

ALEXIS DANYLO

**IMPACT DU STADE DE MATURATION DE LA
MOLÉCULE CELLULAIRE HLA-DR SUR SON
INCORPORATION DANS LE VIRUS
D'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE-1**

Mémoire présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-Immunologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

Résumé

La molécule HLA-DR du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) est fortement incorporée dans l'enveloppe virale du virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). L'expression à la membrane cytoplasmique de cette même molécule est modulée à la baisse par la protéine virale Nef. D'autre part, Nef augmente l'expression de la chaîne invariante CD74, une autre protéine du CMH-II associée avec HLA-DR dans un complexe protéique immature. D'autres protéines accessoires virales, telles Vpu, interagissent avec le CMH-II. Vpu diminue l'expression de HLA-DR et interagit avec la portion intracellulaire de CD74. Cette étude a pour but de vérifier si les complexes immatures de CMH-II sont incorporés dans l'enveloppe virale du VIH-1. Elle veut aussi vérifier l'impact de la présence de Nef et de Vpu sur l'incorporation du CMH-II. La modulation à la baisse de HLA-DR et l'augmentation d'expression de CD74 induite par Nef ont été confirmées à la surface de lymphocytes T CD4+. La molécule CD74 représentant un complexe de CMH-II immature ne semble pas être incorporée dans l'enveloppe virale, peu importe la présence ou l'absence de Nef et de Vpu lors de l'infection. La présence de Nef ne semble pas influencer l'incorporation de HLA-DR qui demeure toujours fortement incorporée. Vpu semble important pour l'incorporation du HLA-DR, puisqu'un virus sans Vpu incorpore nettement moins de HLA-DR. Un mutant déficient en phosphorylation sur deux sérines de Vpu, pour sa part, semble permettre une incorporation partielle de cette même molécule. Ces résultats semblent indiquer que HLA-DR est incorporée selon son stade de maturation et que Vpu est essentielle à l'incorporation de HLA-DR.

Abstract

The HLA-DR of major histocompatibility complex class II (MHC-II) is strongly incorporated within the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope. The cell surface expression of this molecule is down modulated by the viral Nef protein. Moreover, Nef increases the expression of the invariant chain CD74, another MHC-II protein, associated with HLA-DR in an immature protein complex. Other viral accessory proteins, such as Vpu, interact with MHC-II. Vpu decreases the expression of HLA-DR and interacts with the intracellular portion of CD74. This study was aimed to verify whether the MHC-II immature complexes are incorporated within the viral envelope. We also verified the impact of the presence of Nef and Vpu on the incorporation of MHC-II. The down modulation of HLA-DR and up modulation of CD74 on the cell surface induced by Nef has been verified on the surface of CD4 + T lymphocytes. The results were similar to those already described. The CD74 molecule, which represents a MHC-II immature complex, does not appear to be incorporated within the viral envelope, regardless of the presence or absence of the Nef and Vpu during the infection. The presence of Nef does not appear to influence the incorporation of HLA-DR, which is still strongly incorporated. Vpu appears to be important for the incorporation of HLA-DR, while a phosphorylation mutant on two serine residues of Vpu appears to allow a partial incorporation of this later molecule. HLA-DR does not seem incorporated in the absence of Vpu. These results suggest that mature HLA-DR is selectively incorporated within emerging HIV-1 particles and that Vpu is essential for incorporation of HLA-DR.

Avant-propos

La réalisation de ce travail est exigeante et le support de plusieurs personnes a été essentiel à cet accomplissement. Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Michel J. Tremblay pour m'avoir accepté dans son équipe malgré mon curriculum particulier. Je veux souligner sa patience exceptionnelle face à mes horaires compliqués, son positivisme et sa passion profonde pour la science.

Je tiens aussi à remercier le Dr Réjean Cantin pour m'avoir enseigné les techniques de laboratoire, les bonnes méthodes de réflexion scientifique, pour ses conseils tout au long de l'évolution de ce projet et pour la prélecture de ce mémoire. Merci aux membres de l'équipe pour toutes nos discussions sur la science et pour m'avoir aidé à bien comprendre la recherche fondamentale.

Je tiens à remercier la faculté de médecine de l'université Laval pour m'avoir permis de participer au programme MD / M.Sc. et pour le soutien financier qu'elle m'a procuré durant ma maîtrise.

Enfin, je souhaite remercier ma famille et surtout ma conjointe, Natacha Sélesse, pour ses encouragements constants, sa patience et sa compréhension face au défi que représente la rédaction d'un mémoire simultanément à la progression de mes études de médecine.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Avant-propos	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction.....	1
1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine	2
1.1 Historique de l'épidémie.....	2
1.2 Épidémiologie.....	3
1.3 Pathogénèse	4
1.3.1 La phase aiguë	4
1.3.2 La phase de latence	6
1.3.3 La phase SIDA.....	7
1.4 Structure du VIH-1	8
1.4.1 Le génome du VIH-1	9
1.4.2 Les protéines accessoires du VIH-1.....	10
1.5 Cycle réplcatif du VIH-1	13
1.5.1 L'adhésion et l'entrée	13
1.5.2 La décapsidation et la transcription inverse.....	13
1.5.3 La transcription et la traduction.....	15
1.5.4 L'assemblage, le bourgeonnement et la maturation	15
2. Incorporation.....	18
2.1 Mécanisme d'incorporation	18
2.2 Rôle et fonction des molécules incorporées	20
3. Système immunitaire	22
3.1 Rappel immunologique.....	22
3.2 Présentation antigénique par le CMH-II.....	23
3.2.1 HLA-DR et CD74 (chaîne invariante).....	23
3.2.2 Trafic du CMH-II.....	24
3.2.3 Interaction TCR et CMH-II	27
4. Le VIH-1 et le CMH-II.....	28
4.1 Modulation par Nef de la présentation antigénique par le CMH-II.....	28
4.2 Interaction entre le CMH-II et Vpu	29
4.3 Incorporation des protéines du CMH-II.....	29
5. Problématique, hypothèse et objectif de recherche	31
6. Matériels et méthodes	32
6.1 Construction provirale et Clonage	32
6.2 Cellule.....	32
6.2.1 Lignée cellulaire (293T et Raji-CD4).....	32
6.2.2 Lymphocytes T CD4 ⁺ primaires	33
6.3 Production virale et infection cellulaire.....	33
6.3.1 Transfection calcium-phosphate des cellules 293T	33

6.3.2 Infection de Raji-CD4.....	33
6.3.3 Infection de lymphocytes T CD4+ et production virale	34
6.4 Anticorps.....	34
6.5 Mesure de la charge virale	35
6.6 Immunocapture	35
6.6.1 Immunocapture en plaque 96 puits	35
6.6.2 Immunocapture avec billes magnétiques	36
6.7 Cytométrie de flux	37
7. Résultats.....	38
7.1 Modulation de HLA-DR et CD74 par Nef	38
7.1.1 Modulation de l'expression membranaire de HLA-DR par Nef	38
7.1.2 Modulation de l'expression membranaire de CD74 par Nef.....	40
7.2 Incorporation de CD74 dans l'enveloppe virale	42
7.3 Incorporation de HLA-DR et de CD74 lors d'une infection déficiente en Nef.....	44
7.3.1 Virus produit à partir d'infection de Raji-CD4.....	45
7.3.2 Virus provenant d'infection de lymphocytes T CD4+ primaires	46
7.4 Incorporation de HLA-DR et de CD74 lors d'une infection déficiente en Vpu.....	49
8. Discussion.....	52
8.1 Nef module l'expression de HLA-DR et de CD74 à la surface des cellules infectées	53
8.2 Les complexes immatures de CMH-II ne sont pas incorporés dans l'enveloppe virale	54
8.3 Nef n'influence pas l'incorporation des composantes du CMH-II dans l'enveloppe virale	56
8.4 Vpu joue un rôle dans le processus d'incorporation de HLA-DR.....	57
Conclusion	59
Bibliographie	60

Liste des tableaux

Tableau 1 : Molécules membranaires incorporées et leurs ligands naturels.....	21
Tableau 2 : Modulation de HLA-DR par Nef pour chaque donneur	40
Tableau 3 : Modulation de CD74 par Nef pour chaque donneur.....	42
Tableau 4 : Charge virale mesurée en ng/mL de P24 pour différentes productions virales .	50

Liste des figures

Figure 1 : Épidémiologie du SIDA	3
Figure 2 : Déplétion immunitaire du système digestif.....	5
Figure 3 : Marqueur de l'évolution de l'infection	7
Figure 4 : Sarcome de Kaposi.....	8
Figure 5 : Organisation génomique du VIH-1 et morphologie d'un virus mature	12
Figure 6 : Cycle de réplication du VIH-1	17
Figure 7 : Mécanisme potentiel de l'incorporation des molécules de l'hôte	19
Figure 8 : Structure de CD74 et du complexe CMH-II immature	24
Figure 9 : Trafic du CMH-II.....	26
Figure 10 : Modulation de l'expression membranaire de HLA-DR par Nef.....	40
Figure 11 : Modulation de l'expression membranaire de CD74 par Nef	42
Figure 12 : Incorporation de CD74 dans l'enveloppe virale	44
Figure 13 : Incorporation de HLA-DR et de CD74 lors d'infection de Raji-CD4 avec ou sans Nef.....	46
Figure 14 : Incorporation de HLA-DR lors d'infection de lymphocytes T CD4+ primaires avec ou sans Nef	48
Figure 15 : Incorporation de HLA-DR et de CD74 lors d'infections déficientes en Vpu	50

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CA	Capside
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CCR	<i>Chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CTLA	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen</i>
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagles medium</i>
Dr	Docteur
ER	Réticulum endoplasmique (<i>endoplasmic reticulum</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Gag	<i>Group-specific-antigen</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Gp	Glycoprotéine
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HCMV	<i>Human cytomegalovirus</i>
HHV	<i>Human herpes virus</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
H ₃ PO ₄	Acide phosphorique
HSA	<i>Heat stable antigen</i>
HTLV	Virus T-lymphotropique humain (<i>Human T-lymphotropic virus</i>)

ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
Ii	<i>Invariant chain</i>
IL	Interleukine
IN	Intégrase
LAV	<i>lymphadenopathy-associated virus</i>
LFA	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LTC	Lymphocyte T cytotoxique
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MA	Matrice
MD	Doctorat en médecine
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MVB	<i>Multi-vesicular body</i>
NC	Nucléocapside
Nef	<i>Negative regulation factor</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
ONUSIDA	Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered salt solution</i>
PE	Phycoérythrine
PHA	Phytohémagglutinine
PICs	Complexe de préintégration (<i>pre-integration complex</i>)
PR	Protéase virale
Rev	<i>Regulator of viral expression</i>
RPMI	<i>Rossmann-Park-Memorial-Institute medium</i>
RT	Transcriptase inverse (<i>reverse transcriptase</i>)
RTC	Complexe de transcription-inverse (<i>reverse transcription complex</i>)
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
Tat	<i>Transactivator</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>

TMB-S	Tetramethylbenzidine substrate
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VLA	<i>Very late antigen</i>
Vpr	<i>Viral protein R</i>
Vpu	<i>Viral protein U</i>

Introduction

L'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH) cause l'une des pandémies les plus importantes de l'histoire de l'humanité. Le nombre croissant de personnes atteint ainsi que le nombre important de décès attribuables à cette infection partout à travers le monde en fait foi. La lutte contre le VIH demande la concertation des spécialistes de tous les domaines et doit avoir pour objectif de déterminer les éléments clés de la pathogenèse de cette infection. La relation entre le virus et le système immunitaire ainsi que la relation entre le virus et la cellule hôte ont une importance capitale puisqu'elles sont à la base de phénomènes biologiques qui vont mener à l'immunodéficience et à l'évasion virale. La compréhension détaillée de ces phénomènes est donc prioritaire à la lutte contre le VIH.

Les cellules cibles du VIH sont des cellules essentielles à l'élaboration d'une réponse immunologique efficace. En les prenant pour cible, le VIH affecte considérablement ce système. En bourgeonnant des cellules infectées, le virus incorpore dans son enveloppe plusieurs molécules. Certaines de ses molécules, comme HLA-DR, jouent physiologiquement un rôle clé dans la réponse immunitaire. Une fois incorporée, la molécule HLA-DR est toujours fonctionnelle et pourrait continuer à interagir avec différents constituants du système immunitaire. Plusieurs protéines du VIH semblent influencer l'expression de HLA-DR à la surface des cellules infectées. Cette étude est centrée sur le mécanisme menant à l'incorporation de la protéine HLA-DR dans l'enveloppe du VIH ainsi qu'aux différents facteurs pouvant influencer cette incorporation.

1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

1.1 Historique de l'épidémie

En 1981, en Californie, on remarque l'apparition d'un syndrome inconnu chez les membres de la communauté homosexuelle qui se présente par la survenue répétée d'infections opportunistes, évoluant vers la mort [1]. La lymphopénie marquée par le faible niveau de lymphocytes T CD4+ circulants de ces patients évoque une dysfonction inexplicée du système immunitaire d'où le nom de syndrome d'immunodéficience acquise. On pense alors qu'une infection virale pourrait causer cette immunodéficience, car la maladie est transmise par les relations sexuelles non protégées et par les contacts sanguins. Les premiers cas de transmission hétérosexuelle sont rapidement décrits rendant toute la population vulnérable [2]. En 1983, l'équipe du Dr Luc Montagnier de l'institut Pasteur en France isole un rétrovirus qu'il nomme lymphadenopathy-associated virus (LAV) [3]. C'est en 1986 que l'Organisation mondiale de la santé nomme ce même virus VIH (virus d'immunodéficience humaine) en raison du syndrome qu'il provoque. Rapidement, l'identification des structures protéiques du virus et la compréhension de son cycle répliatif permettent la mise au point de tests de dépistage et d'agents antirétroviraux visant à stabiliser la progression de la maladie. Par des cocktails ne contenant pas moins que 3 types d'antirétroviraux, cette maladie mortelle est maintenant devenue une maladie chronique incurable pour les personnes ayant accès au traitement.

L'origine du VIH est encore incertaine. Sa ressemblance avec le VIS (Virus d'Immunodéficience Simienne) soulève l'hypothèse qu'il provienne des grands singes d'Afrique [4]. Le SIV est un virus très répandu chez les grands singes causant un syndrome similaire. Le VIH serait donc un VIS s'étant adapté à l'homme. Il est fort probable que ce soit lors de la chasse au singe, par l'exposition à du sang contaminé, que ce virus ait entré en contact avec l'être humain. Certains l'ont même classé dans les zoonoses au début de l'épidémie, mais la transmission entre humains exclut cette possibilité [5]. En 1985, une seconde classe de VIH est isolée, le VIH-2; cette classe est toutefois moins pathogène que le VIH-1. Le VIH-2 provient vraisemblablement d'un VIS différent de celui du VIH-1 [6].

1.2 Épidémiologie

L'épidémie du VIH est l'une des causes de mortalité les plus importantes à l'échelle mondiale. Selon le Rapport sur l'épidémie mondiale de sida 2008 de l'ONUSIDA [7], parue en août 2008, on estime à 33 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH en 2007 et le nombre annuel de nouvelles infections (incidence) est estimé à 2,7 millions. Ces dernières données semblent montrer que la prévalence de l'infection avec le VIH s'est stabilisée depuis 2000. Cette stabilisation de l'épidémie est due à la mise en place dans de nombreux pays de programmes de prévention et d'accès au traitement. Cependant, le nombre total de personnes vivant avec le VIH continue d'augmenter avec la croissance démographique, étant donné le nombre de nouvelles infections et les effets bénéfiques des thérapies antirétrovirales qui sont plus largement disponibles et permettent au patient de survivre plus longtemps. La figure 1 montre la distribution au niveau mondial de l'infection avec le VIH.

