. À la fin de l'an 2003, le nombre de personnes décédées des suites du SIDA a été estimé à 3 millions de personnes. Malgré les connaissances cliniques, biologiques et moléculaires actuelles sur ce virus, nous ne possédons toujours pas le remède miracle menant à son éradication. (10,12,55)

Depuis l'utilisation de stratégies de thérapies antirétrovirales combinées, une diminution du taux de morbidité et mortalité a été observée chez les personnes atteintes du HIV-1 ces dernières années (10,12,13). Cependant, ces thérapies ne sont pas accessibles à tous et ne parviennent pas à éradiquer le virus (10,13). Dans plusieurs cas, l'effet d'une thérapie permet d'obtenir une réduction du taux d'ARN viral dans le plasma. Chez certains patients, il est possible de réduire le nombre sous le seuil de détection (50 copies/ml). Cependant, malgré les effets suppresseurs de ces thérapies combinées, celles-ci ne parviennent pas à éliminer la présence du virus de l'organisme, le principal obstacle: les réservoirs du VIH-1 (10,13,46). Effectivement, le VIH utilise des cellules, en particulier les lymphocytes T CD4⁺ mémoires latentes afin de s'y cacher et d'induire sa persistance. Ces cellules sont inactives, silencieuses face au système immunitaire car elles n'expriment aucune protéine virale à leur surface et ont une demi-vie très longue, ce qui assure la persistance du virus. D'autres types de cellules peuvent également servir de réservoir au VIH et contribuer à une réplication virale à bas

bruit en dépit d'une thérapie antirétrovirale efficace. Parmi celles-ci se retrouvent les cellules dendritiques. Le VIH les utiliserait d'une part pour permettre sa dissémination dans l'organisme et son transfert à ses cellules cibles et d'autre part, comme réservoirs latents afin de maintenir sa persistance (46). Puisqu'il n'existe actuellement aucun moyen efficace pour prévenir l'infection et que les thérapies antirétrovirales actuelles ne parviennent pas à éradiquer le virus, il s'avère important de développer des stratégies thérapeutiques qui limiteraient la propagation du virus et empêcheraient la réplétion de réservoirs viraux (12,46).

Étant donné que les cellules dendritiques sont parmi les premières cellules ciblées par le VIH et en partie responsables de la propagation et de la persistance du virus, nous considérons qu'elles représentent une cible intéressante pour limiter l'infection (41,53,54). Plusieurs des agents antirétroviraux utilisés jusqu'à présent, comme les inhibiteurs de la transcriptase inverse et les inhibiteurs de protéase, pénètrent mal les cellules dendritiques. L'arrivée d'une nouvelle classe d'antirétroviraux qui inhibent l'entrée du virus dans la cellule pourrait permettre d'avoir plus d'impact sur l'infection des cellules dendritiques et également de mieux comprendre l'entrée du virus au niveau des cellules dendritiques (37).

Plusieurs inhibiteurs, dernièrement développés, ciblent chaque étape du processus d'attachement et de fusion du virus à la cellule (10,11,13,39,41). Nous avons donc émis l'hypothèse que bloquer simultanément toutes les voies de pénétration du VIH-1 dans la cellule dendritique aurait des conséquences notables sur la dissémination virale et la propagation du virus ainsi que la régénération de

réservoirs viraux. L'objectif principal de notre étude consiste à caractériser l'interaction d'agents inhibiteurs du VIH-1, utilisés en agents uniques ou en combinaisons, sur l'infection en *cis* et en *trans* des cellules dendritiques dans un modèle in vitro. Le présent mémoire est structuré de façon à vous présenter d'abord une revue de littérature complète de la théorie ayant servie à formuler notre hypothèse, suivie par l'article précisant la méthodologie utilisée et les résultats obtenus au cours de cette étude.

1.2 Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

1.2.1 Généralités

Figure 1: Virion du VIH-1 (28)

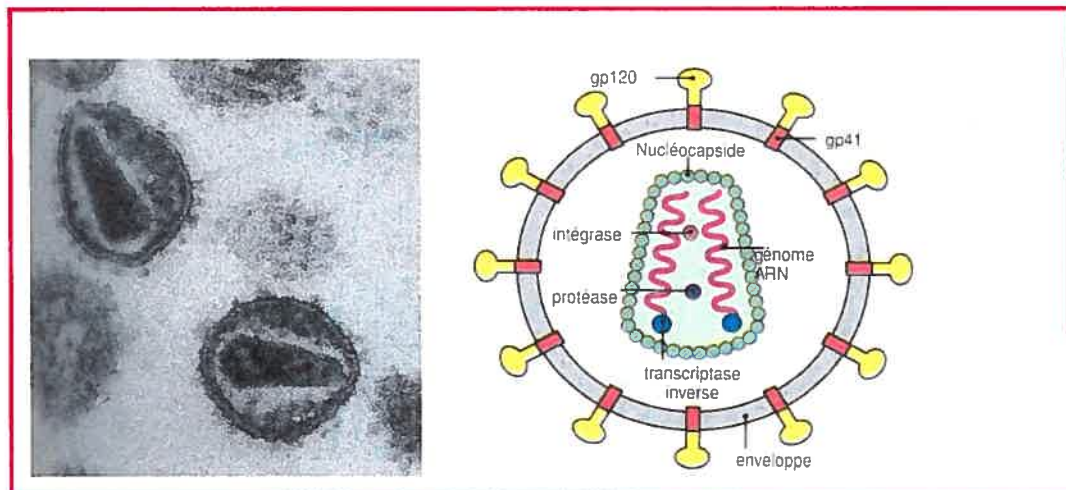


Figure 1: Virion du VIH-1. Le dessin représente le virus de l'immunodéficience humaine de type 1. La transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase qui sont les enzymes du virus, sont enfermées dans le virion et sont schématisées dans la capsid virale. En réalité le virion contient plusieurs exemplaires de ces enzymes. Le VIH est un virus enveloppé, et gp120 et gp41 sont 2 sous unité de sa protéine d'enveloppe. Certaines protéines de structure du virus ne sont pas représentées.

Le VIH est un virus qui a été découvert en 1983 par Montagnier et Gallo, à partir de patients présentant des lymphadénopathies. Puisqu'il possède une transcriptase inverse, il a été associé à la famille des rétroviridae. C'est seulement en 1986 qu'il a reçu le nom de virus de l'immunodéficience humaine et qu'il a été classifié dans la sous-famille des lentiviridae. C'est un virus enveloppé comportant un génome à ARN simple brin, de polarité +, d'environ 9.8kb et qui est encapsidé. Le génome code pour des protéines structurales (gag, pol, env), auxiliaires (tat, rev) et accessoires (nef, vif, vpr, vpu), dont tat, nef et rev sont des protéines précoces. (Figure 1) (28,33)

La transmission des particules virales s'effectue majoritairement lors des relations sexuelles (liquide génitaux), mais elles peuvent également être transmises via le sang et/ou de la mère à l'enfant (grossesse, accouchement, allaitement). Le virus est véhiculé par des cellules lymphocytaires T CD4⁺ infectées ou est à l'état libre dans les liquides organiques (sang, sperme, fluide vaginal et le lait). Deux types de VIH sont actuellement connus, le VIH-1 et VIH-2, dont 40% de leur génome est commun. Le VIH-1 est la souche la plus répandue dans le monde, et par conséquent, responsable de la majorité des cas de SIDA. Le VIH-1 est la principale souche de l'Amérique du Nord, contrairement au VIH-2 qui est endémique en Afrique de l'Ouest. (15,28,55)

Cliniquement, ce virus cause le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). La maladie s'étend sur une longue période de temps et est divisée en trois stades. L'infection aiguë provoque un état grippal ressemblant à la mononucléose et est

caractérisée par une grande quantité de virus dans le sang, une chute du nombre de cellules T CD4⁺ et une augmentation des T CD8⁺. Ce stade est suivi par la séroconversion, causant une réduction de la virémie et une augmentation des cellules T CD4⁺, menant à la phase de pseudo latence. Cette seconde phase est asymptomatique. Elle peut durer de 3 à 15 ans et plus. Pendant ces années, il y a un déclin progressif de la fonction et du nombre de cellules T CD4⁺. La phase de latence clinique se termine lorsque le patient ne possède pratiquement plus de cellules T CD4⁺, moins de 200 cellules/ml. Le patient entre alors dans le stade terminal de la maladie, la phase SIDA, où apparaissent les infections opportunistes (pneumonies, cancers, etc.) menant à la mort du patient en l'absence de traitement. (28,33)

1.2.2 Cycle d'infection du VIH-1

Pour établir son infection et produire des particules virales, le virus doit absolument pénétrer et s'intégrer dans le génome de cellules permissives. Les lymphocytes T CD4⁺ sont les cellules cibles du VIH car elles expriment à leur surface les récepteurs requis pour l'attachement et l'entrée du virus. (15,28,33)

Figure 2 : Attachement et pénétration du VIH-1 (1)

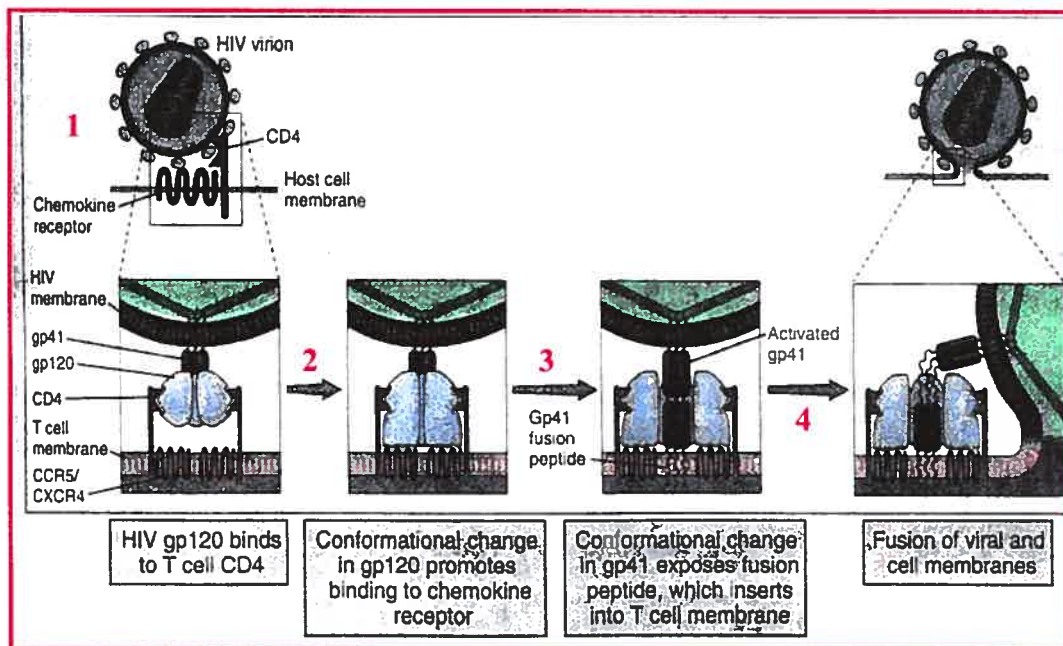


Figure 2: Attachement et pénétration du VIH-1. 1⇔ Le virus s'attache à la membrane cellulaire de sa cellule cible par la liaison de la sous-unité gp120 de sa protéine d'enveloppe au récepteur CD4 en surface de la membrane cellulaire de la cellule T. 2⇔ Cette liaison provoque un changement de conformation dans gp120 qui promouvoit sa liaison au corécepteur de chémokines CCR5 ou CXCR4. 3⇔ Cette seconde liaison change la conformation de gp41 qui expose le peptide de fusion, lequel s'insère dans la membrane de la cellule T. 4⇔ La membrane virale et cellulaire se fusionne permettant au virus de pénétrer dans le cytoplasme de la cellule.

La liaison de la protéine virale env gp120 au récepteur CD4 en surface des lymphocytes T assure l'attachement du virus à la cellule (42) (figure 2). Cette liaison induit un changement conformationnel au niveau de gp120 créant un site de liaison de haute affinité avec les récepteurs de chémokines (CCR5 et/ou CXCR4) (42). Le récepteur de chémokine utilisé par le VIH détermine son tropisme (33). Il y a donc les souches R5, X4 et à double tropisme (15,28). Cette seconde liaison est cruciale car elle provoque un changement conformationnel au niveau de gp41 qui expose le peptide de fusion. Le peptide peut alors pénétrer la

membrane cellulaire et catalyser la fusion des deux membranes, menant à l'entrée du génome viral dans le cytoplasme (42) (figure 2). S'en suit une cascade d'événements menant à la transcription de l'ARN génomique viral en ADN génomique par la transcriptase inverse (RT) et l'intégration de l'ADN génomique viral dans l'ADN cellulaire par l'intégrase (IN). L'ADN est par la suite transcrit en ARN viral. Le génome et les protéines virales sont ensuite associés à la membrane plasmique et les virions sortent de la cellule par bourgeonnement (15,28,33).

1.3 Les cellules dendritiques

1.3.1 Généralités

Les cellules dendritiques ont été découvertes par l'équipe de Ralph Steinman dans les années 70s (53). Elles représentent une population hétérogène et se distinguent les unes des autres par l'origine de leurs précurseurs, soit lymphoïde ou myéloïde (51,53). Ce faisant, elles présentent des différences autant au niveau de leur phénotype, leur localisation que de leurs fonctions. Les cellules dendritiques originaires de la moelle osseuse représentent 1 à 2% de la population cellulaire totale (25). De façon générale elles résident dans les tissus périphériques qui sont en contact avec l'environnement, soit la peau et les muqueuses (3,26,27,51). Les cellules de Langerhans (LC) sont les cellules dendritiques qui colonisent l'épiderme et les cellules dermiques, les muqueuses pluristratifiées tel le vagin, le col de l'utérus, le rectum et la lamina propria (26,61). Il n'y a pas de marqueurs

cellulaires qui sont spécifiques à la cellule dendritique, cependant on distingue les Langerhans par l'expression de E-cadherin, de Langerin (CD207) et par la présence de granules de Birbeck (29,60).

1.3.2 Fonctions

Pendant plusieurs années, les immunologistes ont cru que les réponses immunitaires étaient induites lors de la rencontre entre un antigène et un lymphocyte. Cependant, comme cette rencontre ne menait pas toujours à l'immunité, les chercheurs de l'époque ont soupçonné qu'une cellule accessoire devait être impliquée, à titre d'initiateur et modulateur de la réponse immunitaire. Bien que les cellules de Langerhans aient été identifiées dans la peau en 1868, c'est seulement lors de la caractérisation des cellules dendritiques en 1975 que cette fonction leur fût attribuée, à partir de quoi elles se sont fait assigner le titre de cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). (3)

Figure 3 : Fonctions immunologiques des cellules dendritiques (18)

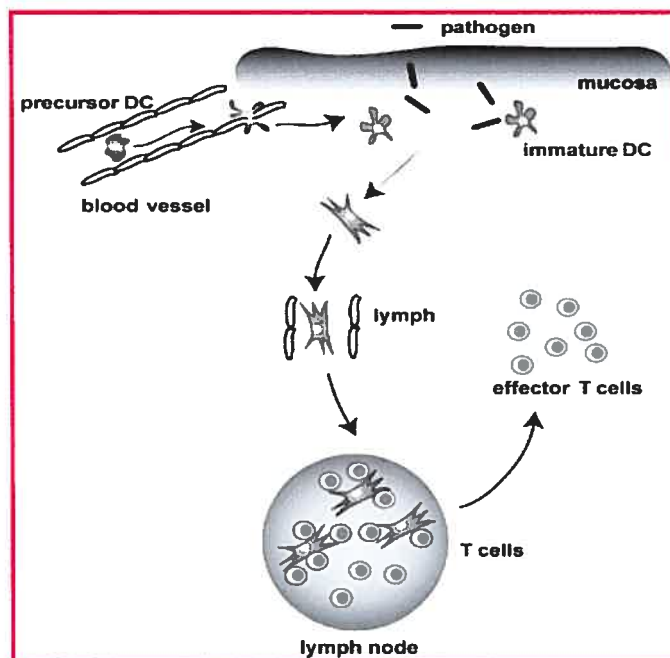


Figure 3: Fonctions immunologiques des cellules dendritiques dans le système immunitaire. Les précurseurs des DCs migrent du sang aux organes périphériques afin de surveiller les tissus contre l'invasion de pathogènes. Suivant leur entrée, les pathogènes sont captés par la DC résultant en sa maturation et sa migration vers les ganglions lymphatiques via la lymphe. Ainsi, la DC mature présente les antigènes dérivés des pathogènes aux cellules T naïves, et les cellules T spécifiques à l'antigène sont activées via leurs TCRs. Ces cellules T prolifèrent et migrent jusqu'aux tissus infectés afin d'effectuer leurs fonctions effectrices.

En absence d'agression, les cellules dendritiques agissent comme sentinelles au niveau du sang, de la lymphe, des tissus périphériques et des organes lymphoïdes secondaires, à la recherche d'antigènes (25,26,60). Suite au contact avec l'antigène, une cascade de signaux intracellulaires enclenche l'activation de la cellule dendritique. La cellule dendritique débute alors sa maturation et sa migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Rendue dans les régions riches en cellules T, la cellule dendritique expose un antigène dégradé en peptides

antigéniques via son CMH et interagit avec le TCR de la cellule T spécifique à l'antigène, enclenchant ainsi une réponse immunitaire (3). (Figure 3)

Les cellules dendritiques sont les meilleures cellules présentatrices d'antigènes (3,25). Par leur capacité à capter l'antigène, à le dégrader en peptides antigéniques et à migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques sont l'une des rares CPAs capables d'activer les cellules T naïves. De plus, le potentiel stimulateur des cellules dendritiques est énorme comparativement aux autres CPAs. L'expression des molécules de CMH est 10 à 100 fois supérieure sur les cellules dendritiques, expliquant la faible quantité de cellule dendritique (1DC pour 100 à 3000 cellules T) et d'antigène (pico/nanomolaire) requis pour induire une réponse efficace en cellules T (3). Finalement, l'augmentation de l'adhésion entre les deux types cellulaires grâce à l'expression de molécules accessoires (CD58, CD54, CD86, etc.) en surface des cellules dendritiques, leur permet d'interagir plus étroitement avec les cellules T et ainsi obtenir une meilleure signalisation (3,25,51,53).

1.3.3 Immatures versus matures

Les cellules dendritiques assument ces différentes tâches dépendamment de leur état de différenciation, leur phénotype (61). Dans la majorité des tissus, elles sont présentes sous un phénotype immature. Elles expriment à leur surface un HLA-DR^{intermédiaire}, CD83⁻, CD86^{faible}, CD80^{très faible}, CD40^{très faible}, CCR5⁺, CXCR4^{faible/-} et une forte concentration de compartiments intracellulaires riches en CMH de

classe II (MIICs) (3,8,29). Les cellules dendritiques immatures se spécialisent dans la capture et l'internalisation de l'antigène (53,61). Elles peuvent agir par phagocytose, macropinocytose et par endocytose (grâce à leurs récepteurs lectin de type-C) (3,36,65). Une fois l'antigène capté, celui-ci entre dans la voie endocytose de la cellule. Il est ensuite dirigé vers les MIICs, structures endosomales tardives contenant les produits HLA-DM/H-2M qui augmente la liaison du peptide au CMH, pour former les complexes peptide-CMH (3).

Le signal de maturation enclenché, la cellule dendritique perd aussitôt sa capacité à capturer l'antigène et se met à assembler des complexes peptide antigénique-CMH (3,53). Pendant son processus de maturation, la cellule dendritique migre du site inflammatoire vers les tissus lymphoïdes (foie, ganglions lymphatiques), les MIICs se convertissent en vésicules non-lysosomales et déchargent leurs complexes peptide-CMH à la surface cellulaire (3). Rendue à destination, la cellule dendritique atteint la maturation complète, c'est-à-dire; expression des molécules d'adhésion, de costimulation, des corécepteurs (HLA-DR^{élevé}, CD83⁺, CD86^{élevé}, CD80⁺, CD40^{intermédiaire}, CCR5^{faible} et CXCR4⁺) et relâchement de cytokines, ce qui lui permet d'attirer et d'interagir avec les cellules T (3,8,25,29). Le clone T CD4⁺ dont le TCR est spécifique à l'antigène exposé par la cellule dendritique, s'active, enclenchant ainsi une réponse immunitaire spécifique: activation des cellules B pour la formation d'anticorps, des macrophages pour le relâchement de cytokines et interactions avec les cellules cibles infectées pour les détruire (3).

1.3.4 Implication dans la pathogénèse de certains micro-organismes

Plusieurs pathogènes ont développé des moyens leur permettant d'utiliser les cellules dendritiques comme porte d'entrée sécuritaire pour leur infection (2,25,26). Parmi ces pathogènes s'y retrouvent *Candida albicans*, le virus de l'hépatite C (HCV), *Mycobacterium tuberculosis*, le virus de dengue et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (7,22,40,43,54,59,63).

Bien malgré elle, la cellule dendritique est fortement susceptible d'être utilisée par certains pathogènes (65). Ses caractéristiques en font une cible de choix. Tout d'abord, la cellule dendritique est localisée dans les tissus qui sont à l'interface avec l'environnement, elles sont donc l'une des premières cellules rencontrées par le micro-organisme qui pénètre dans le corps humain (64). Ensuite, étant une CPA, la cellule dendritique possède plusieurs récepteurs d'internalisation d'antigène à sa surface. À la moindre réaction inflammatoire, quelle soit la réponse à un antigène local ou à des stimuli quelconques, la cellule dendritique capte l'antigène, s'active rapidement et migre aussitôt des vaisseaux lymphatiques afférents aux sites riches en lymphocytes afin d'y induire une réponse immunitaire spécifique (36,53).

Pour les pathogènes, les cellules dendritiques représentent une menace éminente à leur survie. Plusieurs recherches démontrent que certains pathogènes auraient acquis la capacité d'utiliser les cellules dendritiques à leur fin, suite à leur capture par les lectines de type-C (CLR) à la surface des DCs (11,34,22,64). À la base, ces lectines procurent une arme clé au système immunitaire inné. En reconnaissant des

hydrates de carbone (D-mannose, L-Fucose et N-acetyl-glucosamine) qui ne sont pas exprimés sur les protéines extracellulaires des mammifères, elles sont capables, sur la base de leur surface en saccharides, de lier les pathogènes tels les bactéries Gram positives ou négatives, les levures et certains virus (2,22,61,62,64). Théoriquement, une fois lié à une CLR, le pathogène entre dans la voie endocytique de la cellule dendritique afin d'être dégradé en peptide antigénique (61). Étonnamment, divers pathogènes, par un mécanisme d'action encore inconnu, parviennent à échapper à la dégradation et ainsi déjouer le système immunitaire (64). L'intérêt de cibler les cellules dendritiques diffère selon le type de pathogène. Le virus de dengue cible une CLR à la surface des DC immatures afin d'échapper à la voie endocytique et infecter la DC (40). *Mycobacterium tuberculosis* utilise la cellule dendritique afin d'assurer sa survie et d'établir sa persistance. En modulant les fonctions de la cellule dendritique, *Mycobacterium tuberculosis* empêche sa maturation et par conséquent la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (63). Pour d'autres, majoritairement de type viral, l'utilisation des cellules dendritiques assure leur transport jusqu'à leurs cellules cibles (54,63). Par exemple, la capture du VHC par une CLR contribue à l'établissement de son infection et de sa persistance par la délivrance des virus au foie et la modulation des fonctions de la DC (45). Et finalement, la liaison du VIH-1 par une CLR en surface des cellules dendritiques représente l'initiation et la propagation de l'infection (60,63).

1.4 Les cellules dendritiques et le VIH-1

1.4.1 Infection en *cis* versus *trans*

Depuis les dernières années, plusieurs équipes de recherches travaillent sur l'implication des cellules dendritiques dans la propagation de l'infection à VIH -1. Comme la majorité des primo-infections à VIH se transmettent via les muqueuses, les cellules dendritiques sont fortement soupçonnées d'être parmi les premières cellules ciblées par celui-ci. Actuellement, deux modes d'infection sont connus; en *cis* et en *trans* (19,21) (Figure 4).

Figure 4 : Infection en *cis* et en *trans* des cellules dendritiques par le VIH-1 (52)

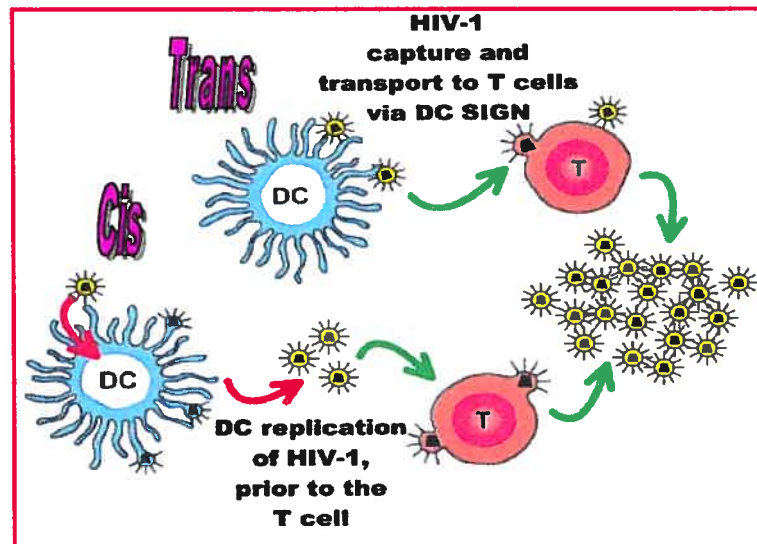


Figure 4: Infection en *cis* et en *trans* des cellules dendritiques par le VIH-1. L'infection en *trans*, c'est la voie dépendante de DC-SIGN qui ne distingue pas les souches virales à tropisme R5 des X4. Par exemple, les DCs présentes dans les muqueuses peuvent capter des virions via DC-SIGN, les transporter jusqu'aux ganglions lymphatiques et les transmettre aux cellules T CD4⁺. L'infection en *cis*, c'est la production virale par la DC, suite à l'entrée du virus via le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5/CXCR4.

L'infection en *cis* est l'infection de la cellule dendritique par le VIH-1. Pareillement à l'entrée du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺, elle survient suite à la liaison de la protéine virale gp120 avec le récepteur cellulaire CD4 et les corécepteurs CCR5 présents sur la cellule dendritique (24,47). Cette liaison induit des changements de conformation permettant alors une fusion des membranes et l'entrée du virus dans la cellule (4). Les cellules dendritiques immatures sont infectées par des souches de VIH-1 de type R5 (29,61). Ceci s'explique probablement par le fait qu'elles n'expriment pas ou très faiblement, le récepteur de chémokines CXCR4 (6,23,66). La notion de réplication virale du VIH-1 dans les cellules dendritiques est un point très controversé. Bien que certains chercheurs dont Pope, Granelli-Piperno, Blauvelt, Reece et Rubbert aient démontré une infection productive des cellules dendritiques, il ne faut pas oublier que l'infection des cellules dendritiques demeure relativement faible comparativement aux cellules T CD4⁺ activées (6,8,23,24,26,61).

L'infection en *trans* est définie comme étant la transmission du VIH-1 aux lymphocytes T CD4⁺ par les cellules dendritiques, suite à l'attachement du virus aux cellules dendritiques et à son transport jusqu'aux ganglions lymphatiques (19,50,60). La notion d'un 2^e «pathway», c'est à dire un mécanisme de liaison de la gp120 indépendant à CD4 est apparu dans les années 90s suite aux travaux des équipes de Schmitt et Dezulter-Dambuyant réalisées sur les cellules de Langerhans (9,61). En 1997, Blauvelt et ses collègues ainsi que Weissman et Fauci ont révisé le concept d'un 2^e mécanisme de liaison de la gp120 sur les cellules dendritiques dérivées des monocytes (MDDCs) et ont spéculé qu'une lectine de type C, le

récepteur de mannose des macrophages (MMR), devait probablement être impliqué dans la capture et le transfert du virus aux lymphocytes T CD4⁺ (6,65,66). Leur hypothèse était appuyée par l'étude de Larkin en 1989 réalisée sur les macrophages et surtout par celle de Curtis en 1992 qui avait découvert une CLR, à partir d'une librairie d'ADNc du placenta, capable de lier la gp120 indépendamment de CD4, qu'ils avaient nommé CCL-11 pour «Curtis C-type lectin clone 11» (11,34).

Plusieurs études ont ensuite été réalisées dans le but de clarifier ce 2^e mécanisme. Bien qu'encore aujourd'hui il soit très peu connu, l'identification de DC-SIGN par l'équipe de Geijtenbeek a élucidé une partie du phénomène (20). Selon leurs travaux, DC-SIGN, précédemment nommé CCL-11, serait responsable de la liaison du VIH-1 par les cellules dendritiques et de son transfert aux lymphocytes T CD4⁺ (19). Depuis, plusieurs autres CLR s'ont été identifiées en surface des cellules dendritiques et certaines, autres que des MMRs, peuvent également lier le VIH-1 (5,18,60,62).

1.4.2 DC-SIGN

1.4.2.1 Généralités

Figure 5 : Schématisation de la molécule DC-SIGN (44)

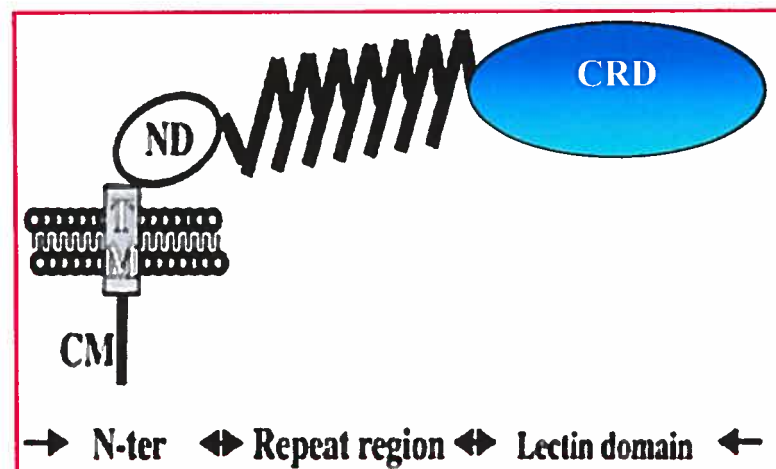


Figure 5: Schématisation de la molécule DC-SIGN. La structure des domaines telle qu'identifiée par l'analyse des séquences. La molécule DC-SIGN est organisée par domaines; le N-Terminal (N-Ter) précédé par la portion transmembranaire et cytoplasmique de la molécule, la région répétée et le domaine lectine. Le domaine lectine est la région qui reconnaît les hydrates de carbone (CRD).

DC-SIGN a été découvert sur les cellules dendritiques dérivées des monocytes (MDDCs) par l'équipe de Geijtenbeek en l'an 2000 (20). Celui-ci avait observé l'expression d'une grande quantité d'ICAM-3 en surface des cellules T. Considérant l'interaction entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques, l'équipe de Geijtenbeek a vérifié si ICAM-3 était impliqué dans la liaison des deux cellules. Par des essais d'adhésion à des billes recouvertes d'ICAM-3 fluorescent, ils ont observé par cytométrie en flux que les cellules dendritiques liaient

fortement cette molécule. Ensuite, ils ont observé que la liaison était inhibée par la présence d'EDTA ainsi que des anticorps dirigés contre ICAM-3 et non par des anticorps dirigés contre les $\beta 2$ -intégrines, les sous unités β ou toutes autres intégrines (20,50). Ils ont ainsi conclu que la liaison entre les cellules dendritiques et les cellules T était spécifique à ICAM-3 et qu'elle reposait sur un mécanisme indépendant des intégrines requérant la présence du Ca^{2+} . Bien qu'elle ait autrefois été baptisée CCL-11 par Curtis et ses collègues, avec la découverte de ses propriétés d'adhésion et de son expression sur les cellules dendritiques, elle a été renommé DC-SIGN pour «dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin» (11,20).