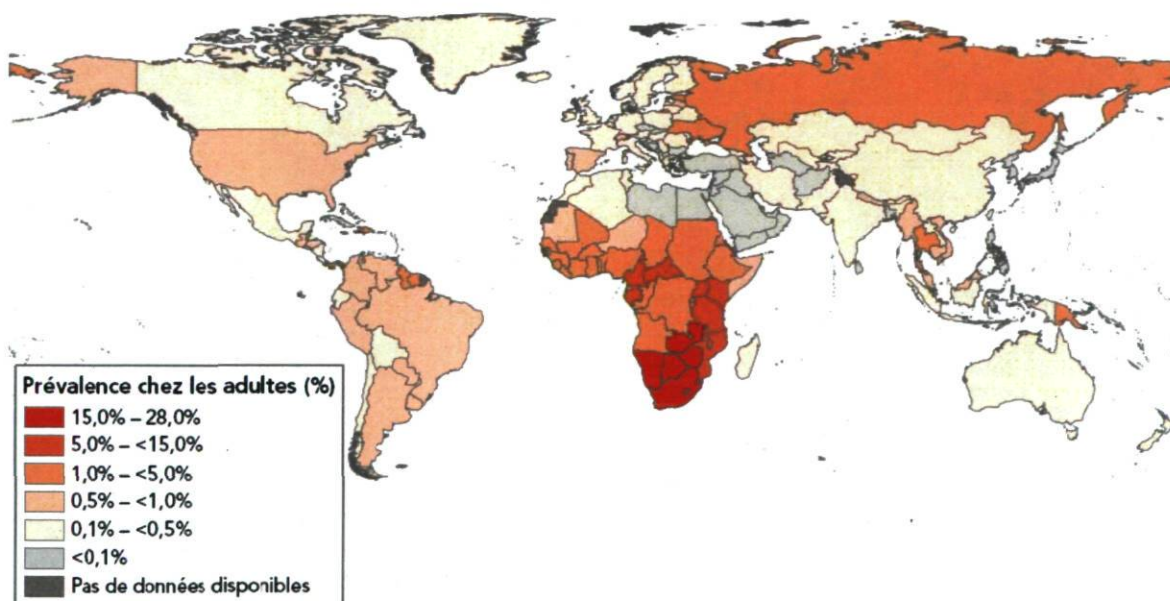


Figure 1 : Épidémiologie du SIDA
Prévalence de l'infection avec le VIH dans le monde
Rapport ONUSIDA 2008 [7]

L'Afrique subsaharienne est la région la plus durement touchée par le VIH. Elle représente 67% du total de personnes infectées et 72% des décès dus au sida en 2007. En dehors de l'Afrique, la prévalence de l'infection est en hausse dans plusieurs pays. Au Canada, selon

l'agence de santé publique, le nombre de personnes vivant avec l'infection à VIH en 2005 était d'environ à 58 000. Pour cette même année, l'incidence est estimée entre 2300 et 4500 [8].

1.3 Pathogénèse

Le VIH-1 se transmet principalement par contact sanguin et par l'échange de différents fluides corporels comme le sperme, les sécrétions vaginales et le lait maternel. Les principaux modes de transmission sont les rapports sexuels non protégés avec pénétration vaginale, anale; les échanges sanguins, notamment par l'intermédiaire d'une seringue; et la transmission mère-enfant pendant la grossesse et l'allaitement. Ainsi, les groupes le plus à risque sont les consommateurs de drogues injectables, les homosexuels et les professionnel(le)s du sexe [7, 9].

L'histoire naturelle de l'infection au VIH-1 comporte 3 phases durant lesquelles les manifestations tant cliniques que biologiques diffèrent : une phase aiguë, une phase de latence clinique et la phase SIDA [9].

1.3.1 La phase aiguë

Pendant les premières semaines de l'infection avec le VIH-1, une bonne proportion des personnes atteintes présentent des symptômes grippaux tels la toux, la fatigue, la fièvre et des céphalées [9]. Bien que la charge virale dans le sang soit très élevée durant cette première phase, la présentation clinique n'est guère inquiétante et l'infection passe souvent inaperçue. Au niveau cellulaire cependant, les répercussions sont majeures. L'infection entraîne une déplétion importante des lymphocytes T CD4+ mémoire présents dans les plaques de Payer de la muqueuse intestinale, avec un tropisme préférentiel pour les lymphocytes T CD4+ CCR5+ [10, 11]. Ces plaques contiennent les principales réserves de lymphocytes T mémoire de l'organisme. Cette injure à la muqueuse digestive permet une translocation vers le sang des microorganismes de la flore digestive et maintient ainsi l'activation du système immunitaire [12]. La figure 2 illustre la déplétion intestinale en lymphocytes.

Bien que la quantité totale de lymphocytes T CD4+ chute radicalement durant cette première phase, le niveau de lymphocytes T CD4+ circulants, grâce à une lymphopoïèse

active et à l'activation du système immunitaire, demeure malgré tout dans les limites de la normale. Ironiquement, cette même activation du système immunitaire entretient la population de cellules cibles du VIH, soit les lymphocytes T CD4+, et permet à l'infection de persister.

Une réponse immunitaire spécifique contre le VIH-1, tant cellulaire qu'umorale, se produit précocement dans l'évolution de la maladie. C'est cependant principalement la réponse immunitaire cellulaire qui permet une diminution significative de la charge virale [13, 14]. Contrairement aux autres infections virales, le système immunitaire n'arrive pas à éliminer totalement le virus de l'organisme puisque ce dernier peut infecter de façon latente les lymphocytes T CD4+ et certaines cellules présentatrices d'antigène (CPA) tels le macrophage et la cellule dendritique [15]. Le virus échappe ainsi au système immunitaire et l'infection persiste.

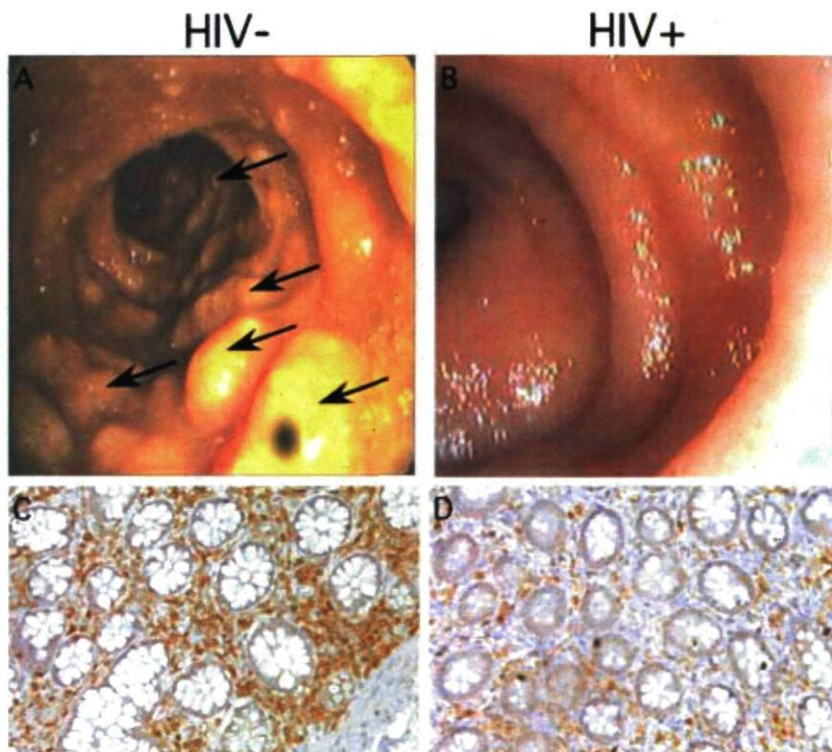


Figure 2 : Déplétion immunitaire du système digestif (image tirée de [10])
Image endoscopique pré et post acquisition du VIH (A et B)
Coloration immunohistologique du CD4 d'un ganglion lymphatique iléal

1.3.2 La phase de latence

Durant cette phase qui s'échelonne plusieurs années, l'infection est cliniquement asymptomatique. La charge virale est très basse et rarement détectable en p24, mais la réplication virale est très importante dans les organes lymphoïdes. La présence du VIH provoque une diminution progressive de la quantité de lymphocytes T CD4+ [9]. L'effet cytopathique direct de l'infection et la cytolyse induite aux cellules infectées par le lymphocyte T cytotoxique (LTC) expliquent en partie cette diminution. Cependant, seulement une faible proportion des lymphocytes T CD4+ est infectée par le VIH.

C'est la sénescence répllicative (ou mort par division excessive) qui est la cause principale de la mort lymphocytaire [16]. L'activation chronique du système immunitaire à l'origine de ce phénomène est provoquée principalement par la translocation microbienne au travers de la muqueuse digestive qui entretient continuellement une activation des cellules immunitaires digestives [10]. La présence même du VIH-1 contribue aussi à ce phénomène [17]. L'induction de l'apoptose et de l'état inflammatoire par des facteurs circulants, des protéines virales et par la liaison de l'enveloppe virale au récepteur CD4 en sont des exemples. Une dégénérescence des organes lymphoïdes s'en suit et permet une augmentation parallèle de la virémie. Les LTC, pour leur part, se maintiennent à des niveaux élevés jusqu'à la chute du système immunitaire, qui marque le début de la phase SIDA. La figure 3 illustre la relation entre la charge virale, la quantité de lymphocytes T CD4+ et de lymphocytes T cytotoxiques CD8+, ainsi que taux d'anticorps anti-VIH durant les différentes phases de l'infection.

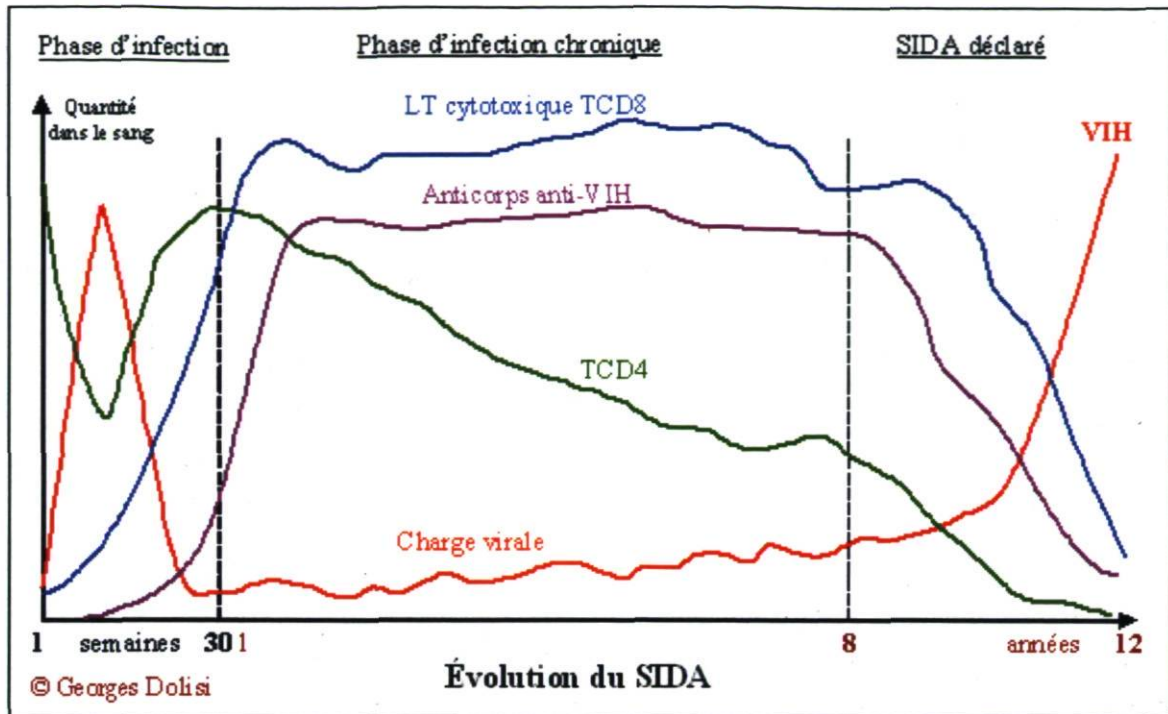


Figure 3 : Marqueur de l'évolution de l'infection

Adaptée de : http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_evolution.htm,

Consulté le 5 octobre 2009

1.3.3 La phase SIDA

La phase SIDA est marquée par la destruction des organes lymphoïdes. L'incapacité de l'organisme à régénérer les cellules immunitaires fait chuter le nombre des lymphocytes T CD4+ à des niveaux très bas, sous la barre des 200 cellules par microlitre de sang [9]. Les LTC ne sont plus en mesure d'accomplir leur tâche cytotoxique et la virémie augmente substantiellement. Le système immunitaire, incompetent, permet à de nombreux pathogènes dits opportunistes de s'installer et d'infecter l'individu. Classiquement, les malades peuvent présenter des pneumonies atypiques à *Pneumocystis jirovecii* et même des sarcomes de Kaposi due à l'infection par *HHV8* [9]. La figure 4 présente des sarcomes de Kaposi sur la peau d'un individu infecté avec le VIH ayant atteint la phase SIDA.



Figure 4 : Sarcome de Kaposi

Adaptée de : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kaposi's_Sarcoma.jpg,

Consulté le 5 octobre 2009

Les traitements actuels regroupent différents agents permettant de ralentir la progression de la maladie en limitant la réplication virale : ce sont les antirétroviraux. Ils ne permettent pas l'élimination de la maladie et sont même associés à une augmentation de la morbidité associée à l'infection par le VIH. L'aboutissement final demeure le même. On doit utiliser plusieurs de ces agents en combinaison pour prévenir l'émergence de résistance. Des essais ont été tentés pour produire un vaccin, mais cette avenue est difficile puisque pour être efficace, elle devrait allouer une immunité cellulaire ayant un délai d'action rapide. Plusieurs protéines et combinaisons ont été envisagées [18-21].

1.4 Structure du VIH-1

Le VIH-1 est un virus à ARN de la famille des *retroviridae* et de genre *lentivirinae*. Les rétrovirus sont des virus à ARN qui insèrent leur bagage génétique sous forme d'ADN dans le génome de la cellule hôte. Ils sont divisés en 2 catégories : le rétrovirus à génome simple et les rétrovirus à génome complexe. Parmi les rétrovirus à génome simple, on trouve ceux de genre alpha, bêta, gamma et epsilon. Les lentivirus, deltavirus et spumavirus sont les rétrovirus à génome complexe [22, 23]. Le nom lentivirus vient du type d'infection que ces virus produisent et veut dire "virus lent". Les lentivirus produisent des infections avec une longue période d'incubation, à évolution lente et progressive, incurable, induisant

l'immunodéficience ou des maladies immunitaires. Ces virus sont exogènes et non-oncogéniques. Ils peuvent être en latence dans la cellule infectée et mènent ultimement à la mort.

Les rétrovirus à génome simple sont composés de trois gènes uniquement, alors que les rétrovirus à génome complexe comportent, en plus de ses trois gènes, une panoplie de gènes accessoires [22]. Les trois gènes communs à tous les rétrovirus, *gag*, *pol* et *env*, codent pour les protéines essentielles à la structure du virion. Les gènes accessoires, chez les lentivirus, codent pour une multitude de protéines qui servent à augmenter l'expression des gènes viraux et augmenter l'infectivité; ils contribuent à la pathogenèse des lentivirus. Ces protéines accessoires ne sont pas impliquées dans la structure du virion. Le génome des lentivirus possède à chaque extrémité un LTR (long terminal repeat) contenant toute l'information essentielle à l'initiation et l'arrêt de la transcription du génome viral. Il contient les sites de liaison des différents facteurs de transcription [22].

1.4.1 Le génome du VIH-1

En plus des trois gènes de structure, le génome du VIH-1 code pour six gènes accessoires : *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*, *vif* et *vpr* (figure 5)[24, 25]. Le rôle joué par ces gènes est décrit plus loin. Le gène d'enveloppe *env* du VIH code pour deux protéines, la gp120 et gp41. La gp120 est responsable de l'attachement du virus à la cellule par son interaction avec le récepteur CD4. La gp41 est responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique de la cellule. Les gènes *gag* et *pol* permettent la production d'une polyprotéine précurseur Gag-Pol. Ce précurseur, clivé lors de la maturation, produit les trois enzymes virales : la protéase, l'intégrase et la transcriptase inverse [26]. La transcriptase inverse transcrit l'ARN viral monocaténaire en ADN. Elle est peu précise et génère beaucoup de mutations lors de ce processus. Elle possède une activité ARNase permettant l'élimination de l'ARN une fois le premier brin d'ADN formé, facilitant la production du brin complémentaire d'ADN. L'intégrase catalyse l'insertion de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte. La protéase est responsable de la maturation des particules virales en clivant les différentes protéines précurseurs. Le gène *gag*, seul, produit aussi une polyprotéine. Cette dernière, clivée par la protéase virale, permet la production de 6 protéines structurales : la matrice (p17), la capsid (p24), la nucléocapsid (p7), p6, p2 et

p1 [27, 28]. Le génome du VIH-1, ainsi que la structure d'un virion mature sont détaillés à la figure 5.

L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique provenant de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée. Les protéines d'enveloppe gp120 et gp41 y sont insérées. La matrice (p17), tapisse la paroi interne de l'enveloppe. La protéine p24 forme la capsid, capsule protectrice, contenant les deux séquences identiques d'ARN viral. Les trois enzymes nécessaires à la réplication virale se retrouvent aussi au sein de la capsid [26].