DC-SIGN est une protéine transmembranaire de type II de 404 acides aminés comportant trois domaines distincts (22). Un domaine cytoplasmique N-Terminal de 40 acides aminés, une région répétée de 7 motifs complets de 23 acides aminés et un motif incomplet ainsi qu'un domaine externe lectin de type C reconnaissant les hydrates de carbone (CRD), principalement le mannose (4,19,20,43,52) (figure 5). DC-SIGN est fortement exprimé sur les cellules dendritiques immatures des muqueuses, diminuant en nombre lors de leur maturation et absent sur les cellules de Langerhans (19,27,49,62,64). Il possède donc la capacité de lier un micro-organisme, un antigène et de le mener dans la voie endocytique de la cellule dendritique (22,64). DC-SIGN possède, dans sa queue cytoplasmique, 2 motifs d'internalisation (dileucine) qui lui permettent d'être constitutivement internalisé dans des endosomes précoces et recyclé ensuite à la membrane (14,18,60). Durant le recyclage, le ligand (antigène) est relâché dans l'enveloppe acide de l'endosome

pour sa dégradation et son interaction éventuelle avec les CMH de classe II (14,18).

1.4.2.2 Fonctions immunologiques

Figure 6 : Interaction entre DC-SIGN et ICAM-2/3 (22)

A : Migration (ICAM-2)

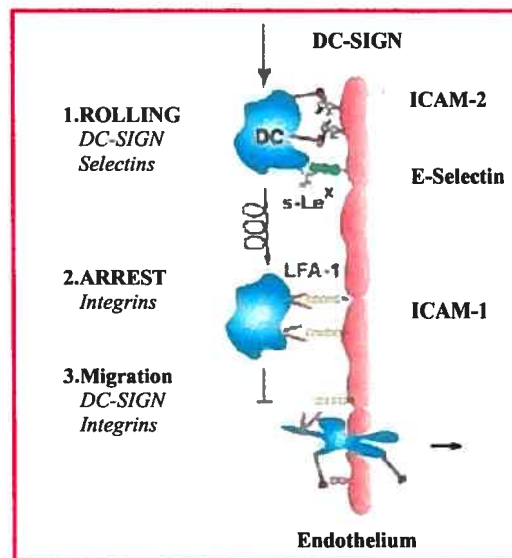
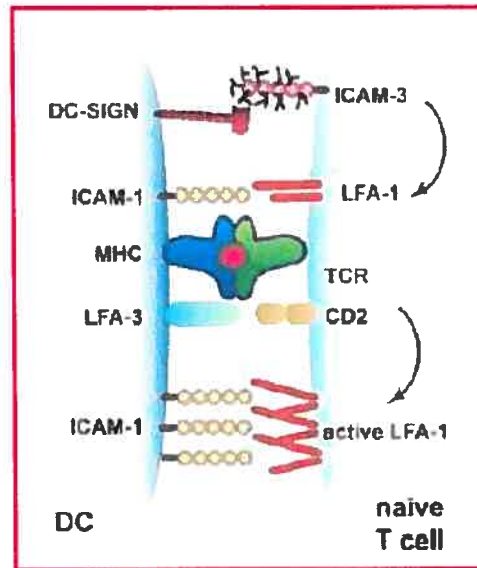


Figure 6A: Migration (ICAM-2). DC-SIGN contrôle plusieurs fonctions des DCs afin d'élaborer une réponse immunitaire. Le transport des précurseurs des cellules dendritiques du sang aux tissus est partiellement induit par DC-SIGN. DC-SIGN facilite à la fois le roulement des cellules DC-SIGN⁺ le long des surfaces exprimant ICAM-2, l'adhésion des DCs à l'endothélium et la migration trans-endothéliale, où l'arrêt est conclu par l'interaction d'intégrines.

Figure 6B: Interaction cellule dendritique et cellule T (ICAM-3). L'interaction initiale entre la DC et la cellule T est maintenue par des interactions transitoires entre DC-SIGN et ICAM-3. Cette interaction facilite la formation de l'interaction de faible avidité LFA-1/ICAM-1 et le balayage du répertoire de peptides antigéniques présentés par le CMH.

B : Interaction cellule dendritique et cellule T (ICAM-3)



DC-SIGN contribue également aux fonctions immunitaires de la cellule dendritique au niveau de sa migration et de son interaction avec les cellules T via ICAM-2/3 (14,22). L'expression constitutive d'ICAM-2 sur l'endothélium des vaisseaux sanguins et lymphatiques, permet d'une part le roulement des cellules dendritiques le long des vaisseaux et d'autre part, sa migration transendothéliale du sang vers les tissus périphériques et de la lymphe vers les tissus lymphoïdes (figure 6A) (18,22). Lors d'une inflammation, l'interaction de DC-SIGN avec ICAM-2 permet à la cellule de se rendre au site d'inflammation, et une fois l'antigène capté, de migrer aux ganglions lymphatiques pour présenter le peptide antigénique au TCR de la cellule T. ICAM-3, exprimé sur les cellules T permet cette interaction (18,22). Des molécules d'adhésion et de costimulation sont requises pour permettre une jonction stable et efficace entre les deux cellules

(25). La liaison entre DC-SIGN et ICAM-3 serait responsable du contact initial entre les deux cellules (52). Elle permettrait une interaction transitoire (de faible affinité) entre la cellule dendritique et de nombreuses cellules T jusqu'à ce qu'il y ait engagement du TCR. Une fois le TCR engagé, il y a augmentation de l'avidité dans l'interaction des molécules d'adhésion et de costimulation permettant un contact beaucoup plus stable, étanche (14,18,19). (Figure 6B)

1.4.3 DC-SIGN et VIH-1

Figure 7 : Infection en *trans* et en *cis* via DC-SIGN (18)

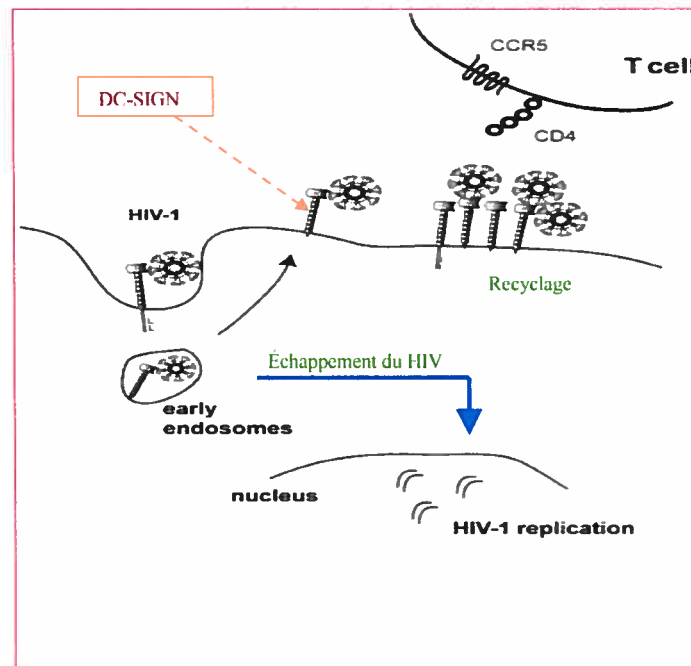


Figure 7: Infection en *trans* et en *cis* via DC-SIGN. Le VIH-1 interfère avec la voie d'internalisation de DC-SIGN, résultant en une augmentation de l'infection en *trans* des cellules T. DC-SIGN peut également agir comme récepteur antigénique, cependant, le VIH-1 peut échapper à l'internalisation tardive et à la dégradation par les endosomes tardifs, et poursuivre son cycle de réplication dans la DC.

DC-SIGN est un facteur d'attachement universel pour les lentivirus de type primate car il lie autant le VIH-1, le VIH-2 et le SIV de type R5, X4 ou à double tropisme (19,43,64). Le mécanisme par lequel le VIH-1 déjoue le rôle fonctionnel de DC-SIGN demeure encore inconnu (22,64). Actuellement, certaines hypothèses sont émises sur l'implication de DC-SIGN dans l'infection en *trans* des cellules T CD4⁺ par le VIH-1. Dans un premier temps, il se pourrait, qu'une fois lié au VIH-1, DC-SIGN soit rapidement internalisé sous la membrane plasmique de la cellule dendritique (16). Le complexe demeurerait internalisé tout au long de la migration des cellules dendritiques et se recyclerait à la surface rendu aux ganglions lymphatiques (figure 7) (18). Tout au long de la migration, DC-SIGN semble protéger le virus contre la dégradation, l'inactivation et les anticorps neutralisants (4,19,52,64). Comment? La première hypothèse suppose que la liaison de DC-SIGN à l'enveloppe gp120 altère la conformation générale de l'enveloppe affectant ainsi la réaction des anticorps (4). La deuxième estime que DC-SIGN prévient la liaison des anticorps neutralisants par encombrement stérique ou en réduisant l'accessibilité à la gp120 en rapprochant le virus de la surface cellulaire (4). Somme toute, comme l'a démontré l'équipe de Geijtenbeek par micrographies de sections de tissus, le virus attaché au DC-SIGN demeure sous une forme infectieuse et transférable aux lymphocytes T CD4⁺ pendant plusieurs jours (4,18). Le mécanisme de transfert du virus aux lymphocytes T CD4⁺ est également incertain (21,44,67). Certains supposent que les DC-SIGN sont recyclés au même endroit, ce qui concentre les particules virales les rendant plus accessibles pour

interagir avec les CD4 et les corécepteurs des cellules T lors des jonctions/synapses immunologiques (figure 7) (18,38).

Figure 8 : Infection en *cis* via DC-SIGN (4)

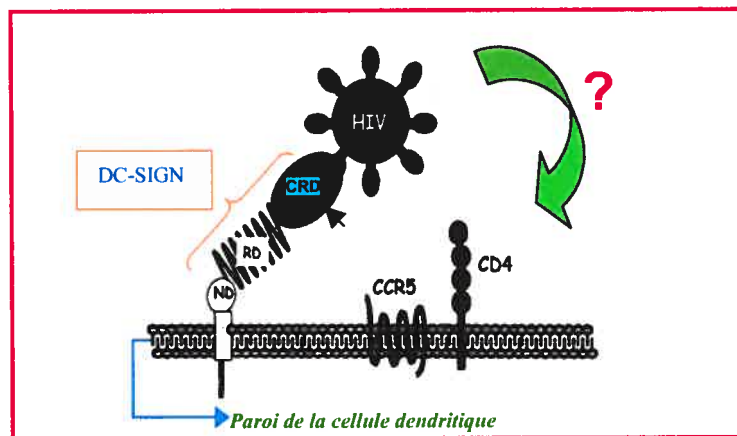


Figure 8: Infection en *cis* via DC-SIGN. Représentation schématique de l'interaction entre le VIH-1 et DC-SIGN. La liaison du VIH-1 au DC-SIGN mène à l'infection en *trans* des cellules T CD4⁺, corécepteur⁺, cependant, une infection en *cis* est également soupçonnée. La liaison du virus au DC-SIGN pourrait accroître l'entrée du virus dans la cellule dendritique. ND, domaine N-terminal; RD, domaine répété; CDR, domaine reconnaissant les hydrates de carbone.

Il y a également une infection en *cis* qui est supposée à partir de la liaison du VIH-1 au DC-SIGN (18,35). Par exemple, si le virus se libère du DC-SIGN et s'échappe de l'endosome, il devient libre dans le cytoplasme de la cellule dendritique et peut par la suite mener à une production virale (figure 7). D'un autre côté, Geijtenbeek et ses collègues croient que la liaison de gp120 à DC-SIGN pourrait induire un changement conformationnel dans gp120 qui la rendrait plus efficace pour interagir avec CD4 et les corécepteurs en surface des cellules dendritiques et ainsi promouvoir son infection en *cis* (figure 8) (18). D'ailleurs, ils

considèrent également que la probabilité d'infection en *cis* des cellules dendritiques est augmentée par l'exposition concentrée des particules virales à sa surface suite à leur liaison à DC-SIGN (22).

1.5 Inhibiteurs de l'infection à VIH

Figure 9 : Schéma des sites d'action des agents antirétroviraux actuels (13,39)

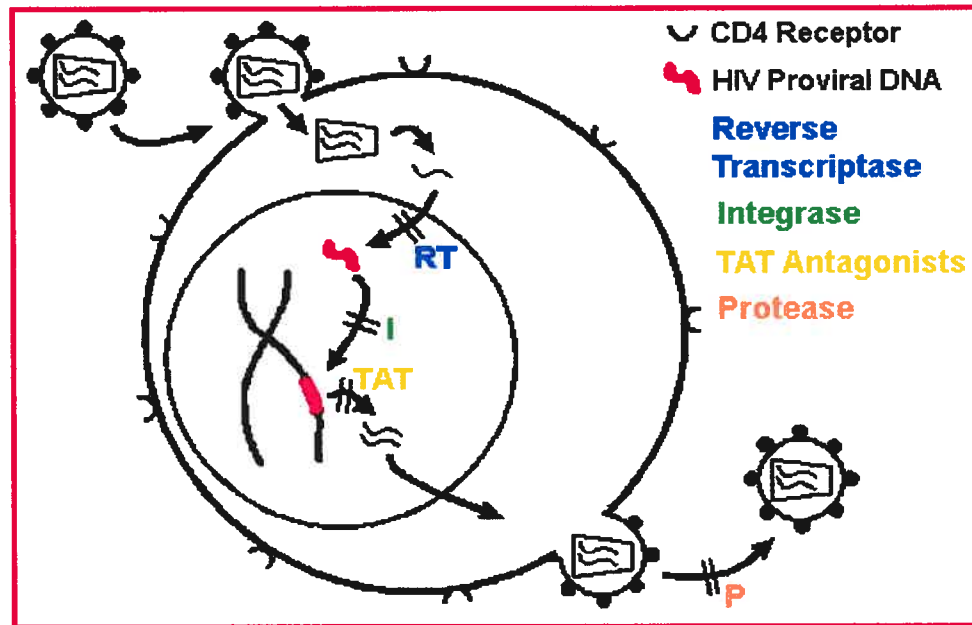


Figure 9: Schéma des sites d'action des agents antirétroviraux actuels. La majorité des agents antirétroviraux licenciés au Canada ciblent des enzymes du cycle de réplication du VIH-1, soit la reverse transcriptase et la protéase.

1.5.1 Généralités

Plusieurs progrès ont été réalisés dans le développement de thérapies antirétrovirales (ART) (10,13). Jusqu'à présent, plus d'une quinzaine de drogues antirétrovirales sont licenciées et utilisées chez les patients atteints du VIH (12). Depuis, la qualité et la durée de vie des personnes atteintes ont fortement augmenté dans les régions où les drogues sont disponibles et abordables. Toutefois, l'utilisation de la ART thérapie n'est pas sans conséquences. L'inaccessibilité de ces drogues aux habitants des pays sous-développés, les problèmes de tolérance et d'effets toxiques à long terme sur les individus, la présence de réservoirs viraux latents et l'apparition de résistance à ces drogues justifient le besoin d'élaborer de nouveaux inhibiteurs (10,12,13,32). Par exemple, des stratégies préventives tel l'inoculation de vaccins ou l'application de crèmes topiques microbicides lors des relations sexuelles pourraient contrecarrer les problèmes de toxicité et d'accessibilité aux drogues et par le fait même, réduire l'étendue de l'infection à VIH (39). Comme le démontre la figure 9, la majorité des drogues existantes cibles directement le virus, c'est-à-dire, l'une des étapes de son cycle de réplication; soit la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) et la protéase (P), dans le but de bloquer la production virale et l'infection de nouvelles cellules (12,32,42). Conséquemment, certaines souches de VIH sont maintenant résistantes à plusieurs de ces agents antirétroviraux. Afin de surmonter cet obstacle, au cours des dernières années est apparue une nouvelle approche thérapeutique interférant avec l'entrée du VIH dans les cellules. Cette approche offre l'avantage de cibler différents intermédiaires impliqués dans le processus

d'attachement et d'entrée du virus, comprenant à la fois les récepteurs cellulaires et leur ligand viral (10,13,39,41,42). L'intérêt d'élaborer les recherches sur cette nouvelle classe d'agents antirétroviraux est de parvenir à les combiner aux agents existants afin de compléter l'action dirigée contre la réplication virale. (12)

1.5.2 Nouvelle classe d'agent antirétroviraux

1.5.2.1 Généralités

Tel que mentionné dans le paragraphe 1.2.2, plusieurs étapes sont nécessaires à l'entrée du virus dans une cellule permissive. Brièvement, le virus s'attache à la cellule par l'interaction entre sa protéine d'enveloppe gp120 et le récepteur cellulaire CD4 (10,13,39). La gp120 lie ensuite un corécepteur de chémokine en surface de la cellule, soit CCR5 et/ou CXCR4. Cette dernière liaison provoque un changement conformationnel dans gp41 qui expose le peptide de fusion, lui permettant de pénétrer la membrane cellulaire (10,13,39). Par la suite, le premier domaine hélicoïdale de gp41 se repliera sur le second, en forme d'épingle à cheveux, ce qui mènera à la fusion des deux membranes et à l'entrée du virus dans le cytoplasme cellulaire (12,32,42). La nouvelle classe d'agents antirétroviraux cible donc l'une ou l'autre de ces étapes. Les agents, énumérés dans le tableau II, sont divisés en 2 groupes; les inhibiteurs d'attachement qui interagissent soit avec le récepteur cellulaire CD4, les corécepteurs CCR5 et/ou CXCR4 ou le ligand viral gp120, et les inhibiteurs de fusion qui bloquent la fusion des deux membranes (10,13,39,41).

Tableau II : Liste des agents antirétroviraux ciblant l'entrée du VIH (12,32,42)

Inhibiteurs	Caractéristiques	Phase d'étude	Route d'administration	Commentaires
<i>Agents ciblant l'interaction CD4-gp120</i>				
CD4s-IgG (PRO 542)	Récepteur cellulaire soluble	Clinique	Injectable	½ plus longue que ces prédécesseurs
PRO 2000	Polymère naphthalène sulfonate	Clinique	Topique	Microbiocide: liaison non-spécifique au CD4
Cyanovirin-N	Petite protéine issue des cyanobactéries	Pré clinique	Topique	Microbiocide: lie spécifiquement la gp120; propriétés inflammatoires et immunologiques inconnues
BMS-806	Petite Molécule	Clinique	Oral	---
<i>Agents ciblant le CCR5</i>				
AOP-RANTES NNY-RANTES 9-68 RANTES 3-68 RANTES Met-RANTES	Molécules dérivées de la chémokine CCR5	Pré-clinique	Injectables et Topiques	Faible biodisponibilité Faible signal inducteur Pas spécifique à CCR5
Schering C	Petite molécule non-peptidique	Pré-clinique	Oral	Grande biodisponibilité Spécifique à CCR5
Schering D	Petite molécule non-peptidique	Pré-clinique	Oral	Grande biodisponibilité Spécifique à CCR5
TAK-779 TAK-220	Petite molécule non-peptidique	Pré-clinique	Injectable	Spécifique pour CCR5
UK427-857	Petite molécule non-peptidique	Clinique	Oral	Spécifique pour CCR5
<i>Agents ciblant le CXCR4</i>				
SDF-1 variant	Molécule dérivée de la chémokine CXCR4	Pré-clinique	Injectable	Faible biodisponibilité Faible signal inducteur
T-22	Peptide de 18 acides aminés	Pré-clinique	Injectable	Faibles cinétiques pharmacologiques prédites Faible biodisponibilité Forte charge positive net Actif contre les virus résistants à AMD-3100
T-134, T-140	Peptide de 14 acides aminés	---	Injectable	---
ALX40-4C	Peptide de 9 acides aminés de type D	Pré-clinique	Injectable	Cinétiques pharmacologiques approuvées Faible biodisponibilité Forte charge positive net Actif contre les virus résistants à AMD-3100
AMD-3100	Petite molécule bicyclam	Phase II	Injectable	Faible biodisponibilité Forte charge positive net Interactions non-spécifiques possibles
<i>Agents ciblant CCR5 et CXCR4</i>				
NSC 651016	Petite molécule	Pré clinique	Injectable	Cible une large variété de récepteurs de chémokines
<i>Agents ciblant la gp41 virale</i>				
T-20	Peptide de 36 acides aminés	Clinique, phase III terminée	Injectable	Faible biodisponibilité Développement de virus résistants
IQN17 et inhibiteurs peptidiques de type D	Dérivés peptidiques	Pré clinique	Injectable	Potentiel limité

1.5.2.2 Inhibiteurs d'attachement

Plusieurs molécules ciblent la liaison CD4-gp120. Certaines, tels les préparations solubles de CD4 préviennent l'attachement du virus au récepteur CD4 en se liant à la gp120 (10,13,39,41). Elles ont toutefois peu d'efficacité clinique. D'autres ont la forme d'anticorps monoclonal tétramérique qui lie gp120 et ont démontré une certaine activité antivirale au cours d'essais cliniques de Phase II. Elles sont toutefois injectables donc peu pratiques à utiliser. Une nouvelle petite molécule biodisponible oralement qui inhiberait l'interaction CD4-gp120 par compétition allostérique au niveau du CD4 en est cours d'évaluation présentement (12).

Ensuite, il y a les agents qui ciblent les corécepteurs, bloquant ainsi leurs interactions avec la gp120 (10,13,39,41). Les corécepteurs sont des protéines transmembranaires intégrales dont sept hélices traversent la membrane cellulaire (28,48). Bien qu'il existe plusieurs corécepteurs, CCR5 et CXCR4 sont principalement ciblés par le VIH-1 lors d'une infection in vivo (17,48). Leurs ligands naturels sont les chémokines, petits peptides synthétisés par plusieurs types de cellules, dont les monocytes, macrophages, cellules T, kératinocytes, neutrophiles, fibroblastes et cellules endothéliales (28). Elles sont libérées en réponse à une infection afin de recruter les cellules vers les foyers d'infection (17,28,39). Les chémokines appartiennent à deux grands groupes, les CC, qui possède deux cystéines adjacentes, et les CXC, dont les deux résidus cystéines sont séparés par un autre acide aminé (28). En 1995, Gallo et ses collègues ont découvert que les chémokines RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β (ligands de CCR5) et

SDF-1 (ligand de CXCR4) possédaient une action inhibitrice contre l'entrée du VIH-1 dans les cellules permissives (17). Naturellement, les chémokines inhibent l'infection à VIH-1 par une combinaison de deux mécanismes; occlusion directe du site de liaison au corécepteur et induction de l'internalisation du corécepteur (17,48). Depuis, plusieurs variants ont été synthétisés (39,48). Ceux-ci peuvent être des analogues des chémokines, les ligands naturels des co-récepteurs ou des antagonistes des co-récepteurs CCR5/CXCR4 (12,17,48). Parmi les analogues des chémokines, les dérivés de RANTES ont démontré le plus de puissance antivirale *in vitro* (10,12). Dû à leur profil toxicologique, leur faible biodisponibilité orale et leur cinétique pharmacologique, il est probable que ces agents soient réservés au développement d'agents topiques microbicides plutôt qu'aux agents systémiques (12). Les petites molécules antagonistes de CCR5 sont les plus prometteuses cliniquement. SCH-C, SCH-D et UK 427-857 sont biodisponibles oralement et ont toutes démontré une activité antivirale intéressante en essai clinique de Phase II (42,58). Le développement d'inhibiteur de CXCR4 risque d'être plus difficile à cause de problème de toxicité. Le premier produit à être évalué, la petite molécule AMD-3100 a été retirée à cause de problème d'efficacité et de toxicité (39,41,42).

1.5.2.3 Inhibiteurs de fusion

Figure 10 : Mécanisme d'action de l'inhibiteur de fusion T20 (32)

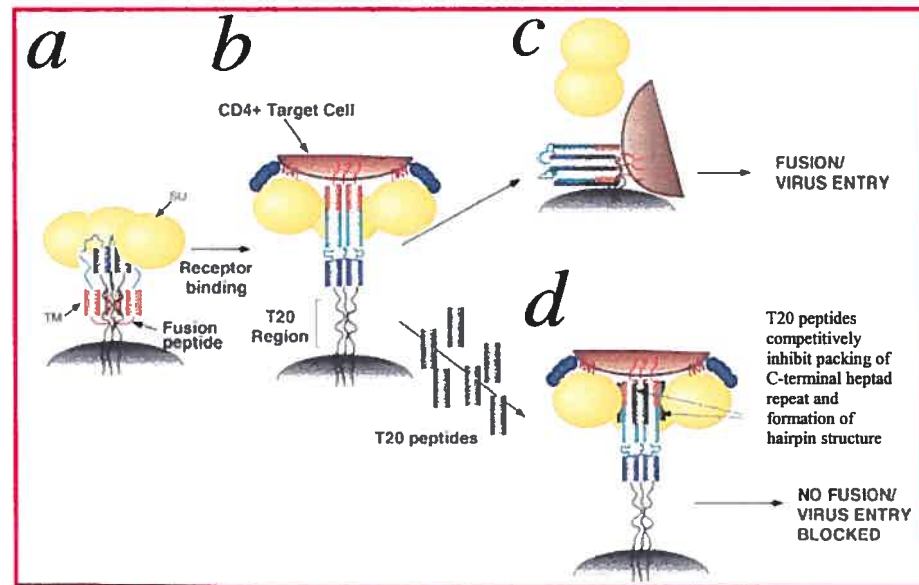


Figure 10: Mécanisme d'action de l'inhibiteur de fusion T20. A ⇒ Schéma de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1. Cette protéine est composée des sous-unités gp120 (extracellulaire) et gp41 (transmembranaire). SU, gp120; TM, gp41. Lorsque la portion gp41(TM) est sous une forme native, c'est-à-dire dans une conformation non fusogénique, le peptide de fusion est non exposé. B ⇒ Suite à la liaison de gp120 à la cellule cible CD4⁺, gp41 change de conformation permettant l'exposition du peptide de fusion. Le peptide de fusion peut ainsi s'insérer dans la membrane cellulaire de la cellule cible et former un intermédiaire en pré-épingle à cheveux. C ⇒ gp41 prend alors la structure de fusion active en épingle à cheveux, rapprochant la membrane virale et cellulaire, ce qui permet la fusion des deux membranes et l'entrée du virus dans la cellule. D ⇒ Lorsque T20 est présent, la drogue lie la structure hydrophobique fortement conservée de la portion répétée de gp41 qui induit normalement le changement conformationnel d'intermédiaire en pré-épingle à cheveux à la structure de fusion active en épingle à cheveux. Ceci prévient alors l'apposition des membranes, la fusion et l'entrée du virus.

Dans le groupe des inhibiteurs de fusion, il y a la molécule T-20 (Enfuvirtide) (10,13,39,41,42). Dernièrement approuvé par la FDA, ce peptide synthétique de 36 acides aminés a démontré un potentiel inhibiteur très efficace lors d'études cliniques de phase III (10). En interagissant avec la protéine virale gp41, T-20 empêche la fusion des membranes et par conséquent, l'insertion du matériel génétique viral dans la cellule hôte (figure 10) (12,42). Suite à la liaison de gp120 et du corécepteur, la gp41 prend une conformation fusogénique (10,13,39,41). Le

peptide de fusion est exposé et pénètre la membrane cellulaire. Il se forme une structure intermédiaire précédant la structure en forme d'épingle à cheveux qui sera occasionnée par le repli des régions hélicoïdales de gp41 sur elles-mêmes (10,13,32). T-20 est un peptide qui mime une région de la deuxième région hélicoïdale près du C-terminus de gp41. Comme on le voit dans la figure 10, en se liant aux régions hydrophobiques conservées de gp41, T-20 inhibe le rassemblement des régions hélicoïdales de la gp41 nécessaires à la conversion de la structure en pré épingle à cheveux à la structure de fusion active en épingle à cheveux (12,32,42,57).

1.5.2.4 Caractérisation des inhibiteurs d'entrée dans un modèle de lymphocytes T

Plusieurs études ont évalué l'effet inhibiteur de ces drogues, en tant qu'agents uniques ou combinés, sur l'infection des lymphocytes T par le VIH-1. Tremblay et al. ont conduit une première étude in vitro sur la combinaison de T-20 et AMD-3100 contre un VIH-1 de type X4, afin d'évaluer l'interaction entre deux drogues agissant à différentes étapes du processus d'entrée du VIH-1 (57). Pour ce faire, ils ont ajouté simultanément les drogues, en agents uniques ou combinés à différentes concentrations, et un isolat clinique du VIH-1 (14a Pre) à des PBMCs provenant de donneurs séronégatifs pour le VIH-1. Au jour 4 post infection, ils ont recueilli le surnageant et ont analysé l'effet inhibiteur des drogues par la recherche de la production de l'antigène viral p24 à l'aide d'un ELISA. L'effet inhibiteur des drogues combinées a été analysé par la méthode de Chou et Talalay, basé sur le principe de l'effet médian, la technique isobologram et l'index de combinaison

(CI). Un index de combinaison inférieur à 0.9 indique une synergie, c'est-à-dire meilleur que l'effet additif lors de la combinaison de deux drogues, un index de combinaison compris entre les valeurs 0.9 et 1.1 indique un effet additif et un index supérieur à 1.1 indique un effet antagoniste (57). Dans cette étude, ils ont observé que l'isolat clinique 14a Pre était susceptible à T-20 et AMD-3100, avec un IC_{50} de $0.10 \pm 0.05\mu\text{g/ml}$ et $0.19 \pm 0.18\mu\text{g/ml}$ respectivement, sans aucune toxicité sur les PBMCs. De plus, l'effet inhibiteur de ces deux drogues est supérieur lors de leur combinaison, avec un index de combinaison inférieur à 0.9 pour chaque concentrations. Ils ont donc conclu l'évidence d'une forte synergie antivirale lors de la combinaison de ces deux drogues. (57)

Dans une seconde étude, ils ont caractérisé l'interaction de SCH-C, un antagoniste à CCR5, avec d'autres agents antirétroviraux sur VIH-1 dans un modèle de lymphocytes T $CD4^+$ in vitro (56). Ils ont évalué l'effet inhibiteur de différentes concentrations de SCH-C en monothérapie et en combinaison contre plusieurs isolats cliniques de type R5. Les résultats obtenus démontrent que SCH-C possède une activité inhibitrice contre tous les isolats R5 testés, avec un IC_{50} variant de 1.0 à 30.9nM, sans aucune toxicité cellulaire. De plus, la combinaison de SCH-C avec l'une ou l'autre des drogues représentant chaque classes antirétrovirales approuvées par la FDA soit; zidovudine et lamivudine (inhibiteur nucléosidique de la RT), efavirenz (inhibiteur non-nucléosidique de la RT) et indinavir (inhibiteur de la P) démontre une activité antirétrovirale synergique. La combinaison de SCH-C avec des inhibiteurs de l'attachement et l'entrée du VIH-1, soit T-20 (inhibiteur

de fusion) et AOP-RANTES (CCR5 antagoniste), démontre également un effet inhibiteur synergique (56).

1.5.2.5 Caractérisation des inhibiteurs d'entrée dans un modèle de DCs immatures

C'est en février 2003 que les premiers résultats portant sur l'étendue de l'activité des inhibiteurs d'attachement et d'entrée du VIH-1 sur les cellules dendritiques ont été publiés. Dans cette étude, Pope et al. ont évalué l'effet *in vitro* de trois inhibiteurs d'entrée du VIH-1, PRO 542, PRO 140 et T-20 sur l'infection *in cis* et *in trans* de divers types de cellules primaires, dont les cellules dendritiques (30,31). PRO 542, une immunoglobuline G de sous classe 2 (CD4-IgG2), est un inhibiteur d'attachement qui a démontré des résultats prometteurs lors d'études de phase I/II. PRO 140 (PA14) est un anticorps monoclonal qui entre dans la phase d'étude I et T-20 est un peptide dérivé de la gp41 du VIH-1 qui a démontré des effets antiviraux et une sécurité prometteuse lors d'études de phase III (32). Ils ont donc obtenu comme résultats que CD4-IgG2, PRO 140 et T-20 bloquent activement l'entrée du VIH-1 dans les cellules dendritiques immatures. Ensuite, ils ont évalué l'effet de ces inhibiteurs sur l'infection *in trans* des lymphocytes T CD4⁺ médiée par les DCs. Pour ce, ils ont infecté des DCs matures pendant 12 heures, ont lavé l'excédent de virus et ont incubé les DCs pendant 1 heure avec CD4-IgG2 ou T20. Ils ont ensuite ajouté les cellules CD14⁻, préalablement stimulées et incubées avec PRO 140, aux DCs matures infectées et ont déterminé la réplication virale par la recherche de l'antigène p24 à l'aide d'un ELISA. Ils ont conclu que les trois inhibiteurs ont efficacement bloqué l'infection *in trans* médié

par les DCs. (31) Dans leur seconde étude, ces même chercheurs ont obtenu des résultats similaires pour l'inhibiteur SCH-C (30).