1.4.2 Les protéines accessoires du VIH-1

Les protéines accessoires du VIH-1 ne sont pas des composantes de la structure du virion, mais contribuent fortement au cycle réplcatif en augmentant le taux de réplication et en augmentant l'infectivité du virus [24, 28]. Certaines ont aussi pour rôle de moduler la réponse immunitaire [25]. La protéine Tat (transactivator) augmente la transcription du génome viral en augmentant l'efficacité des polymérase. Elle augmente la production d'ARNm viral d'environ 100 fois. Rev (regulation of viral expression) transporte les ARNm viraux tardifs pleine longueur du noyau vers le cytoplasme. Elle permet à l'ARN d'arriver non clivé pour être inséré dans le virion. La protéine Vif (viral infectivity factor) antagonise les facteurs de restriction APOBEC-3G et APOBEC-3F empêchant la désamination de l'ADN viral [29, 30]. Vpr (viral protein R) participe au transport de l'ADN viral vers le noyau cellulaire. Elle peut aussi induire un arrêt du cycle cellulaire en G2, permettant une production soutenue de virions.

La protéine Nef a initialement été décrite comme un facteur négatif de l'infectivité (negative factor). Aujourd'hui, on sait qu'elle favorise plutôt l'infectivité et la réplication virale [31-33]. Nef interagit avec plusieurs voies de signalisation cellulaire permettant une augmentation de l'infectivité de 5 à 20 fois [34-36]. Nef augmenterait aussi l'activation cellulaire de la cellule infectée [37, 38]. Certains groupes proposent que Nef favorise le bourgeonnement au travers des radeaux lipidiques et augmente l'infectivité du virion [39]. Nef est connue pour simuler l'activation cellulaire via le récepteur des cellules T (TCR) en activant les voies de signalisation normalement induite par ce récepteur [34]. Nef, est exprimée en abondance durant les phases précoces de l'infection au VIH. Son ARNm est

estimé à trois quarts de la charge cellulaire précoce d'ARNm viral. Nef est connue pour moduler l'expression de plusieurs protéines membranaires de la cellule. Entre autres, Nef diminue l'expression du CD4, du CMH-I et du CMH-II à la surface des cellules infectées, permettant ainsi à ces cellules d'échapper à la réponse immunitaire cellulaire [34, 40-43]. Vpu (viral protein U) contribue à la pathogénèse par différents mécanismes [29, 44, 45]. Cette protéine permet la dégradation du CD4 dans le réticulum endoplasmique. Dans ce compartiment, le CD4 interagit avec les glycoprotéines Env nouvellement synthétisées et les empêche de transiter vers le site d'assemblage viral. Vpu, par la phosphorylation des sérines 52 et 56 recrute la machinerie nécessaire à l'ubiquitination de CD4 et à sa dégradation dans le protéasome [46, 47]. Vpu favorise de façon concomitante le transport de CA vers le site d'assemblage [48]. Vpu joue aussi un rôle important dans la pathogénèse en inhibant un facteur de restriction, la tetherine (CD317)[49, 50]. Cette molécule de surface a une activité antivirale. Elle inhibe le relargage de plusieurs virus enveloppés et les maintient à la surface cellulaire [51]. Dans certains types cellulaires, elle est exprimée de façon constitutive, mais dans d'autres elle peut être induit par l'interféron- α . Vpu colocalise avec cette protéine et inhibe son effet, permettant le relargage de virions matures malgré l'expression de CD317 [49]. Ce phénomène requiert la portion N-terminal hydrophobe de Vpu qui n'est pas dépendante de la phosphorylation [52, 53]. Vpu diminue l'expression de surface du CMH-I, ce qui protège les cellules infectées des lymphocytes T cytotoxiques [54]. Des interactions entre Vpu et le CMH-II ont aussi été décrites. Les interactions des protéines Nef et Vpu avec le CMH-II sont décrites à la section 4.

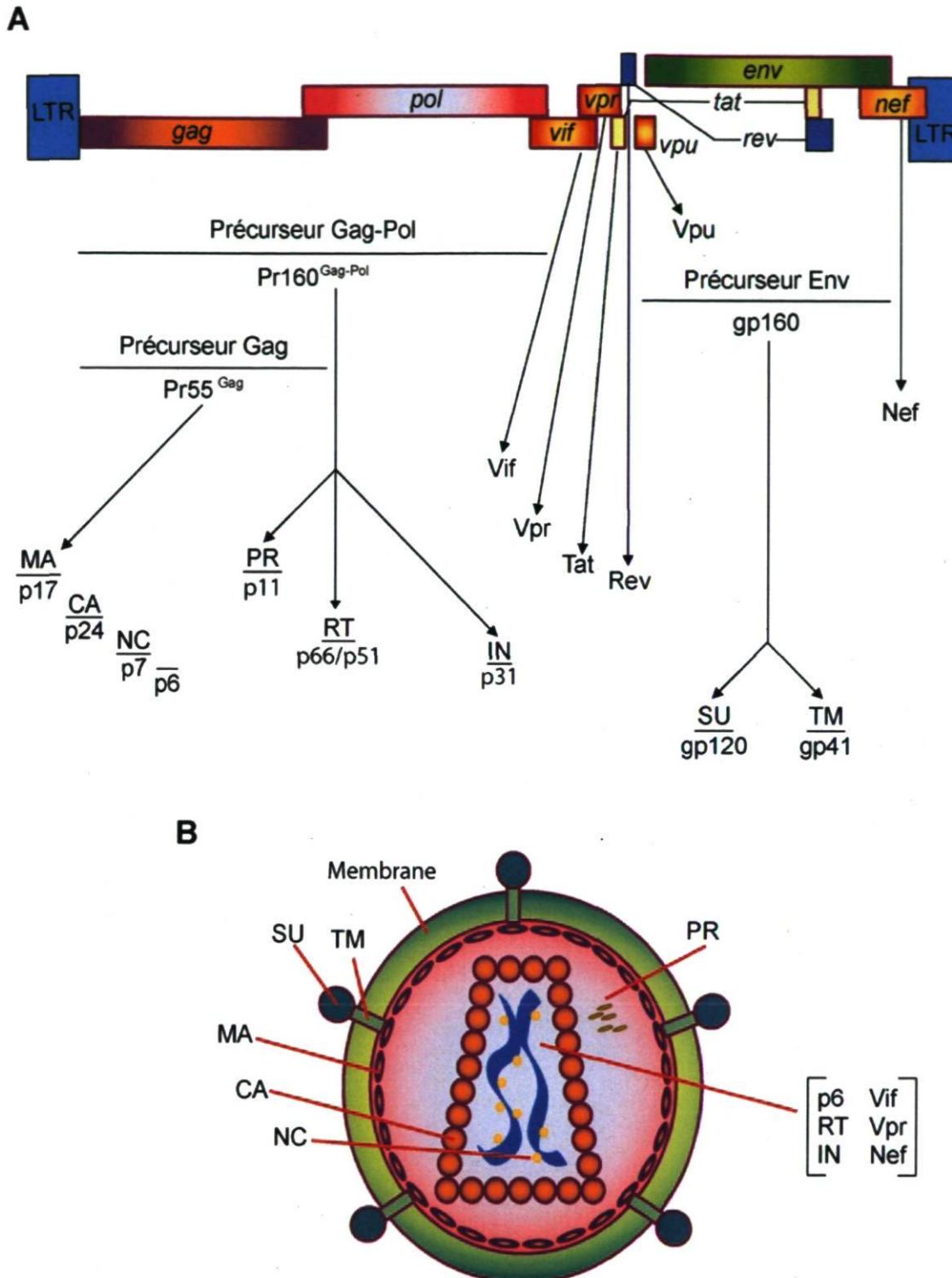


Figure 5 : Organisation génomique du VIH-1 (A) et morphologie d'un virus mature (B)

SU (protéine de surface ou gp120), TM (protéine transmembranaire ou gp41), MA (matrice ou p17), CA (capside ou p24), NC (nucléocapside ou p7), PR (protéase), IN (intégrase), RT (transcriptase inverse), Vif (*Viral infectivity factor*), Vpr (*Viral protein R*), Nef (*Negative factor*).

1.5 Cycle répliatif du VIH-1

1.5.1 L'adhésion et l'entrée

La première étape du cycle répliatif du VIH-1 est l'adhésion de la particule virale à la surface de la cellule cible. Cette adhésion se fait à l'aide de diverses molécules présentes sur l'enveloppe virale. Ces dernières dirigent le virus à la surface de la cellule cible grâce à une interaction spécifique pour l'attachement. Cette interaction, spécifique pour l'attachement, ce produit entre la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 et la protéine cellulaire CD4 [55]. La glycoprotéine gp120 est présente à la surface virale sous forme de trimère en association avec la gp41. La liaison initiale entre le CD4 et la gp120 permet un changement de conformation, autant pour le CD4 que pour la gp120, et permet le recrutement du corécepteur cellulaire. Cette liaison du corécepteur cellulaire, CCR5 ou CXCR4, modifie de nouveau la forme de la gp120 qui se dissocie de la gp41. Une fois dissociée, la gp41 acquiert sa conformation fusogénique et s'insère dans la membrane cible [55]. Ceci permet la fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire et l'entrée du corps viral dans le cytoplasme. Il semble que cette étape soit l'étape limitante de l'entrée virale. Le CCR5 et le CXCR4 sont des récepteurs de chimiokines présents sur les cellules immunitaires. Le CCR5 est présent principalement sur les lymphocytes T CD4+ mémoires et sur les macrophages [56, 57]. On le retrouve fortement dans les muqueuses où il serait exprimé sur plus de 50% des lymphocytes T [58]. Le CXCR4, pour sa part, est présent sur un plus vaste ensemble de cellules immunitaires. On le retrouve particulièrement dans les lymphocytes T naïfs [56]. L'utilisation de ces deux récepteurs explique que le VIH-1 infecte principalement les lymphocytes T CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques. La capacité de la gp120 virale à interagir avec l'un de ces deux corécepteurs dictera le tropisme viral. Un virion ayant une gp120 interagissant principalement avec le corécepteur CCR5 sera dit de tropisme R5 alors qu'un ayant le CXCR4 comme corécepteur principal sera de tropisme X4 [11].

1.5.2 La décapsidation et la transcription inverse

Une fois le virus à l'intérieur de la cellule cible, la capsid est dégradée de façon partielle et progressive. C'est la décapsidation et la formation du complexe de transcription inverse

(RTCs), puis du complexe de préintégration (PICs). Les PICs sont composées de matériel viral et de composantes cellulaires [59]. Les études n'ont pas encore permis de déterminer clairement l'apport des composantes cellulaires à ces complexes. Dès que s'initie la dégradation de la capsid, l'enzyme virale transcriptase inverse (RT), présente dans les complexes, génère de l'ADN double brin à partir de l'ARN viral par un processus complexe. Cette RT était présente à même la capsid sous une forme inactive et est activée par la décapsidation. La distinction entre les RTCs et les PICs est subtile au sens où ils font partie du même continuum progressif et que les PICs sont définis comme compétents à l'intégration; la transcription inverse n'étant pas complétée dans les RTCs. La plupart des études montrent que le complexe de préintégration contient la protéase virale (PR), l'intégrase (IN) et la protéine accessoire Vpr en plus de la RT et du matériel génétique viral. Le PICs s'associe au cytosquelette, principalement aux microtubules, pour cheminer vers le noyau. Une fois arrivés à la membrane nucléaire, plusieurs éléments viraux semblent interagir avec des récepteurs de transport nucléocytoplasmique pour permettre la translocation du matériel génétique viral vers l'intérieur du noyau. Ce processus de transport actif permet au VIH-1 d'infecter des cellules latentes, qui ne sont pas en mitose active, comparée à beaucoup d'autres rétrovirus qui doivent attendre la mitose cellulaire pour entrer dans le noyau. Une fois dans le noyau, l'intégrase (IN) insère l'ADN viral dans le matériel génétique de la cellule cible pour former le provirus. Le choix du site d'intégration est un processus complexe où plusieurs protéines virales et cellulaires interviennent et l'IN semble jouer un rôle majeur dans ce choix [59]. L'ADN viral est intégré de façon préférentielle dans les gènes hautement transcrits par l'ARN Polymérase II cellulaire. L'IN doit catalyser 2 réactions distinctes pour permettre l'intégration covalente de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule cible. En premier, l'IN catalyse un clivage endonucléotique à chaque extrémité de l'ADN viral, connu sous le nom de «3'-processing», résultant en l'élimination d'un dinucléotide de chaque extrémité. L'ADN clivé sert ensuite de substrat pour le transfert de bande (strand transfert) où l'IN catalyse de façon simultanée, à chaque extrémité de l'ADN viral, la superposition de 5 paires de bases entre chaque point opposé d'intégration.

1.5.3 La transcription et la traduction

Le génome proviral intégré est transcrit par la machinerie cellulaire. L'ARNm qui en résulte sera ensuite traduit pour former les différentes protéines virales. Différents facteurs de transcription cellulaire contribuent à ce processus tel NF- κ B et NF-AT. D'autres sont aussi impliqués et varient selon le type cellulaire. Les facteurs de transcription cellulaire vont se lier au LTR de l'ADN proviral pour promouvoir sa transcription à un niveau basal. En premier, ce sont les petits ARNm fortement épissés qui seront transcrits tels Tat, Rev et Nef. Tat joue un rôle important à cette étape puisqu'il agit comme activateur de la transcription et augmente la réplication virale de 10 à 1000 fois [60]. Rev va favoriser la transcription d'ARNm non épissés tels Gag et Gag-Pol ainsi que les ARNm peu épissés contenant Env, Vpu, Vpr et Vif au lieu de ceux fortement épissés initialement transcrit. Les gènes non épissés sont normalement retenus au noyau et dégradés. C'est aussi Rev qui va permettre le recrutement de transporteurs nucléaires pour exporter ces ARNm hors du noyau. Nef, pour sa part, va aussi contribuer à augmenter la réplication virale et l'infectivité des virions en interagissant avec différents constituants cellulaires, dont certaines molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMH-I, -II). Les différentes interactions entre Nef et les composantes du CMH-II seront décrites dans une section ultérieure.

1.5.4 L'assemblage, le bourgeonnement et la maturation

La polyprotéine précurseur ENV (gp160) est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique (ER). Elle subit ensuite des modifications post-traductionnelles dans le ER puis l'appareil de Golgi où elle est clivée par des protéases cellulaires pour produire les protéines gp120 et gp41, associées l'une à l'autre de façon non covalente. Ces deux protéines sont dirigées vers la membrane cytoplasmique. D'autre part, la polyprotéine précurseur Gag (Pr55^{Gag}) est synthétisée par les ribosomes cytoplasmiques et code pour les composantes internes du virion : matrice (MA), capsid (CA) et nucléocapsid (NC). Un changement dans son cadre de lecture lors de la traduction permet la production du précurseur Gag-Pol (Pr160^{Gag-Pol}). Pr55^{Gag} est la seule protéine virale essentielle à la formation de pseudoparticule virale immature [26]. C'est par la multimérisation des monomères de Pr55^{Gag} à la membrane cytoplasmique que se forme une capsule sphérique

composant l'essentielle de ses particules. Pr55^{Gag} permet aussi le recrutement de l'ARN viral lors d'une infection productive. Pr160^{Gag-Pol}, pour sa part, est essentielle à la formation de particules virales matures. Son association avec Pr55^{Gag} à la membrane cellulaire permet une interaction avec la queue intra-cytoplasmique de la protéine gp41 aboutissant l'incorporation du complexe protéique ENV au niveau de l'enveloppe virale [26]. L'association entre Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} permet aussi le recrutement des enzymes virales PR, RT et IN au sein de la particule virale en devenir. Ces enzymes sont comprises dans la partie Pol du précurseur Pr160^{Gag-Pol} et seront formées à l'étape de la maturation. L'assemblage viral semble se produire au niveau de radeaux lipidiques spécifiques de la membrane cytoplasmique cellulaire [27, 61, 62]. Durant l'assemblage, cette membrane se courbe pour former une particule virale enveloppée; c'est le bourgeonnement [63]. Environ 1200 à 2000 copies des précurseurs GAG vont s'assembler pour bourgeonner et former une particule virale. Il est aussi démontré que dans certains types cellulaires, en particulier les macrophages, le virus serait en mesure de s'assembler et de bourgeonner à partir d'endosomes qui serait probablement des MVBs (de l'anglais multivesicular bodies), donc le compartiment du CMH-II [57, 64]. Les virions ainsi formés bourgeonnent dans la lumière de ce compartiment et sont relâchés à l'extérieur de la cellule suite à la fusion de cet endosome avec la membrane cellulaire. Ce modèle est actuellement contesté par certains auteurs [65]. Durant le bourgeonnement, certaines protéines de la cellule hôte présentes dans la membrane cellulaire vont rester au sein de cette membrane et être exprimées à la surface de l'enveloppe virale. On parle alors d'incorporation des protéines de l'hôte [66]. Ce phénomène sera décrit plus en détail dans une section ultérieure. Le bourgeonnement et la libération des particules virales sont catalysés par des enzymes de la machinerie endosomale cellulaire.