2. Article

SUMMARY

Dendritic cells play an important role in the dissemination and propagation of HIV-1 during acute infection. Following mucosal exposition, the virus exploits the immune functions of the DCs in order to be transported to the lymph nodes where it will infect its target cells, the CD4⁺ T lymphocytes. Two pathways of HIV-1 penetration into dendritic cells have been postulated, resulting in *cis*- and *trans*-infection. A new class of antiretrovirals, the entry inhibitors have been successful in preventing viral entry in CD4⁺ T lymphocytes and in suppressing viral replication *in vivo*. We have evaluated the anti-HIV-1 activity of two entry inhibitors, the CCR5 inhibitor SCH-D, and a fusion inhibitor enfuvirtide on dendritic cell infection by an R5 virus. We observed a dose-response inhibition of both *cis*- and *trans*-infection of dendritic cells by SCH-D and by enfuvirtide. Anti-HIV-1 synergy between SCH-D and T-20 was also observed on *cis*-infection of dendritic cells. Our results suggest that these drugs may be useful to prevent the spread of infection during acute HIV-1 infection and may also play a role in limiting replenishment of viral reservoirs.

INTRODUCTION

Combination antiretroviral therapy has led to a dramatic reduction in HIV-1 related morbidity and mortality in countries where it is available (3). However, current therapies, even if they suppress viral load to undetectable levels (< 50 copies/ml) are unable to achieve viral eradication (16). One major obstacle is the presence of viral reservoirs that harbour replication-competent viruses and are difficult to reach with current drugs (5, 9, 19). Although the major HIV-1 reservoir consists of memory CD4⁺ T lymphocytes with a latent phenotype, other cell types have been identified as an HIV reservoir and may contribute to low-level viral replication even under suppressive antiretroviral therapy (5, 9, 16, 19). Among them are dendritic cells (DC) (2, 16). HIV-1 uses DCs to disseminate during acute infection and to maintain its persistence thereafter (2, 6, 12, 20).

Following mucosal exposition, the virus exploits the immune functions of the dendritic cells in order to be transported to the lymph nodes where it will infect its target cells, the CD4⁺ T lymphocytes (12, 20, 23, 24). Two pathways of HIV-1 penetration into dendritic cells are now postulated, resulting in *cis*- and *trans*-infection (1, 4, 6, 24). Similarly to HIV entry into CD4⁺ T cells, *cis*-infection of DCs occurs when the viral envelope glycoprotein gp120 interacts first with the CD4 coreceptor and then with the coreceptor CCR5 or CXCR4 at the surface of the DC (8, 13, 18). These binding events trigger conformational changes in gp120 allowing the exposure of the peptide fusion located at the N-terminus of gp41 (11, 13). Once the fusion peptide penetrates the cell membrane the first helical domain

of gp41 will fold into its second helical domain in a six-helix bundle conformation, leading to the fusion of viral and cellular membrane and to HIV-1 entry in the DC (11, 13). HIV-1 then continues its replication cycle resulting in the production of infectious virions. During the *trans*-infection, the virus exploits a second pathway, through the antigen internalization receptors at the surface of DCs (1, 4, 6, 24). One of the best characterized of these receptors is DC-SIGN, a C-type lectin that recognizes various carbohydrates (7, 14, 20, 23). DC-SIGN binds heavily glycosylated regions of gp120 (6, 23). HIV-1 is then rapidly internalized into endosomes, protected against degradation and neutralizing antibodies, and recycled at the cellular membrane once it has reached a CD4⁺ T lymphocytes rich area (4, 20, 24). Although the mechanisms of viral release and transfer to CD4⁺ T cells through the DCs endocytic pathway are still unknown, *trans*-infection of CD4⁺ T lymphocytes results in an important burst of viral production (15, 17).

Therapeutic approaches that target DC-mediated spread of infection could be extremely useful for the long-term control of HIV-1 infection (2). Furthermore, considering that DCs are among the first cells targeted by HIV-1 during mucosal infection, they also represent a good target to consider for the development of prophylactic agents (12, 13). Many of antiretroviral agents currently used, such as reverse transcriptase and protease inhibitors, poorly penetrate dendritic cells. However, the new class of antiretroviral targeting viral entry into cells may offer new opportunities to affect HIV-1 infection of DCs and impact on *trans*-infection

of CD4⁺ T lymphocytes (3, 10, 13). They also provide new tools to better understand the mechanisms of HIV-1 entry into DCs.

In this study we have evaluated the inhibitory effects of a CCR5 coreceptor inhibitor (SCH-D) and a fusion inhibitor enfuvirtide (T-20) on HIV-1 infection of DCs, and its subsequent transmission to CD4⁺ T cells (11, 21, 22). The result of our study demonstrates that entry inhibitors can efficiently block DCs infection, and that this effect has a repercussion on the *trans*-infection of CD4⁺ T lymphocytes.

MATERIALS AND METHODS

Generation of MDDCs: PBMCs from HIV-1 seronegative donors were obtained by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation of leukopheresis blood obtained through a protocol approved by the institution. In order to enhance T lymphocyte depletion, human CD3 Rosette Sep bispecific antibodies directed against surface antigen CD3 and glycoprotein A on red blood cells are added to the leukopheresis before Ficoll (Stem Cell technologies inc., Vancouver, BC). Isolation of the monocyte population is obtained by positive CD14 selection on the cell sorter (autoMACS) using magnetic beads (MACS kit) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). In order to differentiate them into dendritic cells, monocytes are then cultured in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich Inc., Oakville, Ontario) supplemented with 1% human serum AB (Gemini Bio-Products, Woodland, CA), 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 10mM HEPES buffer, 1X MEM non-essential amino acid, (Gibco Invitrogen Corporation, Burlington, Ontario) plus 1000U/ml GM-CSF (Cangene, Winnipeg, Manitoba) and 300U/ml IL-4 (Sigma-Aldrich Inc.) at a concentration of 1×10^6 cells/ml in 6-well FALCON tissue culture plates (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario). Culture is kept for 6 days with medium and cytokines renewal every second day. On day 6, purity and phenotype of immature dendritic cells is assessed by the level of expression of CD3, CD14, CD19 as well as CD80, CD83, CD86, DC-SIGN, CCR5 and CXCR4 using flow cytometry (FACScan cytometer, Becton Dickinson, Mississauga, Ontario). If the purity of the dendritic cells recovered is less than 99%, further depletion of

contaminating cells is achieved with dynabeads (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norway).

Evaluation of *trans*-infection: PBMCs obtained by Ficoll-Hypaque gradient density centrifugation of leukopheresis blood from the same healthy donor are cryopreserved for 6 days. PBMCs are then thawed and resuspended at a concentration of 2×10^6 cells/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum, 50U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 2mM L-glutamine, 10mM HEPES buffer (Gibco Invitrogen Corporation, Burlington, Ontario), 100U/ml IL-2 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) and 0.25 μ g/ml PHA (Sigma-Aldrich Inc., Oakville, Ontario). After 3 days of stimulation, PBMCs are then added to dendritic cells for evaluation of *trans*-infection. The level of expression of CD3, CD4, TCR, CCR5 and CXCR4 is assessed by flow cytometry.

Flow cytometry: Cells are stained in PBS 1X (Gibco Invitrogen Corporation, Burlington, Ontario) with the appropriate antibodies FITC- and PE-labelled (matched-isotypic controls, anti-CD3 FITC, anti-CD14 PE, anti-CD19 FITC, anti-CD80 FITC, anti-CD83 PE, anti-CD86 FITC, anti-DC-SIGN FITC, anti-CXCR4 PE, anti-CCR5 PE and anti-HLA-DR FITC/PE) (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario) and incubated 30 minutes at 4°C. They are then centrifuged and washed three times. Cells are resuspended in PBS 1X and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Inc., Oakville, Canada). Acquisition is carried

out on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario). The analysis is done with a Cell Quest software (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario).

Viruses: Laboratory-adapted strains BAL and IIIb were used for these experiences. Virus stocks have been grown in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and titered.

Drugs: The drugs used in this study include the CCR5 inhibitor SCH-D (Schering Plough Research Institute, Kenilworth, N.J.) and the fusion inhibitor T-20 (Trimeris Inc., Durham, N.C.).

Determination of IC₅₀: IC₅₀ in MDCCs was determined for each compound, with an inoculum of 10,000 TCID₅₀/ml of HIV-1 BAL, using serial concentrations of drugs. Drugs are added to the cells simultaneously with the HIV-1 inoculum (10,000 TCID₅₀/10⁶ cells) and are incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere for two hours. Cells are then washed three times in PBS 1X (Gibco Invitrogen Corporation, Burlington, Ontario), resuspended in medium and incubated for 15 days. Cell-free supernatant fluid is harvested every third day for determination of p24 antigen by ELISA (Vironostika HIV-1 antigen microelisa system) (Biomérieux, St-Laurent, Québec).

Drug interactions: Immature dendritic cells are resuspended at a concentration of 20×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented as described above, in 15ml tubes. Single drugs or combination of drugs are added to each tube, using a fixed ratio among drugs and serial dilutions. Drugs are added simultaneously with the HIV-1 BAL inoculum ($10,000 \text{ TCID}_{50}/10^6$ cells) and cells are incubated at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere for 2 hours. Cells are then washed three times with PBS 1X (Gibco Invitrogen Corporation, Burlington, Ontario). Cells are resuspended in RPMI-1640 supplemented as describe above at a concentration of 1×10^6 cells/ml and plated in 24-well FALCON tissue culture plates (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario). Cell-free culture supernatant fluids is harvested and analysed by ELISA (Vironostika HIV-1 antigen microelisa system) (Biomérieux, St-Laurent, Québec) for HIV-1 p24 antigen production on day 3, 6, 9, 12 and 15 of culture. To evaluate the effect of *trans*-infection, 5×10^5 stimulated T lymphocytes obtained from the same donor are added to half of the wells, at day 3 post-infection. Each condition, including uninfected controls as well as infected controls without drugs, are tested in duplicate and each experiment is repeated at least twice. In addition, uninfected drug-treated cytotoxicity controls are maintained at the highest concentration of each agent tested. Cell viability is assessed by the trypan-blue (Gibco Invitrogen Corporation, Burlington, Ontario) dye exclusion method.

RESULTS

Productive infection of dendritic cells: We have established an in vitro model of MDDCs that can be productively infected by HIV-1 (Figure 1) and can efficiently transmit infection to T lymphocytes (*trans*-infection) (Figure 2). Immature MDDCs express the coreceptor CCR5 at low levels. As they mature, the level of CCR5 decreases and CXCR4 expression increases. We first demonstrated that MDDCs could be productively infected, albeit at low levels by both R5 and X4 viruses (Figure 1a and 1b).

The cultures showed a high level of purity with levels of contaminating T lymphocytes < 0.03% on average, as measured by CD3 expression by flow cytometry (Figure 3).

CCR5 inhibition: SCH-D had potent inhibitory activity in dendritic cells against R5 laboratory-adapted isolate BAL. We observed dose-response to SCH-D both in the productive infection of MDDCs and in the *trans*-infection of lymphocytes (Figure 4a and 4b). IC₅₀ (50% inhibitory concentrations) values ranged from 1.45 to 2.61nM. In two different experiments, high doses of SCH-D were able to completely inhibit both *cis*- and *trans*-infection (Figure 3a and 3b). No toxicity was observed in uninfected dendritic cells at the highest concentration of drug used.

Fusion Inhibition: The fusion inhibitor, T-20, had potent inhibitory activity in dendritic cells against R5 laboratory-adapted isolate BAL. We observed a dose-

response to T-20 both in the productive infection of MDDCs and in the *trans*-infection of lymphocytes (Figure 5a and 5b). IC₅₀ (50% inhibitory concentrations) values ranged from 0.3 to 3.0ng/ml. No toxicity was observed in uninfected dendritic cells at the highest concentration of drug used.

Use of SCH-D and T-20 in combination: Combination of these two drugs was evaluated on *cis*- and *trans*-infection of dendritic cells by an R5 virus. Preliminary results suggest that additive to synergistic effects are obtained when combining these entry inhibitors on *cis*-infection of dendritic cells (Figure 6).

FIGURE LEGEND

Figure 1: *Cis*-infection of dendritic cells with 10,000 TCID₅₀ of (A) X4 isolate IIIb and (B) R5 isolate BAL, with and without zidovudine. Virus and zidovudine (1µM AZT) have been added simultaneously to dendritic cells and incubated for two hours. Dendritic cells have been washed and cultured for 9 or 12 days. Determination of HIV-1 p24 antigen in the cell culture supernatant fluid has been evaluated every second days by an ELISA. DC-IIIb / DC-IIIb-AZT: *cis*-infection of AZT treated or untreated dendritic cells by the virus IIIb. DC-BAL / DC-BAL-AZT: *cis*-infection of AZT treated or untreated dendritic cells by the virus BAL.

Figure 2: *Trans*-infection of PBMCs mediated by dendritic cells. Dendritic cells have been infected by 10000 TCID₅₀ of an R5 virus (BAL) in presence or absence of zidovudine for two hours. Dendritic cells have been washed and cultured for 13 days. At day 3 post-infection, stimulated PBMCs have been added to AZT treated and untreated infected dendritic cells. p24 antigen has been evaluated every third days by an ELISA. DC-BAL+T / DC-BAL-AZT+T: *trans*-infection of PBMCs mediated by AZT treated or untreated infected dendritic cells.

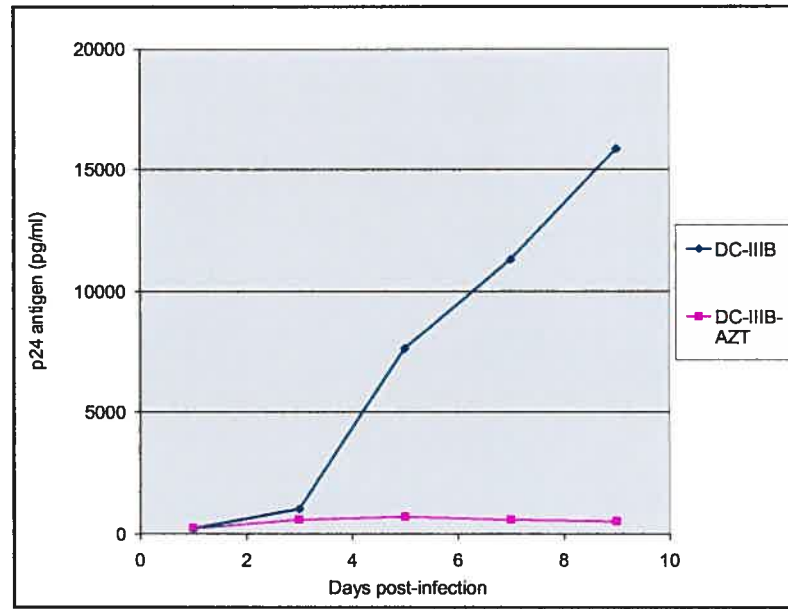
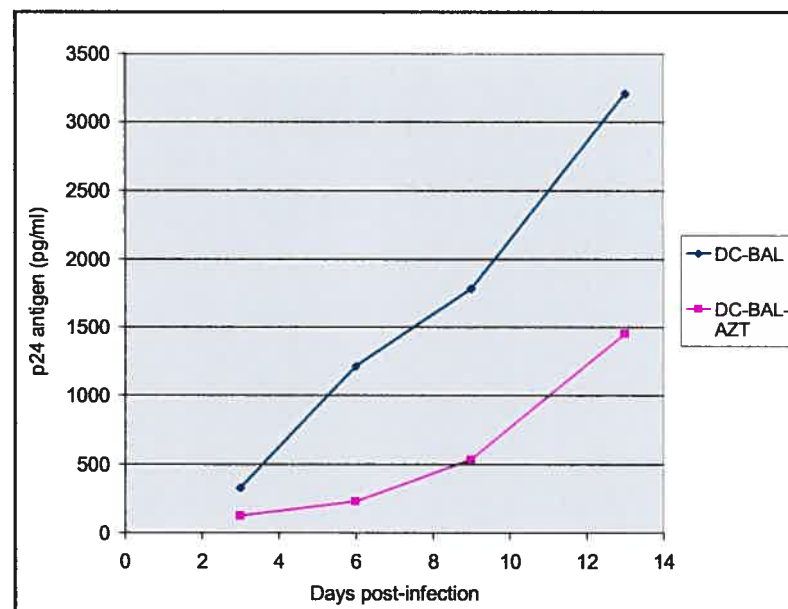
Figure 3: Purity of dendritic cells. Purity of dendritic cells is evaluated by the presence or absence of T lymphocytes. Detection of CD3 expression is achieved by flow cytometry.