Immédiatement suite au relargage, l'enzyme virale PR clive les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} selon des domaines protéiques spécifiques (ex : p24, p17, p6); c'est l'étape de la maturation. La maturation permet des réarrangements de la structure et de la morphologie au sein de la particule virale immature pour la rendre mature. Entre autres, la maturation permet la condensation du noyau conique solide, la CA, ainsi que la différenciation des différents éléments internes du virion telles NC et MA. La maturation

est essentielle au virion pour devenir infectieux. La figure 6 résume les étapes importantes du cycle de réplication du VIH-1.

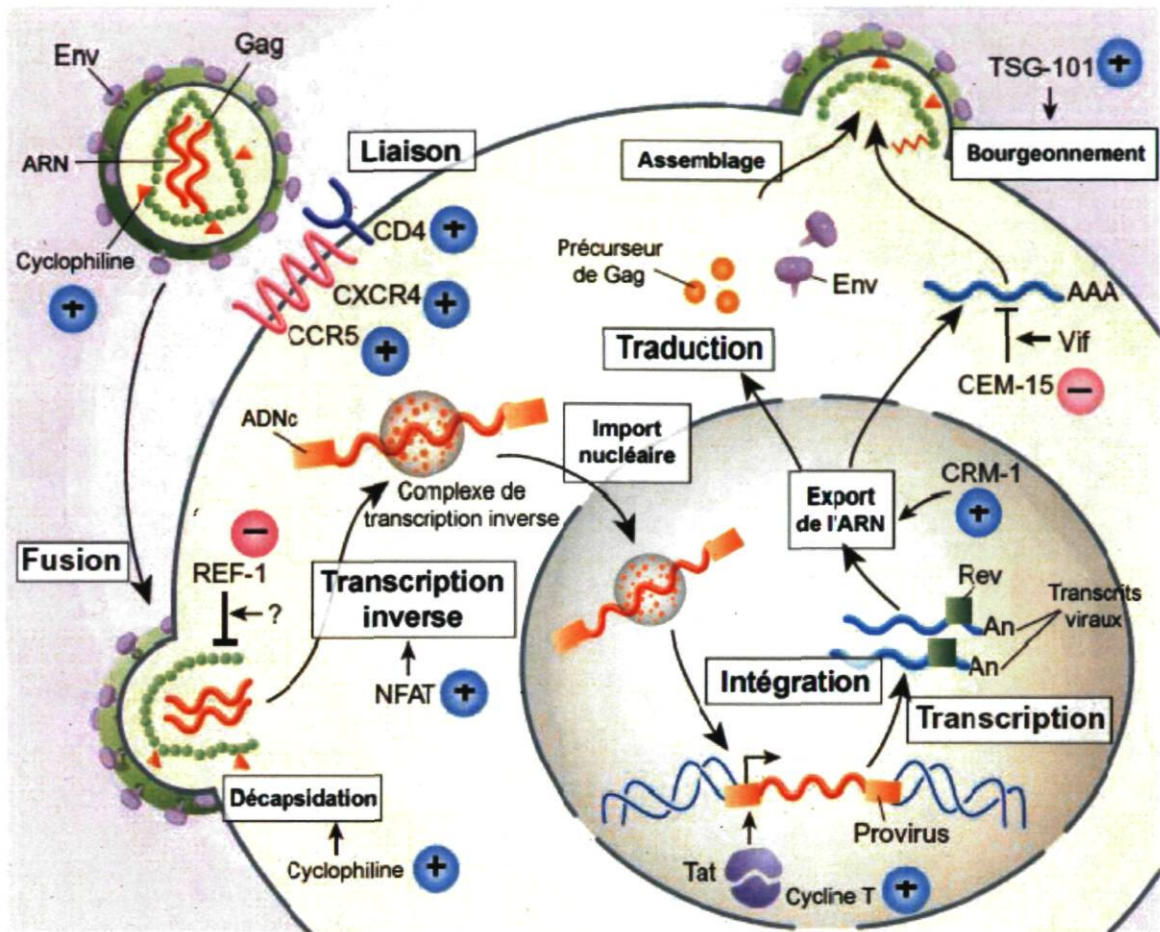


Figure 6: Cycle de réplication du VIH-1
Tiré de [67]

2. Incorporation

Les virus enveloppés acquièrent leur enveloppe constituée d'une bicouche lipidique durant le bourgeonnement. C'est à cette étape qu'ils s'approprient une portion de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée pour en faire leur enveloppe. Certaines protéines cellulaires provenant de la cellule hôte, autant membranaires que cytoplasmiques, sont emportées par le virus à cette étape. De façon générale, les protéines membranaires se retrouvent dans l'enveloppe virale alors que les protéines cytosoliques se retrouvent à l'intérieur du virus [68]. On nomme ce phénomène l'incorporation des protéines de l'hôte. Les protéines incorporées semblent être entières et fonctionnelles. On retrouve des exemples de ce phénomène pour un grand nombre de virus enveloppés, entre autres : le virus T-lymphotropique humain type 1 (HTLV-1) incorpore l'histone cellulaire Thy-1 ainsi que le récepteur de l'interleukine 2 [69]; les molécules du CMH-II sont présentes à la surface du virus d'Epstein-Barr [70]; le cytomégalovirus (HCMV) incorpore l'annexine II [71]. Le VIH ne fait pas exception à la règle. Des protéines provenant de la cellule hôte telles les composantes du CMH-I, CMH-II et ICAM-I sont des exemples de protéines incorporées dans le VIH-1 [66, 68, 72, 73].

2.1 Mécanisme d'incorporation

L'incorporation semble être un processus sélectif et non aléatoire. Il a été démontré que seulement quelques protéines membranaires dans le lot d'une grande variété de protéines à la surface d'une cellule infectée avec le VIH-1 étaient incorporées durant le bourgeonnement. Le HLA-DR, β_2 -m et le CMH-I font partie des candidats qui sont sélectionnés aux virions [74]. Les mécanismes exacts par lesquels l'incorporation survient n'ont pas encore été clairement décrits. Quatre mécanismes sont probables selon le type cellulaire infecté et la molécule incorporée [66]. D'abord, un processus d'exclusion de protéines cellulaires liées au cytosquelette pourrait être en cause. Ainsi, ces protéines seraient exclues de la portion bourgeonnante de la membrane cytoplasmique lors de la formation de particules virales (figure 7 a). Un second modèle suggère que l'incorporation des protéines cellulaires normalement liées au cytosquelette pourrait être médiée par le

cytosquelette lui-même (figure 7 b). L'identification de 3 types de protéines du cytosquelette à l'intérieur du VIH-1 supporte cette hypothèse [75]. Les observations indiquant que le virus bourgeonne à partir d'une région spécifique de la membrane suggèrent un troisième mécanisme, l'incorporation passive. En effet, l'accumulation importante de protéines de l'hôte dans certaines régions de la membrane pourrait favoriser leur incorporation, si cette accumulation est dans une même région où il y a bourgeonnement viral (figure 7 c). Finalement, un quatrième modèle est celui de la sélection positive des éléments incorporés basée sur des interactions directes entre des constituants cellulaires et des molécules virales. Le meilleur exemple d'une telle interaction est celle entre la gp120 virale et la protéine CD4 cellulaire. Un schéma représentant ce mécanisme est suggéré à la figure 7 d. Certains groupes ont aussi suggéré que la protéine de matrice virale p17 pourrait être impliquée dans un tel mécanisme, puisqu'elle est déjà essentielle pour l'incorporation des protéines d'enveloppes virales dans le virion mature [76].

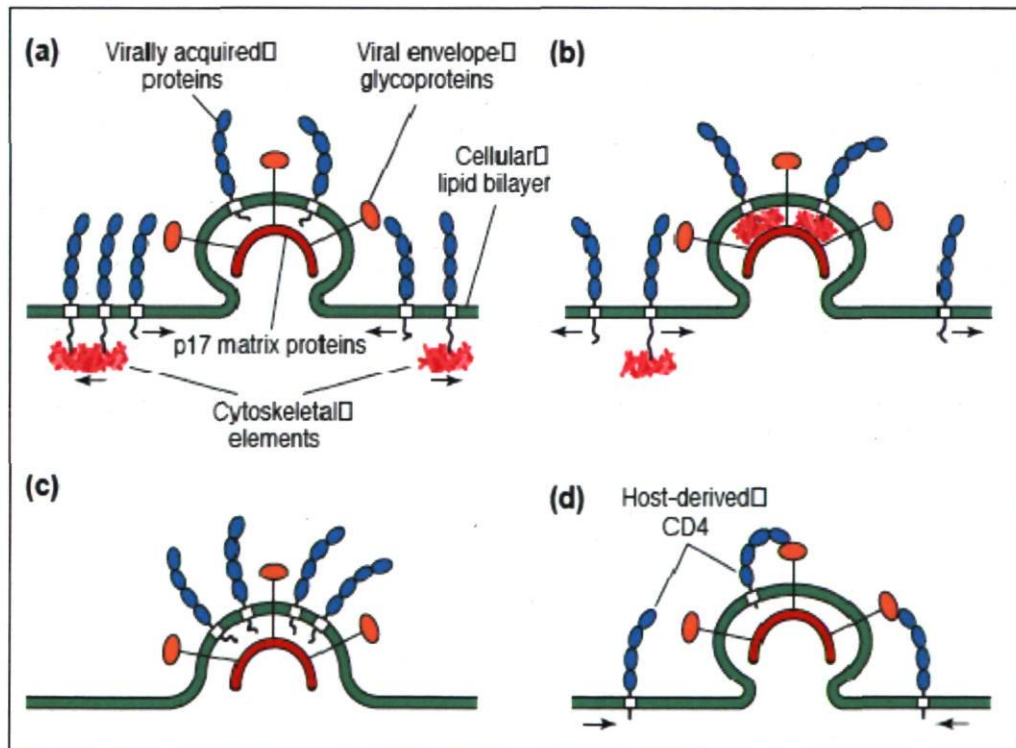


Figure 7: Mécanisme potentiel de l'incorporation des molécules de l'hôte (Tiré de [66])

- a) Exclusion des molécules par le cytosquelette
- b) Inclusion des molécules par le cytosquelette
- c) Inclusion passive
- d) Inclusion par sélection positive

2.2 Rôle et fonction des molécules incorporées

Plusieurs protéines sont incorporées dans le VIH-1 [68, 77]. Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée aux protéines membranaires. Cette section ne se veut pas une révision exhaustive des molécules incorporées, mais une explication des rôles pouvant être joués par ces molécules. La protéine ICAM-1 est une molécule d'adhésion; elle joue un rôle lors de différents phénomènes cellulaires comme la diapédèse ou le processus de présentation antigénique entre la CPA et la cellule T. Son ligand naturel est la molécule LFA-1. ICAM-1 est présent à la surface des cellules infectées et est incorporé dans l'enveloppe virale lors du bourgeonnement [78]. Lorsqu'incorporée, elle augmente l'infectivité virale en augmentant la capacité d'adhésion du virus sur ces cellules cibles, puisque ces dernières expriment LFA-1 [79]. Un autre exemple du rôle des molécules incorporées est donné avec la protéine incorporée CD40-L. Ligand naturel de cette molécule, CD40, est impliqué dans plusieurs mécanismes immunitaires comme la stimulation de lymphocyte B et la production d'Il-8. Des études récentes ont montré qu'un virus ayant incorporé CD40-L est capable de stimuler les lymphocytes B et d'induire par ceux-ci une production d'anticorps [80]. Il est important de rappeler que le VIH-1 n'infecte pas ce type cellulaire; la production d'anticorps n'est donc pas une conséquence de l'infection. Une hypothèse veut que l'hypergammaglobulinémie présente précocement chez les patients infectés avec le VIH-1 pourrait en partie être une conséquence de l'incorporation de CD40-L sur le virus. Cette molécule incorporée dans le VIH-1 est aussi capable de stimuler la production d'Il-8. Un troisième exemple est celui de l'incorporation de HLA-DR [81, 82]. Cette protéine du CMH-II est aussi incorporée dans l'enveloppe du VIH-1. Incorporée, elle augmente l'infectivité du virus et serait capable de présentation antigénique lorsque les molécules de costimulation sont incorporées avec elle [83]. Compte tenu de l'importance de l'incorporation de HLA-DR dans ce projet, une section ultérieure détaille les connaissances et les données probantes les plus récentes sur l'incorporation de HLA-DR. Ces trois molécules incorporées (HLA-DR, CD40-L et ICAM-1) sont des exemples pour expliquer les rôles pouvant être joués par les molécules incorporées. Plusieurs autres molécules sont incorporées dans l'enveloppe du VIH-1. Le tableau 1

présente une liste non exhaustive des molécules membranaires incorporées ainsi que de leurs ligands naturels.

Tableau 1 : Molécules membranaires cellulaires incorporées dans le VIH-1 et leurs ligands naturels

Molécules	Ligand(s) naturel(s)
CMH classe I	TCR, CD8
B₂-microglobuline	-
CMH classe II	
-HLA-DR	TCR, CD4
-HLA-DP	TCR, CD4
-HLA-DQ	-
CD11a (LFA1)	ICAM1, -2, -3
CD11b (Mac1)	ICAM1, -2
CD11c (p150, 95)	ICAM1, iC3b, fibrinogène
ICAM1	LFA1, Mac1
VLA4	VCAM1
CD28	CD80 (B7.1), CD86 (B7.2)
CD44	Acide hyaluronique
CD55	-
CD59	-
CD86 (B7.2)	CD28, CD152 (CTLA4)

3. Système immunitaire

3.1 Rappel immunologique

Le système immunitaire est un ensemble organisé d'éléments qui agissent ensemble pour protéger l'organisme. Ses diverses composantes se mobilisent pour contrer les infections bactériennes, virales et parasitaires, mais aussi pour protéger l'organisme face à toutes situations de danger. Le système immunitaire est classiquement séparé en deux types de réponse immune : l'immunité innée et adaptative.

La réponse innée se veut non-spécifique. Pour des molécules similaires présentes sur des pathogènes différents, la réponse innée sera la même. L'organisme réagit selon le type de molécules ou d'agents qu'il reconnaît comme potentiellement dangereux. La réponse innée peut se présenter sous diverses formes telles la phagocytose faite par les macrophages et les neutrophiles ou la lyse cellulaire faite par les lymphocytes NK (Natural Killer). Elle sert aussi à amorcer la réponse adaptée. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA), activées de façon non spécifique par les pathogènes, phagocytent ces derniers, les appréhendent dans leur lysosomes et présentent des peptides antigéniques aux lymphocytes T auxiliaires (CD4+) dans le but de bâtir une réponse spécifique. Ce sont les protéines du CMH-II que les CPA utilisent pour présenter les antigènes aux lymphocytes T auxiliaires. Pour les antigènes lipidiques, c'est la molécule CD1 qu'utilisent les CPA [84]. Bien que les CPA soient les principales cellules capables d'exprimer le CMH-II, certains autres types de cellules immunitaires, comme les lymphocytes T CD4+ activés et les lymphocytes B sont capables d'exprimer le CMH-II. Le processus par lequel un peptide antigénique exogène est présenté par le CMH-II sera expliqué de façon plus détaillée dans la prochaine section.

Les lymphocytes activés par les CPA sont ceux ayant des récepteurs spécifiques pour le pathogène présenté. C'est dans cette mesure qu'il orchestre une réponse adaptée, puisqu'ils vont réagir seulement contre un antigène spécifique. Une fois activés, les lymphocytes T auxiliaires activent les autres cellules de l'immunité adaptative, soient les lymphocytes B produisant des anticorps spécifiques pour l'antigène en cause et les lymphocytes T cytotoxique (LTC), lymphocytes ayant une activité cytolytique spécifique. Les cellules infectées de l'organisme, peu importe le type cellulaire, vont présenter des peptides

antigéniques au LTC par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Elles afficheront leur statut de cellules infectées et pourront être éliminées par les LTC. En fait, le CMH-I est présent sur tous les types cellulaires et permet la présentation de peptides endogènes. Une cellule saine présentera donc des peptides endogènes lui appartenant et ne déclenchera pas de réponse immunitaire alors qu'une cellule infectée présentera des peptides antigéniques activant la réponse immune. Certains sous-types de CMH-I sont associés à une susceptibilité accrue à l'infection au VIH-1. Le polymorphisme génétique du CMH-I explique, en partie, la grande variabilité clinique de cette infection [85].

3.2 Présentation antigénique par le CMH-II

3.2.1 HLA-DR et CD74 (chaîne invariante)

Comme mentionné plus tôt, le CMH-II permet la présentation aux lymphocytes T auxiliaires (CD4+) d'antigènes exogènes ayant été phagocytés par les CPA ou par d'autres cellules immunitaires capables d'exprimer le CMH-II. Ces peptides antigéniques sont présentés par la protéine membranaire HLA-DR [86].

Le HLA-DR est composé de 2 chaînes polypeptidiques très similaires en structure, α et β , associées de manière non covalente. Ces chaînes comprennent une grande portion extracellulaire, une portion transmembranaire et une portion intracellulaire. Les portions extracellulaires sont subdivisées en deux régions; par exemple pour la chaîne α , la région α_1 est en distale de la membrane cellulaire et la région α_2 est adjacente à la portion transmembranaire. Les régions α_1 et β_1 forment la région liant le peptide de la molécule HLA-DR. On y retrouve la niche peptidique. C'est à cet endroit où sera logé l'antigène. La niche peptidique est polymorphique; selon sa conformation, elle est capable d'accueillir des antigènes différents. Les régions α_2 et β_2 forment une région semblable aux immunoglobulines. HLA-DR n'est stable que lorsqu'un peptide est présent dans la niche peptidique, que ce soit un peptide cellulaire ou un peptide antigénique. Dès la production de HLA-DR et dans les étapes précoces de son trafic cellulaire, la niche peptidique est occupée par le fragment Clip de la protéine CD74 (aussi nommé chaîne invariante) [86, 87]. CD74 est une molécule transmembranaire du CMH-II formée d'une seule chaîne d'acides aminés. Elle comporte un groupement NH_2 en terminale de sa portion intra-

cytoplasmique, une région hydrophobique transmembranaire et une portion extracytoplasmique comprenant 2 chaînes de carbohydrates [88]. CD74 présente dans sa portion extracellulaire une région appelée le fragment Clip. Dès leur synthèse, CD74, DR α et DR β s'associent dans le réticulum endoplasmique. Ceci semble survenir par une addition séquentielle d'hétérodimère DR α/β à un noyau central formé de trois chaînes CD74, formant un complexe comportant 9 sous-unités [88]. L'interaction entre CD74 et les complexes hétérodimères DR α/β survient entre la niche peptidique de ces complexes et le fragment Clip d'une molécule CD74. Les complexes de 9 sous-unités ainsi formés, dans lesquels les protéines HLA-DR, au compte de trois, ne portent pas de peptides antigéniques, sont des complexes immatures du CMH-II [89]. La figure 8 montre un exemple de ce complexe immature. La portion gauche de la figure présente un trimère de CD74. La portion droite présente un complexe de deux HLA-DR associés à un noyau central de trois CD74. Un HLA-DR a été omis pour simplifier la figure.

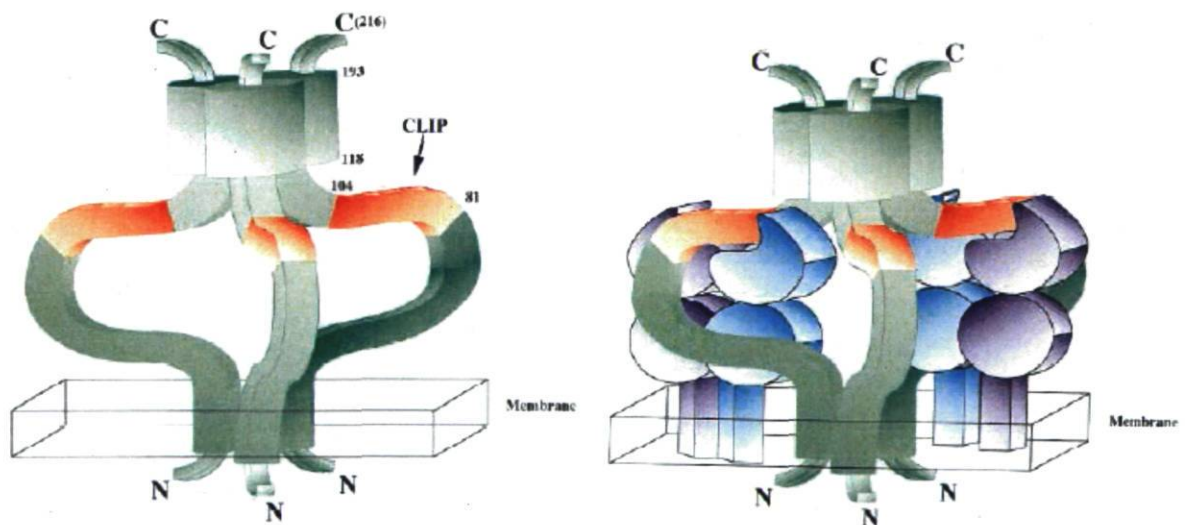


Figure 8 : Structure de CD74 et du complexe CMH-II immature
 CD74 en trimère sans HLA-DR (gauche), complexe immature du CMH-II (droite)
 Tiré de [89]

3.2.2 Trafic du CMH-II

Pour aller rejoindre les lysosomes contenant les peptides antigéniques, les complexes immatures du CMH-II, après leur séjour dans l'appareil de Golgi, peuvent trafiquer directement vers les lysosomes ou peuvent transiger par la surface cellulaire avant d'être réinternalisé et dirigé vers les lysosomes. C'est la portion intra-cytoplasmique de CD74 qui

interagit avec les différentes protéines de transport pour permettre ce cheminement [86, 90]. Quand un complexe immature est à la surface cellulaire, la portion intra-cytoplasmique de CD74 va recruter l'adaptateur AP-2 pour permettre la ré-internalisation vers le lysosome [91]. Plusieurs groupes pensent que le trafic du complexe immature HLA-DR / CD74 passe majoritairement par la surface cellulaire. Cependant, la proportion de ces complexes trafiquant par la surface est difficile à estimer puisqu'ils sont très rapidement ré-internalisé avec un temps de demi-vie à la surface cellulaire d'environ 3 à 7 minutes [92]. D'autres études ont mesuré des temps de demi-vie plus longs, d'environ 3 heures [93]. Ces résultats semblent dépendants du type cellulaire utilisé et du niveau d'activation cellulaire. On retrouve aussi une faible quantité de CD74 libre (non associé à des HLA-DR) à la surface cellulaire qui peut interagir avec MIF et CD44 [94-96]. Il est estimé qu'environ 80% des protéines CD74 semble liés à HLA-DR à la surface cellulaire [92]. Le trafic de HLA-DR seul (sans CD74) semble aussi être possible, mais très peu courant [97].

Dans une cellule non activée, les complexes immatures sont plutôt redirigés vers des endosomes et peuvent faire plusieurs cycles entre la surface et ces compartiments cellulaires avant d'être dirigés vers les lysosomes lors de l'activation immunologique. Certains groupes suggèrent qu'ils maintiennent ainsi un bassin de HLA-DR immature prêt à être apprêté pour la présentation antigénique [98].

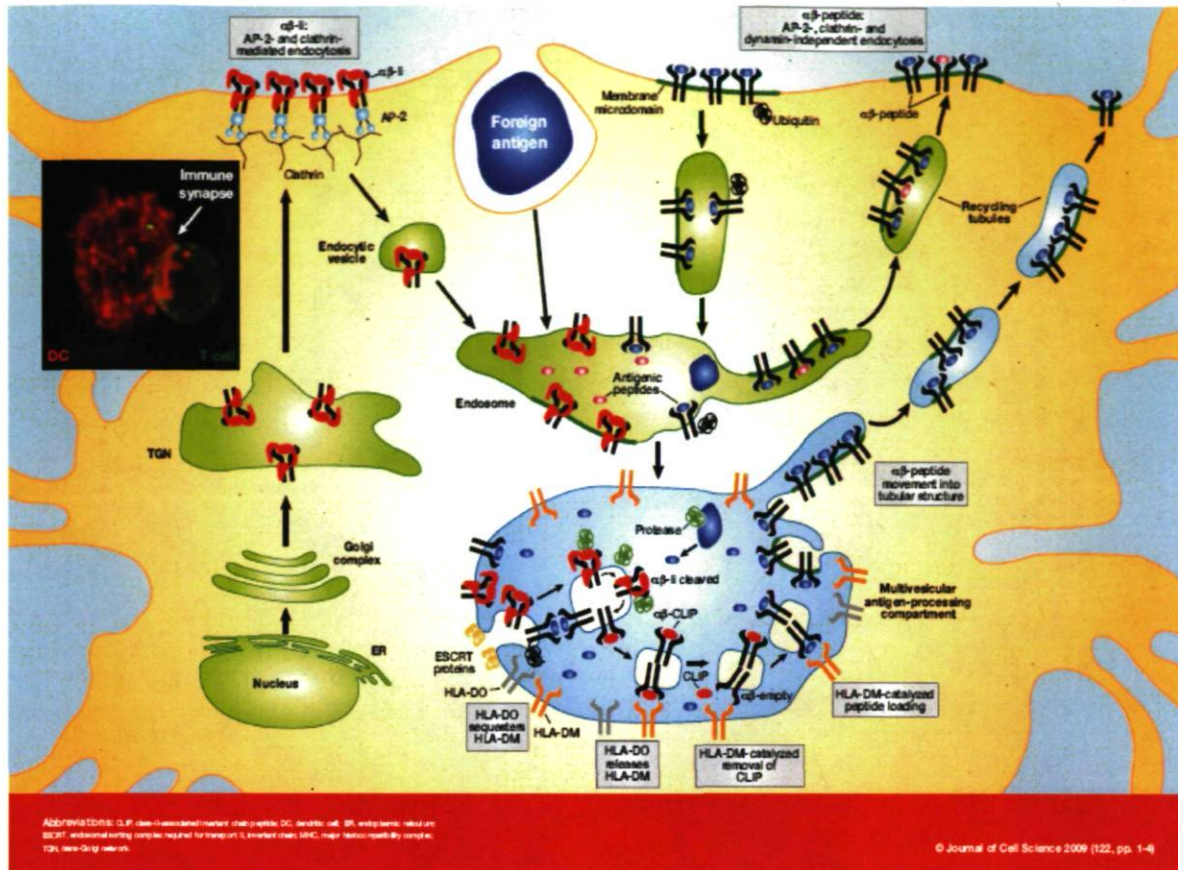


Figure 9: Traffic du CMH-II
Tiré de [91]

Une fois arrivé dans le lysosome où se trouvent les peptides antigéniques, le complexe immature est apprêté par les autres protéines du CMH-II. On nomme alors ce compartiment endosome tardif ou MVB (de l'anglais multi-vesicular body), c'est le compartiment du CMH-II [99]. Dans ce compartiment, une protéase clive CD74, ne laissant que le fragment CLIP dans la niche peptidique, ce qui divise le trimère de HLA-DR du complexe immature [86]. La protéine HLA-DM, par la suite, s'accroche au complexe HLA-DR / CLIP. HLA-DM a la capacité de catalyser l'échange du fragment CLIP pour un peptide antigénique. Suite à cet échange, la protéine HLA-DR porte un antigène et est mature. HLA-DO, un autre gène accessoire du CMH-II assure la régulation de HLA-DM, permettant peut-être ainsi une sélection du peptide antigénique [99, 100]. La molécule de HLA-DR est acheminée à la surface cellulaire dans des radeaux lipidiques spécifiques [101, 102]. Elle pourra y accomplir sa fonction et présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4+ en interagissant avec leur TCR (T Cell Receptor). Certaines protéines HLA-DR matures peuvent être ré-intériorisées vers le lysosome où elles y seront recyclées ou dégradées.

C'est l'ubiquitination de la portion intracytoplasmique de la chaîne β de HLA-DR qui permet la signalisation menant à la ré-internalisation de cette protéine [91, 99]. Il est à noter que l'ubiquitination est un mécanisme fortement utilisé dans le transport endosomal. Il ne semble toutefois pas être essentiel aux étapes précoces de l'expression du CMH-II [103, 104]. La figure 9 schématise le trafic du CMH-II dans la cellule.

3.2.3 Interaction TCR et CMH-II

Les TCR sont uniques pour chaque clone lymphocytaire T, c'est dans cette mesure qu'ils n'interagissent qu'avec un HLA-DR portant un antigène particulier correspondant, permettant ainsi la structure d'une réponse immunitaire spécifique. L'interaction entre le TCR et le CMH requiert la présence d'un corécepteur. Ce dernier est le CD4 pour les lymphocytes T auxiliaires et le CD8 pour les lymphocytes T cytotoxiques. Ces corécepteurs permettent une interaction avec le CMH-II, dans le cas de CD4, et avec le CMH-I dans le cas de CD8. Suite à l'interaction entre un HLA-DR et un TCR associé à un CD4, un deuxième signal est nécessaire pour valider la présentation antigénique et induire un stimulus d'activation au lymphocyte T. Ce signal est induit par l'interaction entre CD86, présent du côté des CPA et CD28 présent sur les lymphocytes T CD4+. Suite à ces deux signaux, le lymphocyte T CD4+ sera activé et sera en mesure d'orchestrer une réaction immunitaire spécifique contre l'antigène présenté par HLA-DR. De plus, une fois activé, le lymphocyte T CD4+ peut agir comme une CPA, puisqu'il exprime aussi HLA-DR, mais demeure moins efficace dans la présentation antigénique que les CPA classiques telles les macrophages et les cellules dendritiques.

4. Le VIH-1 et le CMH-II

Comme mentionné plus haut, le VIH-1 peut affecter avec une grande variété de mécanismes cellulaires dont la présentation antigénique par le CMH-II. Les deux protéines virales les plus impliquées dans ce phénomène sont Nef et Vpu. Bien sûr, d'autres protéines accessoires du VIH-1 ont aussi une influence, mais elles sont négligeables dans le contexte du CMH-II. L'incorporation des protéines du CMH-II dans la membrane virale est aussi une forme d'interaction entre le virus et le CMH-II. La présente section vise à expliquer de façon détaillée les différentes interactions entre le VIH-1 et le CMH-II

4.1 Modulation par Nef de la présentation antigénique par le CMH-II

Nef interagit avec deux composantes importantes du CMH-II, les complexes de présentation antigénique mature et immature [105, 106]. D'abord, Nef augmente l'expression à la membrane cytoplasmique du complexe CMH-II immature (HLA-DR/CD74). Pour se faire, Nef interagit avec la protéine adaptateur AP-2, entrant ainsi en compétition avec la portion intracytoplasmique de CD74 pour le recrutement de cet adaptateur [107, 108]. AP-2 est nécessaire pour la ré-internalisation des complexes immatures. Étant moins disponible, la ré-internalisation de ces complexes est diminuée provoquant ainsi l'accumulation des complexes immatures, liés à CD74, à la surface cellulaire.

Nef permet aussi la diminution de l'expression membranaire des molécules HLA-DR matures. Les cellules infectées avec un virus exprimant Nef, comparées à une infection avec un virus ne l'exprimant pas, présentent moins de HLA-DR à leur surface [105]. Cet événement survient rapidement en quelques heures suivant l'infection virale. Le mécanisme par lequel cette modulation à la baisse survient est différent de celui permettant la modulation de CD74 puisqu'il survient à un temps légèrement différent et ne requiert pas la même quantité de Nef pour survenir [105, 106]. C'est le domaine acide de Nef qui est à l'origine de ce phénomène, en comparaison avec l'augmentation de CD74 qui est causée par la boucle flexible en C-proximal de Nef [106]. Il a aussi été montré que la modulation de HLA-DR n'est pas une conséquence de la diminution du trafic de CD74. Une étude

récente a montré que Nef diminue l'expression de HLA-DR en favorisant l'action d'une voie de réinternalisation constitutive de HLA-DR [109]. Les molécules HLA-DR seraient réinternalisées dans un compartiment sous l'action de Rab5. Elles seraient ensuite redirigées vers un compartiment lysosomal de manière dépendante à Rab7. Il est important de mentionner que Nef diminue aussi l'expression de CD80 et CD86 à la surface des monocytes [110, 111]. Ces molécules sont importantes puisqu'elles permettent le deuxième signal lors de la présentation antigénique. Les modulations combinées de l'expression des composantes du CMH-II induites par Nef nuisent à la présentation antigénique par le CMH-II des cellules infectées, macrophages et lymphocytes T CD4+, ce qui contribue à l'évasion immunologique du VIH-1.