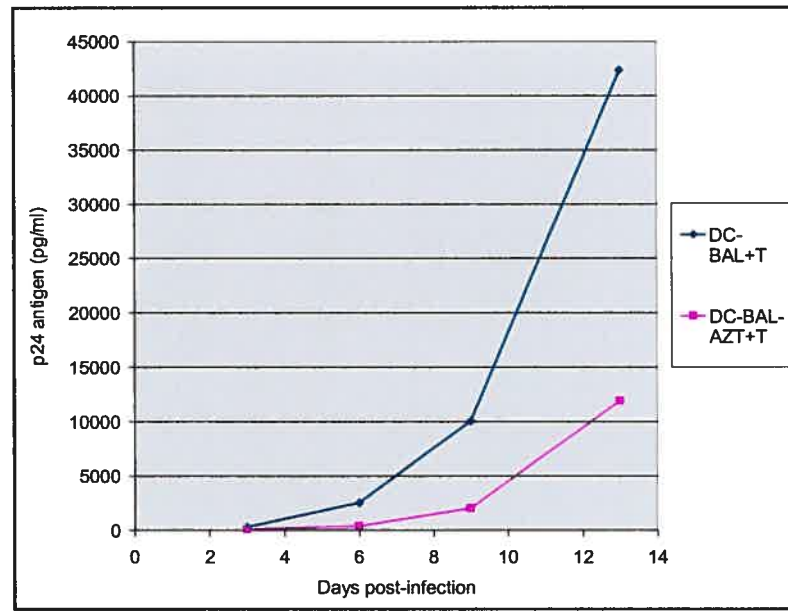
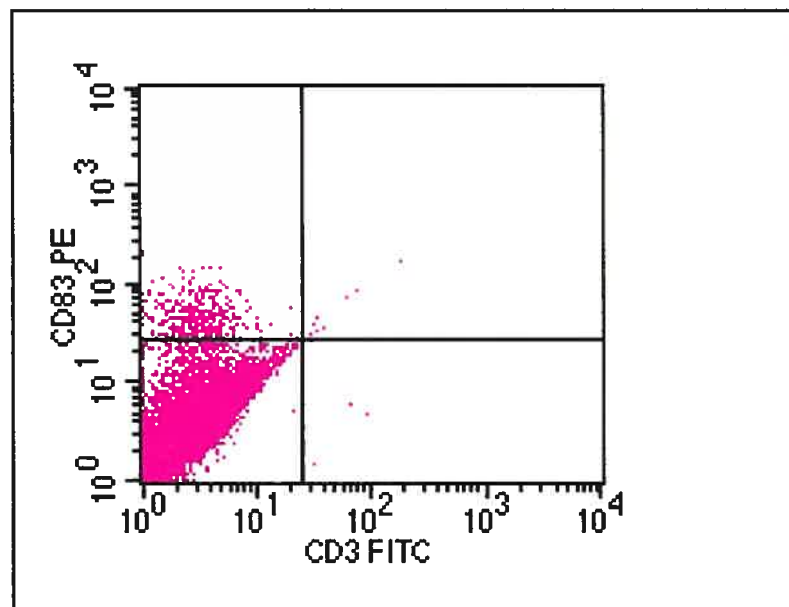
Figure 4: Dose-response of SCH-D, a CCR5 inhibitor on (A) *cis*-infection of dendritic cells with an R5 virus and (B) *trans*-infection of PBMCs by dendritic cells. Three doses of SCH-D (48 μ M, 9.6 μ M and 1.92 μ M) have been added to dendritic cells simultaneously to the virus for two hours. Dendritic cells have been washed and cultured for 12 days. *Trans*-infection have been evaluated by adding stimulated PBMCs to half treated and untreated infected dendritic cells at day 3 post-infection. HIV-1 p24 antigen has been evaluated in supernatant fluid at day 12 post-infection by an ELISA.

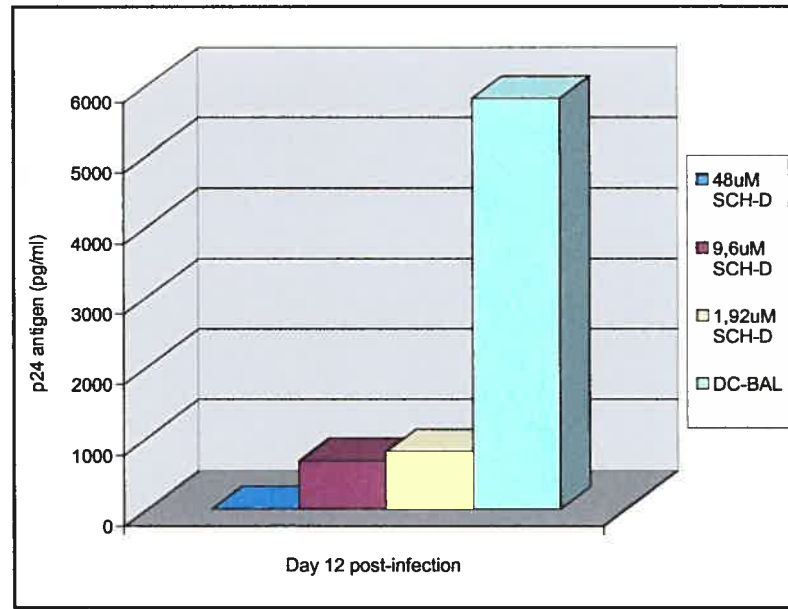
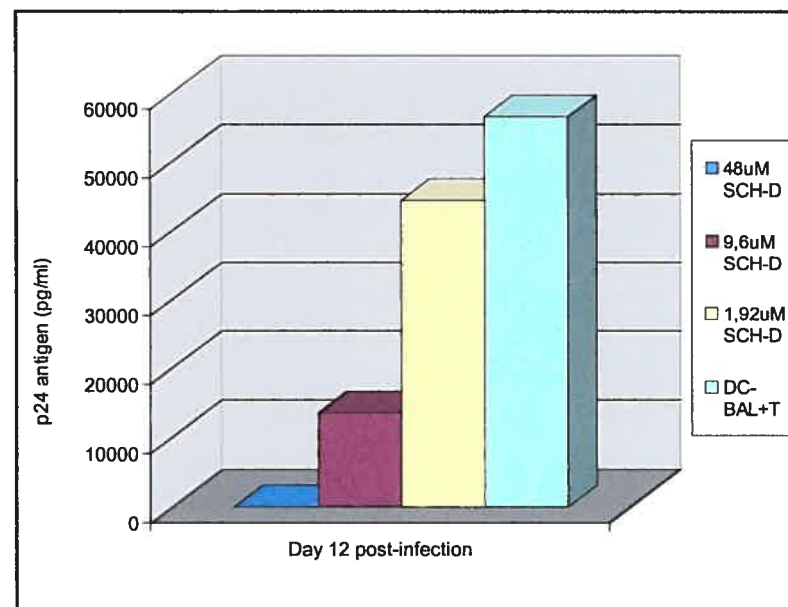
Figure 5: Dose-response of T-20, a fusion inhibitor on (A) *cis*-infection of dendritic cells with an R5 virus and (B) *trans*-infection of PBMCs by dendritic cells. Four doses of T-20 (0.32, 0.08, 0.02 and 0.005 μ g/ml) have been added to dendritic cells simultaneously to the virus for two hours. Dendritic cells have been washed and cultured for 13 days. *Trans*-infection have been evaluated by adding stimulated PBMCs to half treated and untreated infected dendritic cells at day 3 post-infection. HIV-1 p24 antigen has been evaluated in supernatant fluid at day 13 post-infection by an ELISA.

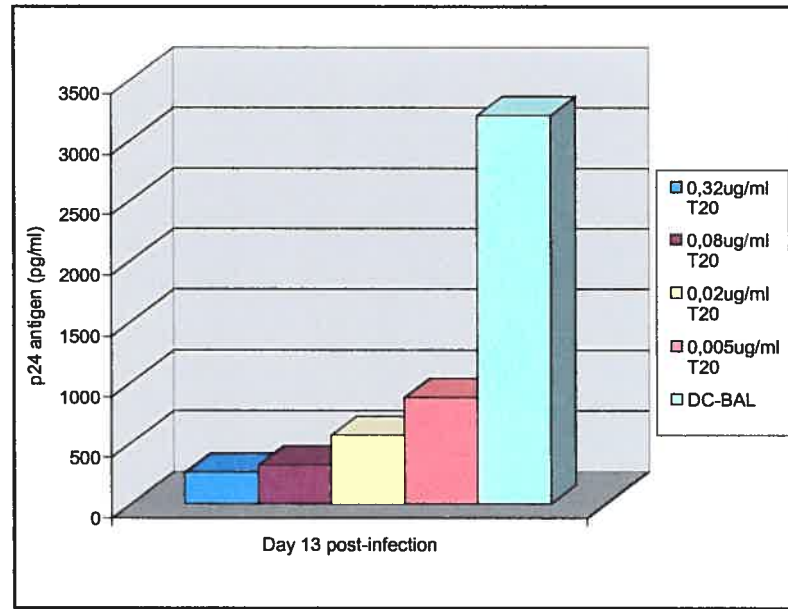
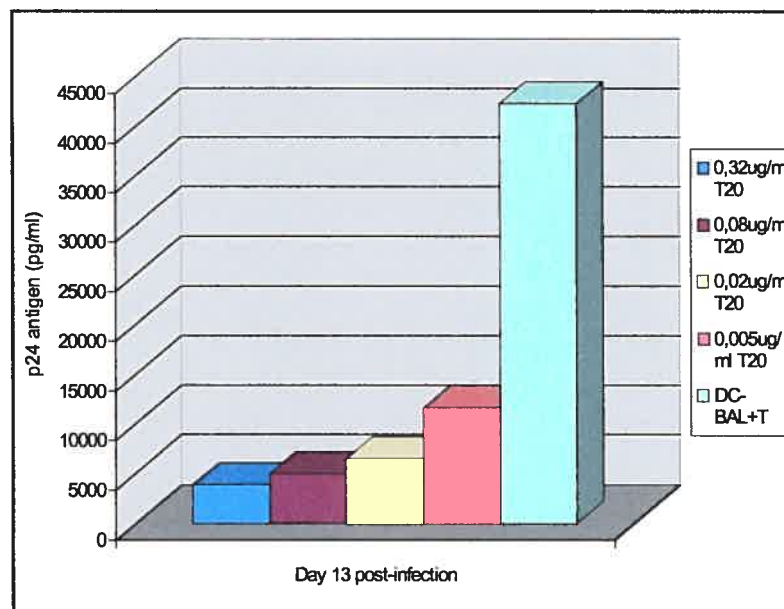
Figure 6: Dose-response of single drugs versus SCH-D + T-20 combined. Dendritic cells have been infected for two hours with four doses of T-20 or SCH-D or SCH-D and T-20 combined. HIV-1 p24 antigen has been evaluated in supernatant fluid by an ELISA at day 12 post-infection. **T-20:** Dose-response inhibition of T-20 on *cis*-infection of DCs. **SCH-D:** Dose-response inhibition of

SCH-D on *cis*-infection of DCs. **Combined:** Dose-response inhibition of T-20 and SCH-D on *cis*-infection of DCs.

**Figure 1a****Figure 1b**

**Figure 2****Figure 3**

**Figure 4a****Figure 4b**

**Figure 5a****Figure 5b**

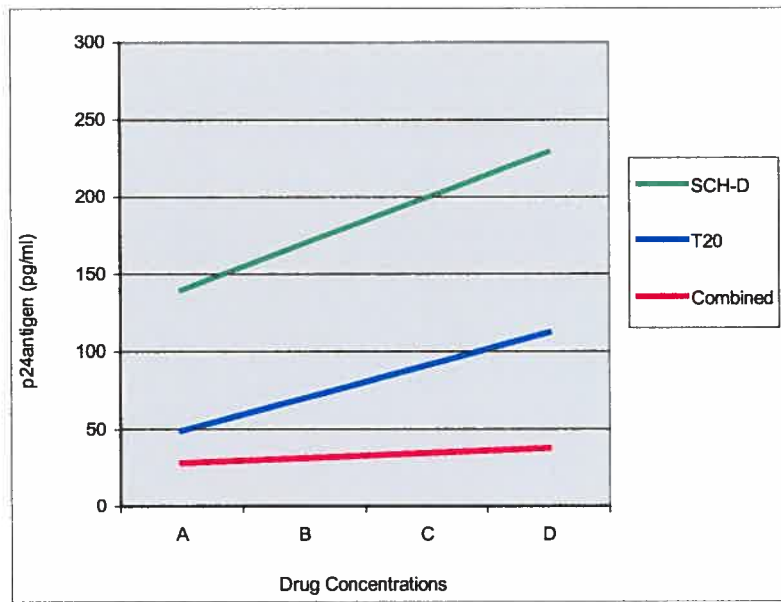


Figure 6

DISCUSSION

One of the major obstacles to HIV-1 eradication is the persistence of viral reservoirs under suppressive therapy (5, 9, 16). Low-level viral replication may contribute to the replenishment of these reservoirs (19). Dendritic cells have been known to trap replication-competent virions that can be released throughout the course of infection and may contribute to the replenishment of reservoirs (2, 12). Furthermore, they act as a Trojan Horse in the acute stages of mucosal infection to transport infectious particles to lymph nodes and other compartments rich in CD4⁺ T lymphocytes where they can further disseminate the infection (4, 6, 12). Blocking the entry process of HIV-1 into DCs could provide an interesting approach to prevent both *cis*- and *trans*-infection of these cells (3, 10, 13). Previous studies have shown that inhibitors acting at different steps of the entry process can block infection of CD4⁺ T lymphocytes in a synergistic manner (21, 22). In this study we have studied the effects of two entry inhibitors, one acting at the coreceptor level and one inhibiting fusion, on HIV-1 infection of DCs.

Productive infection of DCs has been controversial (12, 24). Previous studies have shown that DCs can be productively infected by HIV-1 at low levels (10, 17). In this study, we first established a reproducible system of *in vitro* infection of MDDCs. In this assay, we observed productive infection of immature DCs over a 15-day period which peaks at day 12 post-infection. The addition of PBMCs at day 3 of MDDC infection leads to fulminate infection of lymphocytes, 100-fold higher than with DCs alone. The *trans*-infection of PBMCs could be the result of

productive infection of DCs or the result of the release of infectious particles trapped near the surface of DCs by internalization receptors such as DC-SIGN. We were able to infect MDDCs with both R5 and X4 isolates depending on the level of maturation of the cells, maturing cells expressing higher levels of CXCR4.

We then evaluated the effect of inhibiting the co-receptor CCR5 on infection. We used the co-receptor antagonist SCH-D, which is a small molecule that specifically inhibits the binding of CCR5 to gp120 (21). We observed a dose-response inhibition of *cis*-infection of dendritic cells by this CCR5 inhibitor. This dose-response inhibition was also seen in *trans*-infection of PBMCs by dendritic cells. Interestingly, high doses of SCH-D completely inhibited both *cis*- and *trans*-infections. Earlier studies had suggested that the transmission of infectious particles from DCs to lymphocytes occurred mainly through a CD4 independent pathway, namely a DC-SIGN internalization pathway, which keeps viral particles in an endosomal compartment until release to the appropriate environment (1, 6, 14, 15, 23). Our data indicate that blocking CCR5 is sufficient to prevent transmission of virus to PBMCs, raising some questions about the importance of the endosomal pathway, via DC-SIGN, in the *trans*-infection process. The process of DC-mediated infection of PBMC is still poorly understood and one cannot exclude that CCR5 could be involved at some step of the CD4-independent pathway.

Enfuvirtide (ENF or T-20) is the first approved HIV-1 attachment/entry inhibitor (3, 11, 13, 22). It is a synthetic peptide corresponding to a region of HIV-1 gp41 that blocks fusion to cell membranes, and has been shown in large clinical trials to be beneficial in patients with advanced disease and considerable antiretroviral experience (3, 11, 13, 22). As T-20 binds directly to the helical domain of gp41 in order to prevent fusion of cell membranes, we evaluated its efficacy to prevent *cis*-infection of DCs. We observed a dose-response inhibition of *cis*-infection of dendritic cells. Furthermore, this dose-response inhibition was also observed in the *trans*-infection of PBMCs by DCs. Similarly to what was seen with SCH-D, high doses of T-20 completely inhibited both *cis*- and *trans*-infections (Data not shown). The observations that both a CCR5 inhibitor and a fusion inhibitor can directly impact on the *trans*-infection of PBMCs suggest that the CD4-CCR5 dependent pathway leading to *cis*-infection to DCs may be more important than previously thought in the transmission of infectious particles to other cell types.

Previous studies have shown that targeting two sequential steps of the entry process can result in synergistic inhibition of viral entry in PBMCs (21, 22). In our model of *cis*-infection of DCs, combining SCH-D and T-20 showed increased efficacy in anti-viral effect. The same combination did not achieve these effects on the *trans*-infection model. This may be related to the fact that high dose co-receptor antagonist is sufficient to block *trans*-infection of lymphocytes. It will be therefore difficult to demonstrate added benefit when combining it with another agent.

HIV-1 entry inhibitors are a promising class of antiretroviral not only for their antiretroviral activity but also for their potential to prevent replenishment of viral reservoirs (3, 11, 13, 21, 22). Our study demonstrates that SCH-D and T-20 have a potent antiviral activity on *cis*-infection of DCs and that this effect impacts on the *trans*-infection of T lymphocytes. Our results suggest that these drugs may be useful to prevent the spread of infection during acute HIV-1 infection and may also play a role in limiting replenishment of viral reservoirs. It supports a rationale to evaluate these agents for prophylaxis either in an oral formulation or as microbicides. This will need to be evaluated in carefully design clinical trials.

Acknowledgements:

C.L. Tremblay is an investigator supported by CIHR. This work has been supported by U.S. National Institutes of Health (NIH) grant CA12464, by a grant from the Schering-Plough Research Institute and by CANFAR.

REFERENCES

1. Chehimi J, Prakash K, Shanmugam V, Collman R, Jackson SJ, Bandyopadhyay S, Starr SE. CD4-independent infection of human peripheral blood dendritic cells with isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 1993;74:1277-85.
2. Collman RG, Perno CF, Crowe SM, Stevenson M, Montaner LJ. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *Journal of Leukocyte Biology* 2003;74:631-4.
3. D'Souza MP, Cairns JS, Plaeger SF. Current evidence and future directions for targeting HIV entry. *JAMA* 2000;284:215-22.
4. Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demareux N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen presentation to T cells. *The Journal of Immunology* 2002;168:2118-26.
5. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF. Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science* 1997;278:1295-1300.
6. Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Middel J, Cornelissen ILMHA, Nottet HSLM, Kewalramani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances *trans*-infection of T cells. *Cell* 2000;100:587-97.

7. Geijtenbeek TBH, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000;100:575-85.
8. Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, Chen D, Wei Y, Isdell F, O'Doherty U, Paxton W, Koup R, Mojsos S. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J. Exp. Med.* 1996;184:2433-8.
9. Ho DD, Zhang L. HIV-1 Rebound after anti-retroviral therapy. *Nature Medicine* 2000;6:757-761
10. Ketas TJ, Frank I, Klasse PJ, Sullivan BM, Gardner JP, Spenlehauer C, Nesin M, Olson WC, Moore JP, Pope M. Human immunodeficiency virus type 1 attachment, coreceptor, and fusion inhibitors are active against both direct and *trans* infection of primary cells. *Journal of Virology* 2003;77:2762-7.
11. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Jonson MR, Nowak MA, Shaw GM, Saag MS. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine* 1998;4:1302-07.
12. Loré K, Larsson M. The role of dendritic cells in pathogenesis of HIV-1 infection. *APMIS* 2003;111:776-88.
13. Pierson TC, Doms RW. HIV-1 entry inhibitors: new targets, novel therapies. *Immunology Letters* 2003;85:113-8.

14. Pöhlmann S, Baribaud F, Lee B, Leslie GJ, Sanchez MD, Hiebenthal-Millow K, Münch J, Kirchhoff F, Doms RW. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 2001;75:4664-72.
15. Pöhlmann S, Leslie GJ, Edwards TG, Macfarlan T, Reeves JD, Hiebenthal-Millow K, Kirchhoff F, Baribaud F, Doms RW. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus: virus binding and transfer are dissociable functions. *Journal of virology* 2001;7:10523-6.
16. Pomerantz RJ. Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication. *Clinical infectious diseases* 2002;34:91-97.
17. Pope M, Gezelter S, Gallo N, Hoffman L, Steinman RM. Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 1995;182:2045-56.
18. Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, Arthos J, Dybul M, Machado E, Cohn MA, Hoxie JA, Murphy PM, Fauci AS. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as co-receptors for HIV entry. *Journal of Immunology* 1998;160:3933-41.
19. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwich K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T Cells. *Nature Medicine* 2003;9:727-728.

20. Steinman RM. DC-SIGN: A guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000;100:491-4.
21. Tremblay CL, Giguel F, Kollmann, Guan Y, Chou TC, Baroudy BM, Hirsch MS. Anti-human immunodeficiency virus interactions of SCH-C (SCH 351125), a CCR5 antagonist, with other antiretroviral agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002;46:1336-9.
22. Tremblay CL, Kollmann C, Giguel F, Chou TC, Hirsch MS. Strong synergy between the fusion inhibitor T-20 and the CXCR4 blocker AMD-3100. *JAIDS* 2000;25:99-102.
23. Turville S, Wilkinson J, Cameron P, Dable J, Cunningham AL. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology* 2003;74:710-8.
24. Turville SG, Cameron PU, Arthos J, MacDonald K, Clark G, Hart D, Cunningham AL. Bitter-sweet symphony: defining the role of dendritic cell gp120 receptors in HIV infection. *Journal of Clinical Virology* 2001;22:229-39.

3. Discussion

Comme le rapporte le programme de surveillance des Nations Unies (UNAIDS), le nombre de victimes atteintes du VIH mondialement ne cesse de s'accroître (49). Au cours de l'année 2002, 5 millions de primo-infections ont été répertoriées et près de 45000 de ces cas touchent l'Amérique du Nord (55). Ces données démontrent que malgré les connaissances actuelles que nous possédons sur ce virus, il est important de poursuivre les recherches afin qu'un jour nous parvenions à empêcher sa transmission.

Récemment, l'utilisation de thérapies antirétrovirales combinées chez les patients atteints du VIH s'est vue couronnée de succès (12,42,46). Cette stratégie, devenue une pratique de plus en plus courante, a permis de réduire le nombre de virus libres dans le sang, et par conséquent, diminuer le taux de morbidité et de mortalité dans la population séropositive (12,46). Cependant, malgré tous les bénéfices que peuvent apporter les thérapies combinées, il n'en demeure pas moins que le virus reste présent dans l'organisme (46). Le principal obstacle face à l'éradication du VIH-1 est sa persistance dans les réservoirs viraux (46). Le virus se cache à l'intérieur des cellules, particulièrement les cellules T CD4⁺ mémoires, à partir desquelles il exerce une réplication virale à bas bruit lui permettant ainsi de persister dans l'organisme (46). Ajouté au fait que les cellules dendritiques soient en partie responsables de la dissémination et de la propagation du VIH en le transportant jusqu'aux compartiments riches en cellules T CD4⁺ lors d'une exposition mucosale, elles semblent également être impliquées dans l'élaboration des réservoirs viraux (3,6,19,26,46,52,61). Par conséquent, bloquer le processus

d'entrée du VIH-1 dans les cellules dendritiques pourrait s'avérer être une approche intéressante afin de prévenir à la fois l'infection en *cis* et en *trans* des cellules dendritiques que l'élaboration des réservoirs viraux (30,31,64,65). Lors d'études antérieures, il a été démontré que l'utilisation conjointe d'inhibiteurs agissant à différentes étapes du processus d'entrée du VIH parvenait à bloquer l'infection des lymphocytes T CD4⁺, et ce, de façon synergique (56,57). Dans cette étude, nous avons donc étudié l'effet de deux inhibiteurs d'entrée, un inhibiteur du corécepteur CCR5 et un inhibiteur de fusion, sur l'infection des cellules dendritiques par le VIH-1.

L'infection productive des cellules dendritiques par le VIH-1 est très controversée dans la population scientifique (6,8,23,24,26,29). Néanmoins, certaines études ont démontré que les cellules dendritiques pouvaient être productivement infectées, mais ce, à un très faible niveau comparativement aux lymphocytes T CD4⁺ (37,47). Dans cette étude, nous avons tout d'abord réussi à établir un système d'infection des MDDCs *in vitro* reproductible. Avec ce système, nous observons une infection productive des cellules dendritiques immatures (infection en *cis*) s'étalant du jour 3 au jour 15 post-infection. Afin de pouvoir étudier l'infection en *trans* des PBMCs médiée par les cellules dendritiques, nous avons ajouté des PBMCs autologues aux cellules dendritiques en jour 3 post-infection. Nous avons alors observé une infection fulminante des cellules T CD4⁺, près de 100 fois supérieure à l'infection des DCs seules. Il est alors très plausible d'envisager que l'infection des PBMCs soit le résultat d'une infection productive des cellules

dendritiques ou tout simplement le résultat du relâchement des particules infectieuses dissimulées près de la membrane plasmique des DCs par des récepteurs d'internalisation tel DC-SIGN.

Dans cette étude, nous sommes parvenus à infecter les cellules dendritiques immatures à la fois par un virus R5 (tropisme pour les macrophages) que par un virus X4 (tropisme pour les cellules T). Le niveau d'expression des corécepteurs CCR5 et CXCR4 à la surface des cellules dendritiques varie selon l'état d'activation de la DC, la cellule mature exprimant davantage de CXCR4 que de CCR5 (8,23,24,26,42,53). L'état d'activation de la cellule pourrait donc expliquer l'infection des cellules dendritiques immatures par un virus X4.

Nous avons ensuite évalué les conséquences de l'inhibition du corécepteur CCR5 sur l'infection des cellules dendritiques immatures. Pour ce, nous avons utilisé un antagoniste au corécepteur CCR5, SCH-D, qui est une petite molécule capable d'inhiber de façon spécifique la liaison de gp120 à CCR5 (31,59). Nous avons observé une inhibition dose-dépendante de l'infection des cellules dendritiques par cet inhibiteur. Cette inhibition dose-dépendante a été également observé lors de l'infection en *trans* des PBMCs médiée par les cellules dendritiques. De façon intéressante, nous avons également observé que de fortes doses de SCH-D inhibent complètement à la fois l'infection en *cis* que l'infection en *trans*. Des études précédentes ont suggéré que le virus puisse pénétrer la cellule dendritique indépendamment du récepteur CD4 (6,9,11). Au cours de cette voie, le virus est lié

par un récepteur d'internalisation, tel DC-SIGN, est maintenu sous la membrane plasmique dans des compartiments endosomaux et est relâché une fois l'environnement riche en cellules T CD4⁺ atteint (9,14,19,25,26). Nos résultats indiquent que seule l'inhibition de la liaison de gp120 à CCR5 suffit afin de prévenir la transmission du virus aux PBMCs. Ces résultats soulèvent donc maintes questions quant à l'importance de la voie de pénétration du VIH, via DC-SIGN, dans les DCs au cours du processus d'infection en *trans* des PBMCs. Cependant, comme le processus de l'infection en *trans* des PBMCs médiée par les cellules dendritiques est encore très peu connu, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le corécepteur CCR5 soit impliqué à l'une ou l'autre des étapes du processus d'entrée du VIH-1 via la voie CD4 indépendante.

Enfuvirtide (ENF), plus communément appelé T-20, est le premier inhibiteur de l'entrée et de l'attachement du VIH-1 approuvé par la FDA (12). T-20 est un peptide synthétique correspondant à une région de la glycoprotéine gp41 du VIH-1 qui bloque la fusion des membranes (42,57). Dans les dernières années, T-20 a fait l'objet de plusieurs projets de recherche et son utilisation dans le cadre d'essais cliniques s'est avéré très bénéfique pour les patients présentant un stade avancé de la maladie et une expérience antirétrovirale considérable (32,57). Comme T-20 se lie directement à la gp41 afin d'empêcher la fusion des membranes, nous avons évalué son efficacité à prévenir l'infection en *cis* des cellules dendritiques. Nous avons observé une inhibition dose-dépendante sur l'infection en *cis* des DCs. De plus, cette inhibition dose-dépendante a également été observée lors de l'infection

en *trans* des PBMCs par les DCs. Pareillement aux résultats obtenus pour SCH-D, une forte dose de T-20 inhibe complètement l'infection en *cis* et en *trans*. La constatation qu'un inhibiteur de CCR5 ou un inhibiteur de fusion puisse avoir un impact direct sur l'infection en *trans* des PBMCs suggère que l'infection en *cis* des DCs par la voie d'entrée dépendante du CD4 et du CCR5 est probablement plus importante que l'on pensait au niveau de la transmission des particules infectieuses aux autres types cellulaires.

Lors d'une étude précédente, l'équipe de Mélissa Pope a également observé une activité inhibitrice efficace d'un inhibiteur de CCR5 et d'un inhibiteur de fusion sur l'infection en *cis* des cellules dendritiques dans un modèle *in vitro* (30,31). Ils ont aussi rapporté une action inhibitrice de ces inhibiteurs sur l'infection en *trans* des lymphocytes T médiée par les DCs. Cependant, pour étudier l'infection en *trans*, ils ont infecté des DCs matures auxquelles ils ont ajouté, après plusieurs lavages, les drogues suivis des cellules T (30,31). Avec l'utilisation d'une telle méthode, nous ne considérons pas que l'effet des drogues observé sur l'infection des PBMCs reflète vraiment une inhibition de l'infection en *trans*. Nous croyons que l'effet observé résulte simplement de l'inhibition de l'infection des PBMCs par la présence des drogues lors de l'infection de ceux-ci. Le système d'infection utilisé dans notre étude nous permet d'affirmer que l'effet observé dans notre étude reflète une inhibition de l'infection en *trans* des PBMCs médiée par les DCs, car l'inhibition provient de l'action des drogues au niveau de l'infection des DCs et non pas directement sur les PBMCs.

Des études antérieures ont démontré qu'attaquer deux sites séquentiels du processus d'attachement et d'entrée du virus dans la cellule résulte en une inhibition synergique de l'entrée du VIH-1 dans les PBMCs (56,57). Dans notre modèle d'infection en *cis* des cellules dendritiques, la combinaison de SCH-D et de T-20 a démontré un effet antiviral supérieur à l'une ou l'autre drogue utilisée individuellement. Cependant, la supériorité de cette même combinaison ne s'est pas répercuté lors de l'infection en *trans*. Il est possible que puisqu'une forte dose d'un antagoniste à CCR5 suffise à bloquer l'infection en *trans* des PBMCs, il sera difficile de démontrer la supériorité de l'ajout d'une deuxième molécule. Ceci suggère que les autres voies de pénétration du virus dans la DC soient d'une importance secondaire dans l'élaboration de l'infection en *trans* des PBMCs.

Deux modes d'entrée du VIH dans les cellules dendritiques sont présentement connus, en *cis* et en *trans* (6,9). L'infection en *cis* est l'entrée du virus dans la DC via CD4 et CCR5 et l'infection en *trans* est l'infection des PBMCs médiée par les cellules dendritiques (36,52,61). Bien que la libération de particules infectieuses par la DCs infectée en *cis* puisse conduire à l'infection en *trans* des PBMCs, depuis la découverte de DC-SIGN, l'infection en *trans* est fortement associée à l'entrée du VIH dans les DCs indépendamment de CD4 (14,19). Cette lectine de type-C, par sa capacité à lier les hydrates de carbone, lie le VIH, l'internalise et le recycle à la membrane dans les sites riches en cellules T CD4⁺ (44,61). DC-SIGN est actuellement reconnu comme principal responsable de la transmission des particules infectieuses des DCs aux lymphocytes T CD4⁺ (19). Cependant, à partir

des résultats obtenus au cours de cette étude, plusieurs questions se posent quant à sa réelle implication dans l'infection en *trans* des PBMCs. DC-SIGN est-il le principal acteur lors de la transmission du virus aux cellules T ou est-ce au contraire les virions résultants de l'infection en *cis*? Nous avons réalisé deux expériences dans lesquelles nous avons bloqué DC-SIGN à l'aide d'anticorps monoclonaux. Bien que ces résultats soient préliminaires et que ces expériences doivent absolument être répétées, les résultats obtenus sont très intéressants. Nous avons noté une infection plus prononcée avec les plus fortes doses d'anticorps et des infections plus faibles en présence des petites concentrations d'anticorps. Est-ce que ces résultats contradictoires reflètent simplement la présence d'anticorps monoclonaux où est-ce que l'inaccessibilité à DC-SIGN puisse réellement rehausser l'infection? Des études subséquentes sont nécessaires afin d'élucider ces observations.