4.2 Interaction entre le CMH-II et Vpu

Des études ont montré que Vpu induit lui aussi une modulation à la baisse de l'expression membranaire des protéines HLA-DR matures. Cependant, en comparaison avec la modulation médiée par Nef, celle-ci survient plus tardivement dans l'infection cellulaire avec le VIH-1 : dans les études, on remarquait le phénomène après 24 heures d'infection et il devenait statistiquement significatif à 44 heures d'infection [112]. L'observation tardive de ce phénomène est conséquente de l'expression tardive de Vpu au cours de l'infection, Vpu étant un gène tardif. Dans l'étude mentionnée ci-haut, la diminution de l'expression de HLA-DR chez les monocytes corrèle avec une diminution de l'activation des lymphocytes T CD4+. Le mécanisme exact reste à élucider, mais il est probable que ce soit secondaire à une diminution de la présentation antigénique. Vpu est aussi connue pour son interaction avec CD74. En fait, puisque Vpu peut être une protéine transmembranaire [113], l'interaction se fait entre les deux portions intra-cytoplasmiques de ces protéines [112]. Cette interaction ne semble provoquer aucune conséquence sur l'expression ou la fonction de CD74. De plus, il ne semble pas y avoir de lien direct entre ce phénomène et la modulation à la baisse de HLA-DR causé par la présence de Vpu.

4.3 Incorporation des protéines du CMH-II

Comme mentionné plus haut, le HLA-DR est incorporé dans l'enveloppe virale. En fait, elle est la protéine de la cellule hôte la plus incorporée dans le VIH-I [82]. Cette

incorporation est variable en fonction du type cellulaire infecté et de la souche virale [81, 114]. Les virions semblent incorporer davantage de HLA-DR lorsqu'ils infectent des cellules de type CPA, ce qui est logique puisque ces cellules sont celles qui expriment les plus forts niveaux de molécules de CMH-II. D'autre part, les virus ayant des enveloppes de tropisme R5 semblent incorporer plus de HLA-DR. L'incorporation de HLA-DR augmente l'infectivité des particules virales [115]. Ce phénomène est probablement secondaire à une adhésion plus grande du virus aux cellules cibles lorsque cette molécule est incorporée.

Les protéines HLA-DR incorporées sont fonctionnelles et capables de présentation antigénique. Comme revue plus haut, une présentation antigénique survient lorsqu'un HLA-DR portant dans sa niche peptidique un antigène interagit avec un TCR spécifique pour ce même antigène et un CD4 comme corécepteur. Un deuxième signal est nécessaire par l'intermédiaire de l'interaction entre les molécules CD86 du côté de la CPA et CD28 sur le lymphocyte T. Une étude menée dans notre laboratoire [83] a montré qu'une production de VIH-1 dans des cellules exprimant CD86 et un HLA-DR portant l'antigène HA (par transfection stable) permettait l'incorporation de ses deux molécules dans l'enveloppe virale. Les virus recueillis étaient ensuite capables de stimuler des lymphocytes T exprimant un TCR spécifique pour l'antigène HA. Dans des systèmes plus physiologiques, HLA-DR et CD86 sont toutes deux incorporées par le virus [116]. Il est donc fort probable que les virions soient capables d'une même stimulation antigénique dans un contexte physiologique ou même *in vivo*. Il a aussi été observé dans notre laboratoire à l'aide d'isolat clinique que HLA-DR était présent à la surface de virus provenant de patients infectés. Ces résultats ne sont pas encore publiés.

Avec les données actuellement disponibles, aucune autre molécule de la machinerie du CMH-II ne semble être incorporée dans l'enveloppe du VIH-1. Le mécanisme expliquant l'incorporation de HLA-DR n'est pas connu même si plusieurs hypothèses ont été soulevées. Entre autres, une association de HLA-DR à ENV lors du processus d'assemblage avait été évoquée comme mécanisme possible permettant l'incorporation de HLA-DR. Cette hypothèse s'est avérée fautive [117].

5. Problématique, hypothèse et objectif de recherche

La protéine HLA-DR du CMH-II est l'une des protéines de l'hôte les plus incorporées dans l'enveloppe du VIH-1. Roy *et coll.* ont montré que la molécule incorporée est fonctionnelle et capable de présentation antigénique. Est-ce que l'activation immunologique induite par un virion agissant comme une CPA contribue à la pathogenèse de l'infection au VIH-1? Dans le contexte où une proportion importante de lymphocytes meurt par sénescence répllicative durant l'histoire de l'infection au VIH-1, il est possible qu'un virus capable d'activer ces cellules cibles puisse contribuer à ce phénomène. À ce jour, aucune donnée ne montre l'implication de l'incorporation de HLA-DR dans la pathogenèse par sénescence répllicative. D'autre part, plusieurs protéines accessoires du VIH-1 modulent l'expression de surface des protéines du CMH-II. Entre autres, Nef et Vpu modulent à la baisse l'expression de HLA-DR à la surface des cellules infectées. Il a aussi été démontré que Nef augmente l'expression de CD74 à la surface de ces cellules [107, 108]. Vpu, pour sa part, est connue comme un ligand de CD74.

Étant donné le contraste entre la modulation à la baisse de HLA-DR à la surface des cellules infectées et sa très forte incorporation dans l'enveloppe virale, qui provient de cette même enveloppe cellulaire, l'hypothèse principale de ce projet de recherche est que le VIH-1 incorpore sélectivement, à l'aide de ses protéines accessoires Nef et Vpu, les molécules de HLA-DR à différents stades de maturation. Cette incorporation sélective pourrait avoir un rôle important dans la physiopathologie de la maladie. Les objectifs spécifiques de ce projet sont :

- 1 Confirmer les résultats montrant la modulation de HLA-DR et de CD74 par Nef dans un modèle d'infection de lymphocytes T CD4+ primaires
- 2 Vérifier si les complexes immatures du CMH-II, contenant CD74, sont incorporés dans l'enveloppe du VIH-1
- 3 Vérifier si les protéines accessoires du VIH-1, Nef et Vpu, modulent le niveau d'incorporation des composantes du CMH-II

6. Matériels et méthodes

6.1 Construction provirale et Clonage

Le clone moléculaire pNL4.3 du HIV-1, produisant une particule infectieuse entière, a été fourni par le AIDS Repository Reagent Program. pNL4.3ΔXHO est un clone moléculaire du HIV-1 comportant un codon-stop dans le gène *nef* [118]. Pour ce faire, une digestion au site unique XhoI situé dans le gène *Nef* et une complémentation des nucléotides libres par l'enzyme T4 ADN polymérase permet un changement du cadre de lecture résultant en l'expression d'une protéine de fusion non fonctionnelle comportant 45 résidus (gracieusement de S. Venkatesan, National Institutes of Health, Bethesda, MD). HXBH10 et HXBH10-Vpu⁻ sont des constructions provirales isogéniques à l'exception du codon d'initiation du gène *vpu*, où l'ATG de HXBH10-Vpu⁻ a été remplacé par un ACG par mutagenèse dirigée [44]. Il en résulte une construction provirale déficiente en protéine Vpu. HXBH10-Vpu S52,56/D est une construction provirale du HIV-1 exprimant une protéine Vpu déficiente en phosphorylation [119] (vecteurs généreusement donnés par E.A. Cohen, Laboratoire de Rétrovirologie Humaine, Montréal, Qc). NL4.3-IRES-HSA est une construction provirale exprimant de manière stable la protéine murine HSA [120]. NL4.3ΔNef-IRES-HSA est une construction isogénique portant un codon-stop dans le gène *nef*. Une digestion au site unique XhoI suivie d'une complémentation de nucléotide libre grâce à l'enzyme KlenowI permet un changement du cadre de lecture et l'apparition du codon-stop [121].

6.2 Cellule

6.2.1 Lignée cellulaire (293T et Raji-CD4)

La lignée cellulaire rénale embryonnaire humaine 293T est cultivée dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) complétement avec 10% de sérum fœtal de veau (FBS). Elle a été gracieusement donnée par W.C. Greene (J. Gladstone Institutes, San Francisco, CA). La lignée lymphocytaire B Raji-CD4 transformée par le virus Epstein-Barr est susceptible au VIH-1 par la transfection stable du cADN humain encodant pour la protéine CD4. Elle est cultivée dans du milieu RPMI-1640 complétement avec 10% de FBS et 1 mg/mL de l'agent de sélection G418 (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD). Les RM3-

CD4 sont des cellules Raji-CD4 modifiées, n'exprimant pas le CMH-II. Elles se cultivent comme les Raji-CD4.

6.2.2 Lymphocytes T CD4⁺ primaires

Les lymphocytes T CD4⁺ sont isolés à partir de sang périphérique d'un donneur sain. Le sang est centrifugé au travers d'un gradient de Ficoll-Hypaque pour y recueillir les cellules mononucléées (PBMCs). Une sélection immunomagnétique négative permet d'isoler les lymphocytes T CD4⁺ telle que décrite par le manufacturier (StemCell Technologies, StemSep Negative Selection). Le séparateur AutoMACS™ (Miltenyi biotech, Auburn, CA) est utilisé à cette fin. Les cellules sont cultivées pendant 2 jours dans du milieu RPMI-1640 complémenté avec 10% de FBS en présence de phytohemagglutinine (PHA) (1 ug/ml) et de l'interleukine-2 humaine recombinant (IL-2) (30 U/ml) afin d'être susceptible à l'infection.

6.3 Production virale et infection cellulaire

6.3.1 Transfection calcium-phosphate des cellules 293T

La transfection selon la méthode de précipitation au calcium-phosphate des cellules 293T permet la production de virions isogéniques. Les cellules sont mises en culture dans des flacons de 75 cm² à une concentration de 3×10^5 cellules/mL la veille de la transfection. 15 µg d'ADN codant pour l'une des différentes constructions provirales sont mélangés à une solution de 62,5 µL de CaCl₂ 2 M et le volume est complété à 0,5 mL avec de l'eau stérile. Cette solution est incubée pendant 30 minutes avec 0,5 mL d'HBS 2X et est déposée sur les cellules 293T préalablement cultivées. 16 heures plus tard, les cellules sont lavées avec du PBS 1x et suppléées avec 10 mL de milieu frais (DMEM 10% FBS) pendant 24 heures. Le surnageant cellulaire est centrifugé et filtré dans des filtres millipore 0,45 µm, aliquotés en 500 µL et conservés à -80°C. La quantité de virus est évaluée à l'aide d'un test ELISA maison qui détecte la protéine de capsid P24.

6.3.2 Infection de Raji-CD4

L'infection des cellules Raji-CD4 optimise l'incorporation des protéines du CMH-II dans l'enveloppe virale grâce au haut taux d'expression du CHM-II dans cette lignée cellulaire. 10 millions de Raji-CD4 sont resuspendues dans 1 mL de milieu de culture contenant des

particules virales isogéniques (100 ng de P24 par 10^6 cellules) et sont incubés à 37°C pendant 3 heures. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X et resuspendues dans 5 mL de milieu de culture contenant du G418 pour 48 heures. 10 mL de milieu contenant du G418 sont ensuite ajoutés et la culture est poursuivie pour un total de 5 à 7 jours. Le surnageant cellulaire est centrifugé et filtré avec des filtres millipore 0,45 μ m. La quantité de virus est évaluée avec le même test ELISA maison qui détecte la protéine de capsid P24.

6.3.3 Infection de lymphocytes T CD4+ et production virale

L'infection des lymphocytes T CD4+ primaires permet de simuler des conditions physiologiques d'infection et de production virale. 10 millions de lymphocytes T CD4+ primaire préalablement activés avec du PHA et de l'IL-2 (tel que précédemment décrit) sont resuspendus dans 1 mL de milieu de culture contenant des particules virales isogéniques (100 ng de P24 par 10^6 cellules) et sont incubés à 37 C pendant 3 heures. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X, resuspendues dans 5 mL (2×10^6 cellules par mL) de milieu de culture contenant de l'IL-2 (30U/mL) et cultivées pendant 7 à 10 jours. Selon le type viral (HXBH10, HXBH10-Vpu, HXBH10-Vpu S52,56/D), 5×10^6 lymphocytes T CD4+ préalablement activées sont ajoutés à la culture au 4^{ème} jour pour permettre une production virale optimale. Le surnageant cellulaire est centrifugé et filtré avec des filtres millipore 0,45 μ m. La charge virale est évaluée avec le même test ELISA maison détectant la protéine de capsid P24.

6.4 Anticorps

L'hybridome 2.06 sécrétant l'anticorps anti-HLA-DR (isotype IgG2a), utilisé pour les immunocaptures et pour la cytométrie de flux a été obtenu par l'ATCC (The Global Bioresource CenterTM). L'anticorps anti-CD74 (clone BU45, isotype IgG1) utilisé pour les immunocaptures et pour la cytométrie de flux est une gracieuseté du Dr M Goodall (University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom). Les anticorps ont été biotinylés par NHS-LC-biotin tel que décrit par le manufacturier (Pierce, Rockford, IL USA). L'anticorps secondaire chèvre-anti-souris couplé au fluorochrome PE (phycoérythrine), utilisé pour la cytométrie de flux, est acheté chez Jackson

Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). L'anticorps anti-HSA couplé au fluorochrome FITC (clone M1/69), utilisé pour la cytométrie de flux, est acheté chez BD Biosciences. Les hybridomes GAP8.3, OKT3 et OKT4, sécrétant respectivement les anticorps anti-CD45, anti-CD3, et anti-CD4, utilisés pour les immunocaptures, ont été obtenus par l'ATCC.

6.5 Mesure de la charge virale

La quantité de virus est évaluée par un dosage d'immunosorption liée à l'enzyme (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / ELISA) maison utilisant 2 anticorps. Les puits d'une plaque IMMULON 2 HB sont tapissés d'un premier anticorps (183-H12-5C) à 2,5 µg/mL contre la protéine de capsid P24 dans un tampon *coating*. Après un blocage des sites antigéniques non spécifiques à l'aide d'une solution de PBS 1X Tween 1% BSA, l'échantillon à doser est réparti dans les puits. Suite à la lyse des virions, un deuxième anticorps biotinylé (31-90-25 bio) y est incubé pendant 1 heure. Ensuite, la streptavidin couplée à l'enzyme HRP (horse radish peroxidase) est ajoutée pour 30 minutes, et finalement le substrat TMB-S (Fitzgerald Industries) y est incubé pour révéler la présence de P24. La réaction est arrêtée par du H₃PO₄ 1 M. Un lecteur de plaque permet la mesure de la densité optique à 450 nm de l'échantillon comparé avec une échelle standardisée, permettant la mesure semi-quantitative de la charge virale.

6.6 Immunocapture

Pour évaluer l'incorporation des protéines de la cellule hôte dans l'enveloppe du VIH-1, en particulier des molécules HLA-DR et CD74 du CMH-II, des tests d'immunocapture ont été prodigués. Ces tests sont basés sur l'utilisation d'anticorps spécifiques pour les molécules incorporées permettant la sélection des virions transportant ces molécules. La quantité de particules virales ainsi capturées est ensuite mesurée. Plus la quantité de virus récupérés est importante, plus l'incorporation est généralisée au sein d'une même population virale.

6.6.1 Immunocapture en plaque 96 puits

Ce premier test d'immunocapture fait appel à l'utilisation de plaques IMMULON 2 HB de la compagnie Thermo Fisher Scientific. Ces plaques de 96 puits irradiées ont des surfaces

ayant une forte affinité pour les protéines hydrophiles. Les anticorps utilisés pour la capture sont incubés dans les puits de ces plaques à une concentration de 5 μ g/ml pendant 2 heures à la température pièce, permettant ainsi le revêtement des surfaces de ces puits par l'anticorps utilisé. Trois puits sont utilisés pour chaque anticorps et chaque anticorps isotypique par production virale à analyser. Les plaques sont ensuite bloquées pendant deux heures avec une solution de PBS 1X contenant 1 % de BSA. Une quantité de virus normalisée à 25 ng de protéine P24 est incubée dans chaque puits pendant 12 à 16 heures à 4°C. Suite à 2 lavages avec du PBS 1X, les particules virales capturées au fond des puits sont lysées avec un tampon 0,5 % Triton X-100 dans un volume final de 250 μ L. La quantité de virions contenue dans 125 μ L de cette lyse est ensuite mesurée par ELISA P24, tel que décrit précédemment, pour ainsi déterminer le niveau d'incorporation de protéines ciblées. L'immunocapture en plaque à l'avantage d'utiliser peu d'anticorps. Cependant, elle nécessite une quantité importante de virus.

6.6.2 Immunocapture avec billes magnétiques

Ce deuxième test d'immunocapture est basé sur l'utilisation de billes magnétiques Dynabeads® M-280 streptavidin de la compagnie Dynal Biotech inc (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Ces billes ont la particularité d'avoir des molécules de streptavidine couplées de façon covalente à leur surface. Pour chaque répliqua, 2 μ g d'anticorps biotinylés spécifiques pour la protéine incorporée sont incubés avec 12,5 μ L de billes magnétiques pendant une heure à température pièce dans une solution de PBS 1X 10%BSA. L'interaction entre les molécules de streptavidine et de biotine permet l'association des anticorps aux billes. La solution d'incubation contenant 10 % de BSA permet le blocage des sites non spécifique des anticorps utilisés. Trois répliqua sont fait pour chaque anticorps et chaque anticorps isotypiques par production virale à analyser. Les billes magnétiques sont ensuite lavées à trois reprises avec du PBS 1X 10%BSA grâce à un support magnétique. Une quantité de virions normalisée à 2 ng de protéine P24 est incubée avec les billes magnétiques pendant 12 à 16 heures dans un volume final de 1 mL, complété avec du PBS 1X 10%BSA. L'incubation se fait sur une plateforme rotative à 4°C. Suite à l'incubation, les billes magnétiques sont lavées à trois reprises. Les particules virales capturées par les billes sont ensuite lysées avec un tampon 0,5 % Triton X-100 dans un

volume final de 260 μ L. La quantité de virions récupérés est ensuite mesurée avec ELISA contre la P24 tel que d'écrit précédemment. L'immunocapture avec bille magnétique permet l'étude de l'incorporation sur de petites quantités de virus, ce qui est particulièrement utile pour les productions virales faites à partir de cellules primaires.

6.7 Cytométrie de flux

Les cellules infectées avec les virus exprimant HSA sont lavées 2 fois dans une solution PBS 1x. Elles sont ensuite incubées pendant 30 minutes dans une solution de PBS 1x et de 10 % de sérum humain pour bloquer les récepteurs Fc. Les cellules sont lavées une autre fois et incubées 30 minutes avec 1 μ g d'anti-HSA couplé à un fluorochrome (FITC) (anticorps de rat). Suite à un autre lavage, les cellules sont incubées avec 1 μ g d'anti-HLA-DR, d'anti-CD74 ou de l'isotype approprié (anticorps de souris). Les cellules sont lavées une fois de plus et incubées 30 minutes avec un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre la portion Fc des anticorps de souris, et couplé avec le fluorochrome phycoérythrine (PE). Les cellules sont encore lavées puis fixées pendant 20 minutes dans une solution de paraformaldéhyde 2 % et sont finalement resuspendues dans du PBS 1x. Dans l'optique de faire les ajustements et la compensation nécessaires à l'analyse cytofluorométrique d'un double marquage, certains échantillons provenant des mêmes cultures cellulaires n'ont été marqués qu'avec l'un des anticorps primaires (ex : anti-HSA seulement). La fluorescence des différents échantillons est mesurée sur un appareil Epics®XL FACS (Beckman Coulter).

7. Résultats

7.1 Modulation de HLA-DR et CD74 par Nef

Plusieurs groupes ont montré l'influence de la protéine virale Nef du VIH-1 sur l'expression à la membrane cytoplasmique de HLA-DR et de CD74. Ils ont montré que Nef diminue l'expression de HLA-DR et augmente celui de CD74 en diminuant sa réinternalisation. Dans ces études, les résultats ont été obtenus par des systèmes de transfection sur des lignées cellulaires, où l'on surexprimait les protéines du CMH-II étudiées dans le but de voir une variation [105, 109]. Dans ce genre de système, une grande majorité des cellules sont infectées, ce qui permet de voir de petite variation d'expression de protéine. Cependant, de telles infections ne sont pas physiologiques. Par la suite, d'autres études ont utilisé des virus exprimant des molécules GFP [106]. Ainsi, on ciblait, à l'aide d'un double marquage en cytométrie de flux, les cellules infectées pour voir les variations d'expression de HLA-DR et de CD74 à leur surface. Ce genre de système est plus physiologique puisqu'aucune molécule n'est surexprimée. Cependant, ces chercheurs utilisaient aussi des lignées cellulaires. Un groupe a récemment répété l'expérience avec des lymphocytes T CD4 primaires, ce qui permettait une infection de cellules au sein d'une population non infectée, ce qui est représentatif de la réalité [107]. Ainsi, il est possible de bien visualiser l'effet de Nef sur les cellules infectées ainsi que sur les cellules avoisinantes.

7.1.1 Modulation de l'expression membranaire de HLA-DR par Nef

Dans l'optique de valider les résultats de modulation des protéines du CMH-II par Nef, une expérience similaire a été menée à l'aide des virus NL4.3-IRES-HSA et NL4.3 Δ Nef-IRES-HSA. Ces virus permettent l'expression de la protéine murine HSA (*heat-stable antigen*) à la surface des cellules infectées, et servent à sélectionner une population de cellules infectées à l'aide d'anticorps spécifique durant l'analyse par cytofluométrie. Ce système a l'avantage de permettre l'expression de la protéine HSA pendant plusieurs cycles de réplication. De plus, à comparer aux autres systèmes de gène rapporteur comme l'insertion de GFP dans le VIH-1, le tandem IRES-HSA a l'avantage de ne pas interférer avec la transcription d'autres protéines virales, permettant ainsi des essais où le génome entier du

virus est exprimé. Dans un premier temps, des lymphocytes T CD4 primaires, isolés d'un donneur sain, ont été activés et infectés séparément par les virus NL4.3-IRES-HSA ou NL4.3 Δ Nef-IRES-HSA. Trois jours après infection, les cellules sont lavées et marquées avec les anticorps anti-HSA et anti-HLA-DR, tel que décrit précédemment. Des contrôles sont faits pour chaque anticorps ainsi que pour la compensation nécessaire à l'analyse de deux fluorescences différentes en simultanée.

L'analyse cytofluorométrique nous permet de sélectionner la population de cellules infectées au sein de la population cellulaire totale par l'expression de la protéine murine HSA à la surface des cellules infectées. Les cellules ayant un signal HSA plus intense sont sélectionnées pour l'infection avec NL4.3-IRES-HSA (figure 10, cadran A) et pour l'infection avec NL4.3 Δ Nef-IRES-HSA (figure 10, cadran B). L'expression de HLA-DR des cellules infectées est mesurée (ligne rouge) et est comparée à celle des cellules non infectées (ligne noire) pour l'infection avec Nef (figure 10, cadran C) ou sans Nef (figure 10, cadran D). En comparant l'expression de HLA-DR chez les cellules HSA positives des deux infections, on note qu'elle est plus élevée chez les cellules HSA positives provenant de l'infection sans Nef (mean fluorescence: 118,83) que chez les cellules provenant de l'infection avec Nef (mean fluorescence : 100,62). Les cellules HSA positives représentent 10,59% de la population lors de l'infection avec Nef alors qu'elles représentent 9,31% de la population lors de l'infection sans Nef. La présence de Nef durant l'infection engendre donc une diminution de l'expression de HLA-DR à la surface des cellules infectées. Ces résultats sont congruents avec la littérature concernant l'effet de Nef sur l'expression de HLA-DR. Le nombre inférieur de cellules infectées lors de l'infection sans Nef est aussi un phénomène décrit [33], bien qu'ici la différence ne soit pas significative. Ces résultats nous permettent aussi de voir que l'expression de HLA-DR à la surface des cellules infectées avec le virus Nef positif reste supérieure à l'expression de cette molécule au sein des cellules non infectées, malgré l'effet de Nef. Il est aussi intéressant de noter que l'expression de HLA-DR des cellules non infectées est comparable pour des cellules en présence d'infection active avec ou sans Nef. Cette expérience est représentative de 3 essais avec des lymphocytes T CD4⁺ primaires provenant de 3 donneurs différents. Les résultats des trois donneurs sont présentés dans le tableau 2. Le nombre faible d'événements pour l'expression de HLA-DR chez les cellules infectées est attribuable au pourcentage de

cellules infectées relativement faible (entre 6 % et 14 % selon l'essai). L'essai était mené jusqu'à l'acquisition de 10 000 événements positifs pour l'expression de HSA.

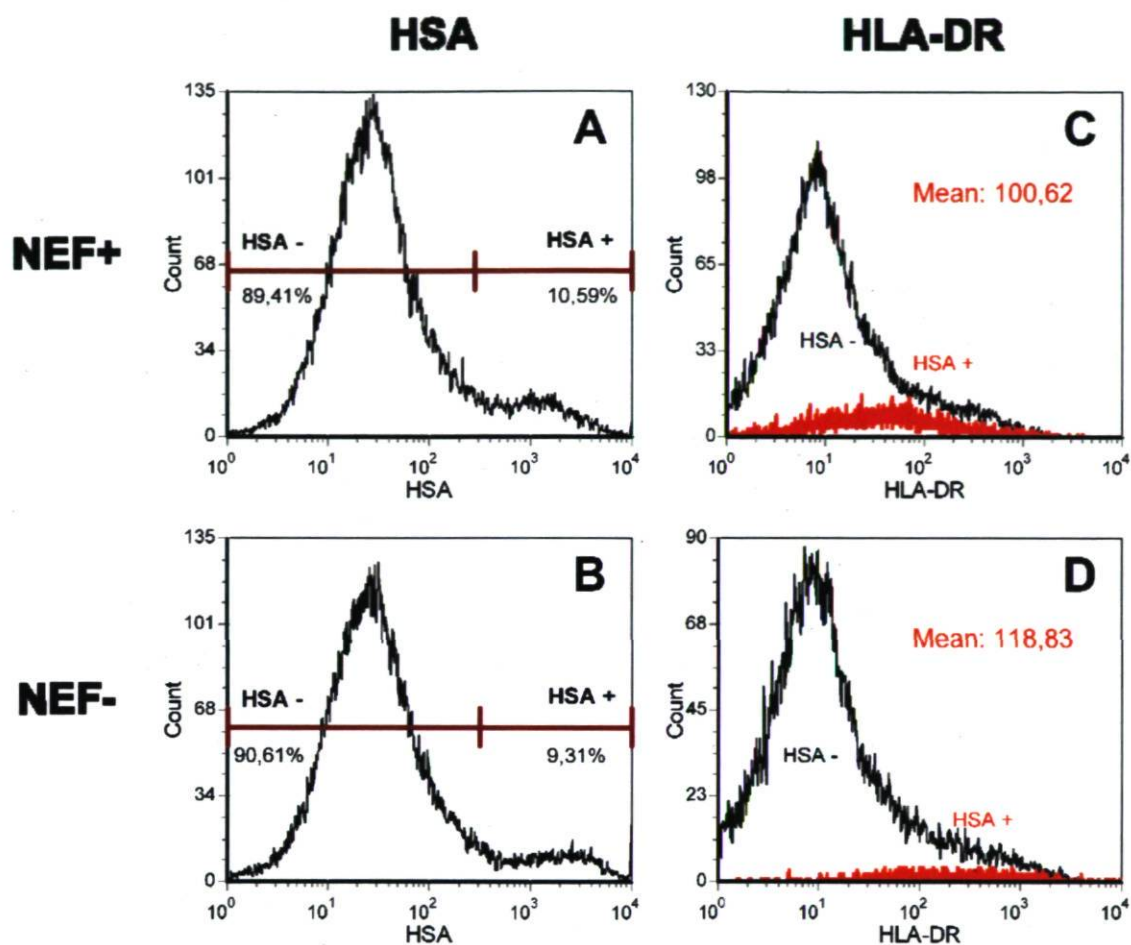


Figure 10 : Modulation de l'expression membranaire de HLA-DR par Nef

Suite à une infection de 3 jours de lymphocytes T CD4+ primaires, l'expression membranaire de la protéine murine HSA et de HLA-DR est mesurée par cytofluorométrie. Le cadran supérieur gauche montre la sélection de la population cellulaire infectée avec un virus Nef+ (M1). Le cadran supérieur droit montre l'expression de HLA-DR chez les cellules non infectées (noir) et chez les cellules infectées (rouge). Le cadran inférieur gauche montre la sélection de la population cellulaire infectée avec un virus Nef- (M1). Le cadran inférieur droit montre l'expression de HLA-DR chez les cellules non infectées (noir) et chez les cellules infectées (rouge).

Tableau 2 : Modulation de HLA-DR par Nef pour chaque donneur

(Mean)	Donneur 1	Donneur 2	Donneur 3
Nef +	100,62	72,5	85,4
Nef -	118,83	156,6	172,7

7.1.2 Modulation de l'expression membranaire de CD74 par Nef

La même expérience a été menée pour vérifier l'effet de Nef sur l'expression membranaire de CD74. Selon le même principe, des lymphocytes T CD4 primaires, isolés d'un donneur sain, sont activés et infectés séparément par NL4.3-IRES-HSA ou NL4.3 Δ Nef-IRES-HSA. Après 3 jours d'infection, les cellules sont lavées et marquées avec les anticorps anti-HSA et anti-CD74, tel que décrit précédemment. Des contrôles sont faits pour chaque anticorps ainsi que pour la compensation nécessaire à l'analyse de deux fluorescences différentes en simultanée.

Les cellules infectées, présentes au sein de la population cellulaire, sont sélectionnées par l'expression de la protéine HSA. Les cellules ayant un signal HSA plus intense sont sélectionnées pour l'infection avec NL4.3-IRES-HSA (figure 11, cadran A) et pour l'infection avec NL4.3 Δ Nef-IRES-HSA (figure 11, cadran B). L'expression de CD74 des cellules infectées est mesurée (ligne bleue) et est comparée à celle des cellules non infectées (ligne noire) pour l'infection avec Nef (figure 11, cadran C) ou sans Nef (figure 11, cadran D). En comparant l'expression de CD74 chez les cellules HSA positives des deux infections, on note qu'elle est plus élevée chez les cellules HSA positives provenant de l'infection avec Nef (mean fluorescence: 373,7) que chez les cellules provenant de l'infection sans Nef (mean fluorescence : 110,7). Les cellules HSA positives représentent 9,87% de la population lors de l'infection avec Nef alors qu'elles représentent 10,78% de la population lors de l'infection sans Nef. La présence de Nef durant l'infection engendre donc une augmentation de la présence de CD74 à la surface des cellules infectées. Ces résultats sont similaires à ceux déjà rapportés par d'autres groupes [107]. On peut voir encore une fois que l'expression de CD74 est plus élevée chez les cellules infectées, peu importe la présence de Nef durant l'infection. De plus, l'expression de CD74 est comparable chez les cellules non infectées dans les deux cultures. Cette expérience est représentative de 3 essais avec des lymphocytes CD4⁺ primaires provenant de 3 donneurs différents. Les résultats des 3 donneurs sont présentés dans le tableau 3. Le nombre faible d'événements pour l'expression de CD74 est attribuable au même facteur et l'acquisition d'événement HSA positif est le même (10 000).