Les inhibiteurs d'entrée du VIH-1 sont des agents antirétroviraux très prometteurs, non seulement pour leur activité antirétrovirale, mais aussi pour leur potentiel préventif dans l'élaboration des réservoirs viraux (12,32,42). Notre étude démontre donc que SCH-D et T-20 ont une activité antivirale efficace sur l'infection en *cis* des cellules dendritiques et que cet effet a un impact sur l'infection en *trans* des lymphocytes T. Nos résultats suggèrent que ces drogues puissent être utiles pour prévenir la dissémination et la propagation viral lors d'une primo-infection à VIH-1 et puissent contrôler l'élaboration des réservoirs viraux. Il est donc possible d'envisager l'utilisation de ces agents dans le cadre d'une prophylaxie, soit par une

formulation orale ou par leur incorporation à des crèmes microbicides. Elles procureraient ainsi une protection supplémentaire lors des relations sexuelles protégées.

4. Conclusion

En conclusion, ce travail nous a permis d'affirmer que l'inhibiteur de CCR5, SCH-D et l'inhibiteur de fusion T-20 ont une activité inhibitrice sur l'infection des cellules dendritiques par un virus R5. Comme cet effet se répercute sur l'infection en trans des PBMCs, l'utilisation de ces agents dans le cadre d'une prophylaxie permettrait de prévenir la dissémination, la transmission du virus aux cellules T et l'élaboration des réservoirs viraux. Des essais cliniques seront cependant requis pour valider ces résultats *in vivo*.

5. Bibliographie

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4th Edition, WB Saunders, Philadelphie, 2000. Chapitre 10, p.351.
2. Applemelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin on dendritic cells. *The Journal of Immunology* 2003;170:1635-9.
3. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
4. Baribaud F, Pöhlman S, Doms RW. The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and SIV attachment, infection and transmission. *Virology* 2001;286:1-6.
5. Baribaud F, Pöhlman S, Leslie G, Mortari F, Doms RW. Quantitative expression and virus transmission analysis of DC-SIGN on monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Virology* 2002;76:9135-42.
6. Blauvelt A, Asada H, Saville MW, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Yarchoan R, Katz SI. Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathway. *The journal of Clinical Investigation* 1997;100:2043-53.
7. Cambi A, Gijzen K, de Vries JM, Toesma R, Joosten B, Adema GJ, Netea MG, Kullberg BJ, Romani L, Figdor CG. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *European Journal of Immunology* 2003;33(2):532-8.
8. Canque B, Bakri Y, Camus S, Yagello M, Benjouad A, Gluckman JC. The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus type 1 strains of

dendritic cells derived in-vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood* 1999;93:3866-75.

9. Chehimi J, Prakash K, Shanmugam V, Collman R, Jackson SJ, Bandyopadhyay S, Starr SE. CD4-independent infection of human peripheral blood dendritic cells with isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 1993;74:1277-85.
10. Cooley LA, Lewin SR. HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *Journal of Clinical Virology* 2003;26:121-32.
11. Curtis BM, Scharnowske S, Watson AJ. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:8356-60.
12. D'Souza MP, Cairns JS, Plaeger SF. Current evidence and future directions for targeting HIV entry. *JAMA: journal of the American Medical Association* 2000;284:215-22.
13. Dietrich U. HIV-1 entry inhibitors. *AIDS reviews* 2001;3:89-97.
14. Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen presentation to T cells. *The Journal of Immunology* 2002;168:2118-26.

15. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of virology :molecular biology, pathogenesis, and control. ASM Press, Washington D.C. 2000. Chapter 18.
16. Frank I, Piatak MJr, Stoessel H, Romani N, Bonyay D, Lifson JD, Pope M. Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs. *Journal of Virology* 2002;76:2936-51.
17. Garzimo-Demo A, DeVico AL, Conant KE, Gallo RC. The role of chemokines in human immunodeficiency virus infection. *Immunological Reviews* 2000;177:79-87.
18. Geijtenbeek TBH, Engering A, van Kooyk Y. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *Journal of Leucocyte Biology* 2002;71:921-31.
19. Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Middel J, Cornelissen ILMHA, Nottet HSLM, Kewalramani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances *trans*-infection of T cells. *Cell* 2000;100:587-97.
20. Geijtenbeek TBH, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000;100:575-85.
21. Geijtenbeek TBH, van Duijnhoven GCF, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, van Kooyk Y. Identification of different binding sites in the

- dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *The Journal of Biological Chemistry* 2002;227:11314-20.
22. Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate: DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS: acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica* 2003;111:698-714.
23. Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinmn RM. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *Journal of Virology* 1998;72:2733-7.
24. Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, Chen D, Wei Y, Isdell F, O'Doherty U, Paxton W, Koup R, Mojsov S. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *Journal of Experimental Medicine* 1996;184:2433-8.
25. Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 2002;20:621-67.
26. Hosmalin A. Cellules dendritiques et infection par le VIH. *Virologie* 1997;3:97-104.
27. Jameson B, Baribaud F, Pöhlman S, Ghavimi D, Mortari F, Doms RW, Iwasaki A. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *Journal of Virology* 2002;76:1866-75.

28. Janeway CA, Travers P. Immunobiologie 2^e édition. De Boeck-Larcier S.A. Paris, Bruxelles, 1997. Chapitre 9 et 10, pp9:16-17, 10:20-31.
29. Kawamura T, Qualbani M, Thomas EK, Orenstein JM, Blauvelt A. Low level of productive infection in langerhans cell-like dendritic cells differentiated in the presence of TGF- β 1 and increased viral replication with CD40 ligand-induced maturation. *European Journal of Immunology* 2001;31:360-8.
30. Ketas T, Klasse PJ, Spencehauer C, Nessim M, Frank I, Pope M, Strizki JM, Reyes GR, Baroudy BM, Moore JP. Entry inhibitors SCH-C, RANTES and T20 block HIV type 1 replication in multiple cell types. *AIDS research and human retroviruses* 2003;19:177-86.
31. Ketas TJ, Frank I, Klasse PJ, Sullivan BM, Gardner JP, Spencehauer C, Nessim M, Olson WC, Moore JP, Pope M. Human immunodeficiency virus type 1 attachment, coreceptor, and fusion inhibitors are active against both direct and *trans*-infection of primary cells. *Journal of Virology* 2003;77:2762-7.
32. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Jonson MR, Nowak MA, Shaw GM, Saag MS. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine* 1998;4:1302-07.
33. Lamontagne L. Virologie générale (BIO 4040). Département des sciences biologiques, automne 2000, UQAM, Montréal. Section VIH, pp.66-74.
34. Larkin M, Childs RA, Matthews TJ, Thiel S, Mizuochi T, Lawson AM, Savill JS, Haslett C, Diaz R, Feizi T. Oligosaccharide-mediated interactions of the

- envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *AIDS* 1989;3:793-8.
35. Lee B, Leslie G, Soilleux E, O'Doherty U, Baik S, Levroney E, Flummerfelt K, Swiggard W, Coleman N, Malim M, Doms RW. *cis* expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and coreceptor. *Journal of Virology* 2001;75:12028-38.
36. Loré K, Larsson M. The role of dendritic cells in pathogenesis of HIV-1 infection. *APMIS: acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica* 2003;111:776-88.
37. Mallon DFJ, Buck A, Reece JC, Crowe SM, Cameron PU. Monocyte-derived dendritic cells as a model for the study of HIV-1 infection: Productive infection and phenotypic changes during culture in human serum. *Immunology and Cell Biology* 1999;77:442-50.
38. McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 2003;300:1295-7.
39. Moore JP, Doms RW. The entry of entry inhibitors: A fusion of science and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:10598-602.
40. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenza-Seisdedos F, Despres P. Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Reports* 2003;4:723-8.

41. O'Hara BM, Olson WC. HIV entry inhibitors in clinical development. *Current Opinion in Pharmacology* 2002;2:523-28.
42. Pierson TC, Doms RW. HIV-1 entry inhibitors: new targets, novel therapies. *Immunology Letters* 2003;85:113-8.
43. Pöhlmann S, Baribaud F, Lee B, Leslie GJ, Sanchez MD, Hiebenthal-Millow K, Münch J, Kirchhoff F, Doms RW. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 2001;75:4664-72.
44. Pöhlmann S, Leslie GJ, Edwards TG, Macfarlan T, Reeves JD, Hiebenthal-Millow K, Kirchhoff F, Baribaud F, Doms RW. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus: virus binding and transfer are dissociable functions. *Journal of virology* 2001;7:10523-6.
45. Pöhlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology* 2003;77:4070-80.
46. Pomerantz RJ. Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication. *Clinical infectious diseases* 2002;34:91-97.
47. Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, Arthos J, Dybul M, Machado E, Cohn MA, Hoxie JA, Murphy PM, Fauci AS. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as co-receptors for HIV entry. *Journal of Immunology* 1998;160:3933-41.

48. Simmons G, Reeves JD, Hibbitts S, Stine JT, Gray PW, Proudfoot AEI, Clapham PR. Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. *Immunological Reviews* 2000;177:112-26.
49. Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chemi J, Luo Q, Levrony E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of Leucocyte Biology* 2002;71:445-57.
50. Soilleux EJ. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? *Clinical Science* 2003;104:437-46.
51. Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells. *Journal of Leucocyte Biology* 1999;66:205-8.
52. Steinman RM. DC-SIGN: A guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000;100:491-4.
53. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS: acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica* 2003;111:675-97.
54. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod LP, Gluckman JC, Lagrange PH, Gicquel B, Neyrolles O. DC-SIGN is the major *Mycobacterium Tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 2003;197:121-7.
55. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS Web site. Available at: <http://www.unaids.org>. Accessed October 24th, 2003.

56. Tremblay CL, Giguel F, Kollmann, Guan Y, Chou TC, Baroudy BM, Hirsch MS. Anti-human immunodeficiency virus interactions of SCH-C (SCH 351125), a CCR5 antagonist, with other antiretroviral agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002;46:1336-9.
57. Tremblay CL, Kollmann C, Giguel F, Chou TC, Hirsch MS. Strong synergy between the fusion inhibitor T-20 and the CXCR4 blocker AMD-3100. *Journal of acquired immune deficiency syndromes: JAIDS* 2000;25:99-102.
58. Tsamis F, Gavrilov S, Kajumo F, Seibert C, Kuhmann S, Ketas T, Trkola A, Palani A, Clader JW, Tagat JR, McCombie S, Baroudy B, Moore JP, Dragic T. Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *Journal of virology* 2003;77:5201-08.
59. Tsunetsugu-Yokota Y, Akagawa K, Kimoto H, Suzuki K, Iwasaki M, Yasuda S, Häusser G, Hultgren C, Meyerhans A, Takemori T. Monocyte-Derived culture dendritic cells are susceptible to human immunodeficiency virus infection and transmit virus to resting T cells in the process of nominal antigen presentation. *Journal of Virology* 1995;69:4544-4547.
60. Turville S, Wilkinson J, Cameron P, Dable J, Cunningham AL. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology* 2003;74:710-8.
61. Turville SG, Cameron PU, Arthos J, MacDonald K, Clark G, Hart D, Cunningham AL. Bitter-sweet symphony: defining the role of dendritic cell

- gp120 receptors in HIV infection. *Journal of Clinical Virology* 2001;22:229-39.
62. Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pöhlman S, Doms RW, Cunningham AL. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature Immunology* 2002;3:975-83.
63. van Kooyk Y, Appelmelk B, Geijtenbeek TBH. A fatal attraction: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends in Molecular Medicine* 2003;9:153-9.
64. van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature Reviews* 2003;3:697-708.
65. Weissman D, Fauci AS. Role of dendritic cells in immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clinical Microbiology* 1997;10:358-67.
66. Weissman D, Li Y, Orenstein JM, Fauci AS. Both a precursor and a mature population of dendritic cells can bind HIV. *The Journal of Immunology* 1995;155:4111-7.
67. Wu L, Martin TD, Vazeux R, Unutmaz D, KewalRamani VN. Functional evaluation of DC-SIGN monoclonal antibodies reveals DC-SIGN interactions with ICAM-3 do not promote human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Journal of Virology* 2002;76:5905-14.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Geneviève Bélanger Jasmin
M.Sc. Microbiologie et immunologie

2. Description de l'article

Liste des auteurs: Genevieve Bélanger Jasmin, Sylvie Beaulieu, M-Rachid Boulassel, Annie Chamberland, Éric Cohen, ~~Rafael Rivera Schedy~~, ~~Martin Hirsch~~ et Cécile Tremblay.

Titre de l'article: Characterization of HIV-1 entry inhibitors interactions in an in vitro model of dendritic cells

L'article est en phase final de préparation.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que *Geneviève Bélanger Jasmin* inclut cet article dans son *mémoire de maîtrise* qui a pour titre *Caractérisation des interactions d'inhibiteurs de l'entrée du VIH dans un modèle de cellules dendritiques in vitro*.

Sylvie Beaulieu

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

M-Rachid Boulassel

Coauteur _____ Signature  Date 19 décembre 2003

Annie Chamberland

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

Éric Cohen

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

~~Rafael Rivera Schedy~~

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

~~Martin Hirsch~~

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

Cécile Tremblay

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Geneviève Bélanger Jasmin
M.Sc. Microbiologie et immunologie

2. Description de l'article

Liste des auteurs: Genevieve Bélanger Jasmin, Sylvie Beaulieu, Rachid Boulassel, Annie Chamberland, Éric A. Cohen, ~~Rafic Pierre Sékaly~~, ~~Martin Hirsch~~ et Cécile Tremblay.

Titre de l'article: Caraceterization of HIV-1 entry inhibitors interactions in an in vitro model of dendritic cells

L'article est en phase final de préparation.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que *Geneviève Bélanger Jasmin* inclut cet article dans son *mémoire de maîtrise* qui a pour titre *Caractérisation des interactions d'inhibiteurs de l'entrée du VIH dans un modèle de cellules dendritiques in vitro.*

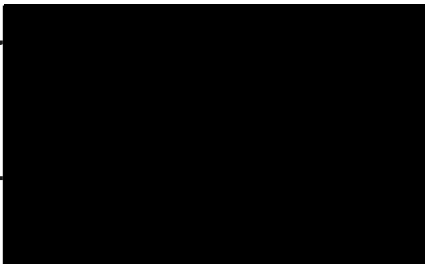
Sylvie Beaulieu

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

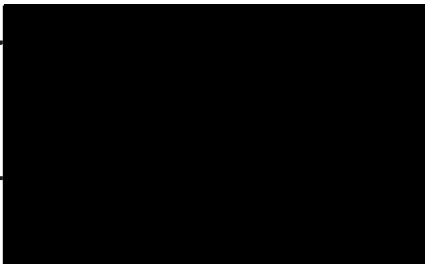
Rachid Boulassel

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

Annie Chamberland

Coauteur _____  _____ Date _____

Éric A. Cohen

Coauteur _____  _____ 19/12/03 _____
Date

~~Rafic Pierre Sékaly~~

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

~~Martin Hirsch~~

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

Cécile Tremblay

Coauteur _____ Signature _____ Date _____

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Geneviève Bélanger Jasmin
M.Sc. Microbiologie et immunologie

2. Description de l'article

Liste des auteurs: Geneviève Bélanger Jasmin, Sylvie Beaulieu, Rachid Boulassel, Annie Chamberland, ~~Rafael Dinero Sábido~~, ~~Martin Hirsch~~ et Cécile Tremblay.

Titre de l'article: Characterization of HIV-1 entry inhibitors interactions in an in vitro model of dendritic cells

L'article est en phase final de préparation.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que *Geneviève Bélanger Jasmin* inclut cet article dans son *mémoire de maîtrise* qui a pour titre *Caractérisation des interactions d'inhibiteurs de l'entrée du VIH dans un modèle de cellules dendritiques in vitro*.

Sylvie Beaulieu

Coauteur

Signature

22/12/2003

Date

Rachid Boulassel

Coauteur

Signature

Date

Annie Chamberland

Coauteur

22/12/2003

Date

Éric Cohen

Coauteur

Signature

Date

~~Rafael Dinero Sábido~~

Coauteur

Signature

Date

~~Martin Hirsch~~

Coauteur

Signature

Date

Cécile Tremblay

Coauteur

03/12/22

Date