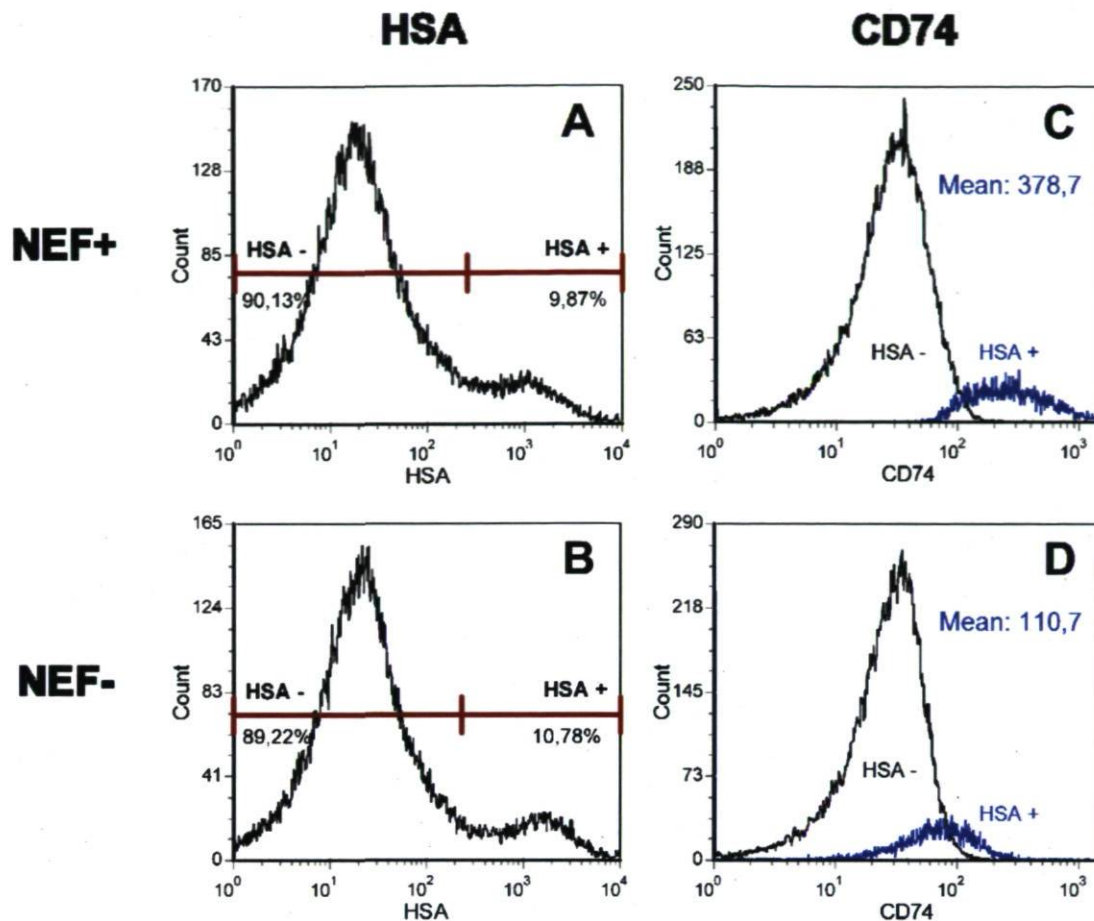


Figure 11 : Modulation de l'expression membranaire de CD74 par Nef

Suite à une infection de 3 jours de lymphocytes T CD4⁺ primaires, l'expression membranaire de la protéine murine HSA et de CD74 est mesurée par cytofluorométrie. Le cadran supérieur gauche montre la sélection de la population cellulaire infectée avec un virus Nef⁺ (M1). Le cadran supérieur droit montre l'expression de CD74 chez les cellules non infectées (noir) et chez les cellules infectées (bleu). Le cadran inférieur gauche montre la sélection de la population cellulaire infectée avec un virus Nef⁻ (M1). Le cadran inférieur droit montre l'expression de CD74 chez les cellules non infectées (noir) et chez les cellules infectées (bleu).

Tableau 3 : Modulation de CD74 par Nef pour chaque donneur

(Mean)	Donneur 1	Donneur 2	Donneur 3
Nef +	378,7	154,1	345,9
Nef -	110,7	124,7	257,2

7.2 Incorporation de CD74 dans l'enveloppe virale

L'incorporation de HLA-DR dans l'enveloppe virale a déjà été démontrée dans des travaux antérieurs, mais l'incorporation de CD74 n'est pas un phénomène ayant déjà été décrit.

Pour ce faire, les cellules Raji-CD4 ont été choisies pour produire les virus nécessaires à un premier essai. Ces cellules étant de lignée lymphocytaire B, elle exprime fortement et de manière constitutive les diverses composantes du CMH-II. Un test de cytofluorométrie a été effectué pour vérifier le niveau d'expression de CD74 à la surface des Raji-CD4 avant d'effectuer les immunocaptures (figure 12 A). Trois échantillons cellulaires provenant de la même culture ont été marqués avec un anticorps isotypique, un anti-CD74 et un anti HLA-DR comme contrôle positif. Tous ces échantillons ont été contre marqués avec les mêmes anticorps secondaires couplés à un fluorochrome PE. Comme le montrent les résultats de la figure 12, le CD74 est exprimé à un degré intermédiaire (40,5 %) comparé au contrôle positif HLA-DR (96,1 %) chez cette lignée cellulaire. L'expression de CD74 demeure franchement supérieure au bruit de fond montré par l'isotype (0,3 %).

Pour vérifier l'incorporation de CD74, un test de capture en plaque a été effectué (figure 12 B). Les Raji-CD4 ont été infectées, tel que décrit dans la section matériel et méthode, pour une période de 5 jours avec un virus isogénique produit à partir du clone NL4.3 par transfection de cellules 293T. Les Raji-CD4, comme mentionné plus haut, sont susceptibles à l'infection grâce à l'expression de la molécule CD4 à leur surface. L'infection de RM3-CD4, en simultané à l'infection des Raji-CD4, sert de contrôle négatif à cette expérience, les RM3-CD4 n'exprimant pas de molécules du CMH-II. Les surnageants cellulaires, suite à l'infection des Raji-CD4 et des RM3-CD4, sont centrifugés pour enlever les débris cellulaires, puis filtrés. Ces surnageants sont utilisés pour un test de capture en plaque, tel que mentionné précédemment. L'anticorps isotypique IgG1 déterminera le bruit de fond. L'anticorps anti-CD3 est utilisé comme contrôle négatif puisque la molécule CD3 n'est pas exprimée chez ces deux lignées cellulaires. L'anti-CD4 et l'anti-CD45 sont utilisés comme contrôle de non-incorporation puisque c'est deux molécules sont connues comme non incorporées, mais sont exprimées par les lignées cellulaires utilisées pour l'expérience. L'anticorps anti-HLA-DR est utilisé à titre de contrôle positif. Le même anticorps, ayant servi à évaluer la présence de CD74 sur les cellules (figure 12A), est utilisé pour la capture en plaque. Tel qu'illustré à la figure 12 B, la quantité de P24 recueillie par la capture avec l'anticorps contre CD74 est similaire à celle de l'isotype et du contrôle négatif anti-CD3, de l'anti-CD4 et l'anti-CD45. Ces résultats laissent croire que CD74 n'est pas incorporé dans l'enveloppe virale. Par contre, la quantité de P24 récupérée par la capture avec l'anti-HLA-

DR montre l'efficacité de l'essai. L'incapacité de récupérer de la P24 avec l'anti-HLA-DR pour l'infection de RM3-CD4 illustre la spécificité de l'essai. Cette capture en plaque a été réalisée à trois reprises et les résultats sont tous similaires: L'absence d'incorporation de CD74 dans l'enveloppe virale malgré l'expression de cette molécule à la surface des Raji-CD4 laisse croire la présence d'un mécanisme, actif ou passif, permettant l'exclusion de cette molécule de l'enveloppe virale malgré qu'elle soit exprimée à la surface de l'enveloppe cellulaire.

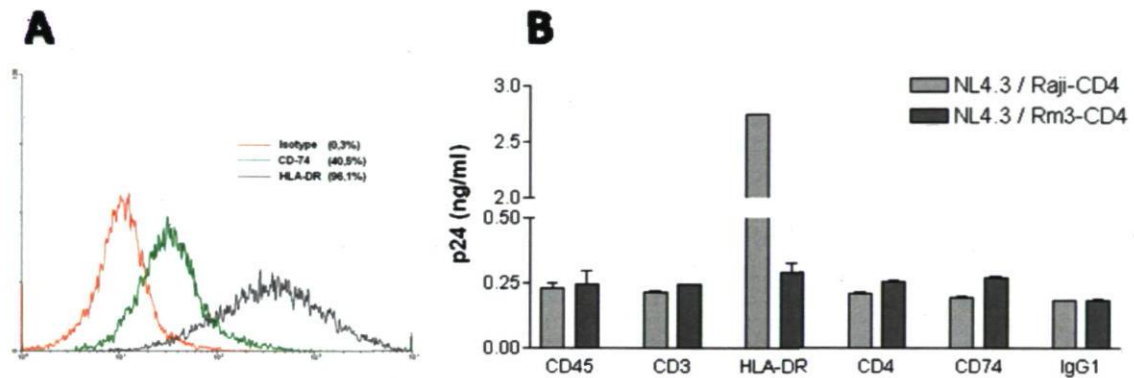


Figure 12 : Incorporation de CD74 dans l'enveloppe virale

A : L'expression à la membrane cytoplasmique de CD74 a été mesurée par cytofluorométrie.

B : L'incorporation de CD74 a été vérifiée à l'aide d'un test de capture en plaque. 25 ng de virus provenant de l'infection de Raji-CD4 ou de Rm3-CD4 ont servi au test de capture. L'anti-CD74 utilisé est le même que pour la figure 12 A. Des anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4 sont utilisés comme contrôle négatif. Un anti-HLA-DR est utilisé comme contrôle positif. Un anticorps isotypique sert à mesurer le bruit de fond.

7.3 Incorporation de HLA-DR et de CD74 lors d'une infection déficiente en Nef

Puisque l'enveloppe virale provient de la membrane cellulaire et que Nef influence l'expression de HLA-DR et de CD74 à la surface de cette dernière, il est facile de croire que Nef peut être impliquée dans le processus d'incorporation de ces molécules. Des immunocaptures ont été effectuées pour vérifier l'impact de la présence de Nef sur l'incorporation de ces deux molécules. Des particules virales isogéniques, exception faite de l'expression de Nef, produites à partir de différents clones moléculaires ont été utilisées pour cette expérience. Ceci permettait d'éliminer toutes les variables ayant trait au virus, à l'exception de leur état d'expression de Nef. Les clones NL4.3 et NL4.3 Δ Nef (tropisme X4), ainsi que les clones NL4.3ADAenv et NL4.3ADAenv Δ Nef (tropisme R5) ont été

utilisés. Les virus isogéniques étaient obtenus par transfection selon la méthode calcium-phosphate de cellule 293T. Ces virus ont servi à infecter des cellules Raji-CD4 (pour les clones de tropisme X4) ainsi que des lymphocytes T CD4⁺ primaires (pour les clones de tropisme X4 et R5). Les virus issus de cette deuxième infection ont servi au test d'immunocapture pour déterminer le statut d'incorporation de HLA-DR et de CD74 dans leur enveloppe virale. Ces résultats sont présentés aux figures 13 et 14. L'utilisation de virus ayant des tropismes différents a pour but d'évaluer l'impact du tropisme de l'enveloppe virale en association avec l'expression de Nef dans le phénomène d'incorporation.

7.3.1 Virus produit à partir d'infection de Raji-CD4

Les cellules Raji-CD4 ont été choisies pour un premier essai, car étant des cellules lymphocytaires B, elle exprime fortement de façon constitutive les diverses composantes du CMH-II. Ainsi, un impact de la présence ou de l'absence de Nef sur l'incorporation de HLA-DR ou de CD74 serait plus facilement détectable. Comme premier essai, un test de capture en plaque a été effectué (figure 13). Les cellules Raji-CD4 ont été infectées avec du virus NL4.3 ou du virus NL4.3 Δ XHO pendant 5 jours. Le surnageant issu de cette infection a été utilisé pour le test de capture en plaque. L'anticorps isotypique est utilisé pour contrôler le bruit de fond. L'anti-HLA-DR 2.06 et l'anti-CD74 Bu45 sont utilisés pour ce test. Puisque l'incorporation de HLA-DR est déjà décrite, la capture pour cette protéine chez la souche sauvage se voulait le contrôle positif. Cette expérience a été menée à trois reprises; la figure 13 présente les résultats de ces trois expériences.

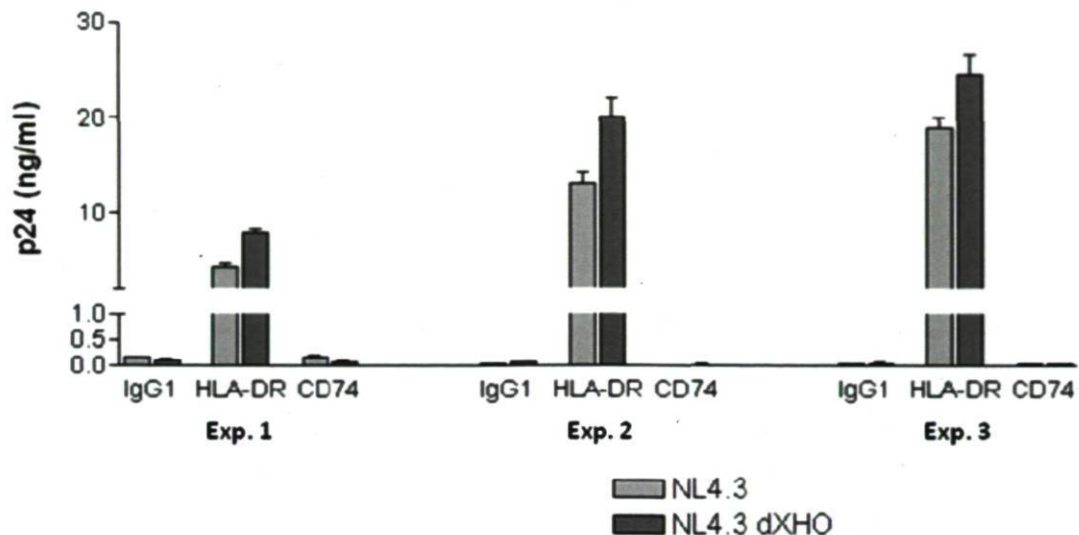


Figure 13 : Incorporation de HLA-DR et de CD74 lors d'infection de Raji-CD4 avec ou sans Nef

Des cellules Raji-CD4 sont infectées avec le virus NL4.3 ou avec le virus NL4.3ΔXHO. L'anti-HLA-DR et l'anti-CD74 sont utilisés pour une capture en plaque où l'on compare la quantité de P24 recueillie pour ces deux virus produits suite à l'infection des Raji-CD4. La figure 13 représente les résultats de 3 essais similaires.

Comme le montre les résultats de la figure 13, il n'y a pas de différences significatives d'incorporation de HLA-DR entre le virus sauvage et le virus déficient en Nef ($P = 0,1331$). De plus, CD74 ne semble pas être incorporé chez le virus déficient en Nef, comme chez la souche sauvage. Ces résultats ont été reproduits à trois reprises. Pour éliminer une variation plus subtile du taux d'incorporation, la même expérience a été reproduite, mais avec une capture basée sur l'utilisation de billes magnétiques (résultats non représentés). Cette méthode se veut plus sensible et permet donc de déceler de plus faible variation. Les résultats obtenus sont très similaires à ceux obtenus par la capture en plaque. Il n'y a pas de variation statistiquement significative de l'incorporation de HLA-DR. CD74 n'est pas incorporée, peu importe la présence ou l'absence de Nef durant l'infection.

Cette expérience montre que l'incorporation de HLA-DR ne semble pas être influencée par la présence ou l'absence de Nef lors de l'infection des Raji-CD4. De plus, CD74 semble demeurer non incorporé, peu importe l'expression de Nef chez les Raji-CD4.

7.3.2 Virus provenant d'infection de lymphocytes T CD4+ primaires

Dans l'optique d'obtenir des résultats se rapprochant le plus possible d'un modèle plus physiologique, les immunocaptures avec billes magnétiques ont été répétées avec du virus

provenant d'une infection de cellules primaires, les lymphocytes T CD4+. En plus de confirmer l'impact de Nef sur l'incorporation de HLA-DR et de CD74 dans un contexte plus physiologique, cette expérience permet de vérifier l'absence d'incorporation de CD74 dans le virus produit avec des cellules primaires. Du sang provenant de quatre donneurs sains a permis d'obtenir des lymphocytes T CD4+ primaires, tel que décrit précédemment. Les donneurs sont identifiés avec la date du don. Les lymphocytes obtenus sont activés selon le protocole décrit dans la section matériels et méthodes. Les cellules provenant de chaque donneur ont été infectées séparément avec 4 souches virales différentes. Les virus utilisés sont NL4.3, NL4.3 Δ Nef, NL4.3ADA-ENV et NL4.3ADA-ENV Δ Nef. Suite à une infection de 5 à 7 jours, la charge virale des différentes cultures a été mesurée et une immunocapture avec billes magnétiques a été faite à partir du surnageant de chacune de ces cultures. La figure 14 A montre les résultats de capture pour HLA-DR lors des infections avec NL4.3 et NL4.3 Δ Nef. Comme on peut le voir, il n'y a pas de différence significative d'incorporation de HLA-DR entre les infections avec ou déficiente en Nef, et ce, pour les 3 donneurs présentés ($P = 0,3514$). L'immunocapture n'a pas été faite pour le quatrième donneur, puisque la charge virale mesurée avant l'immunocapture était très faible, laissant croire à une infection inefficace.

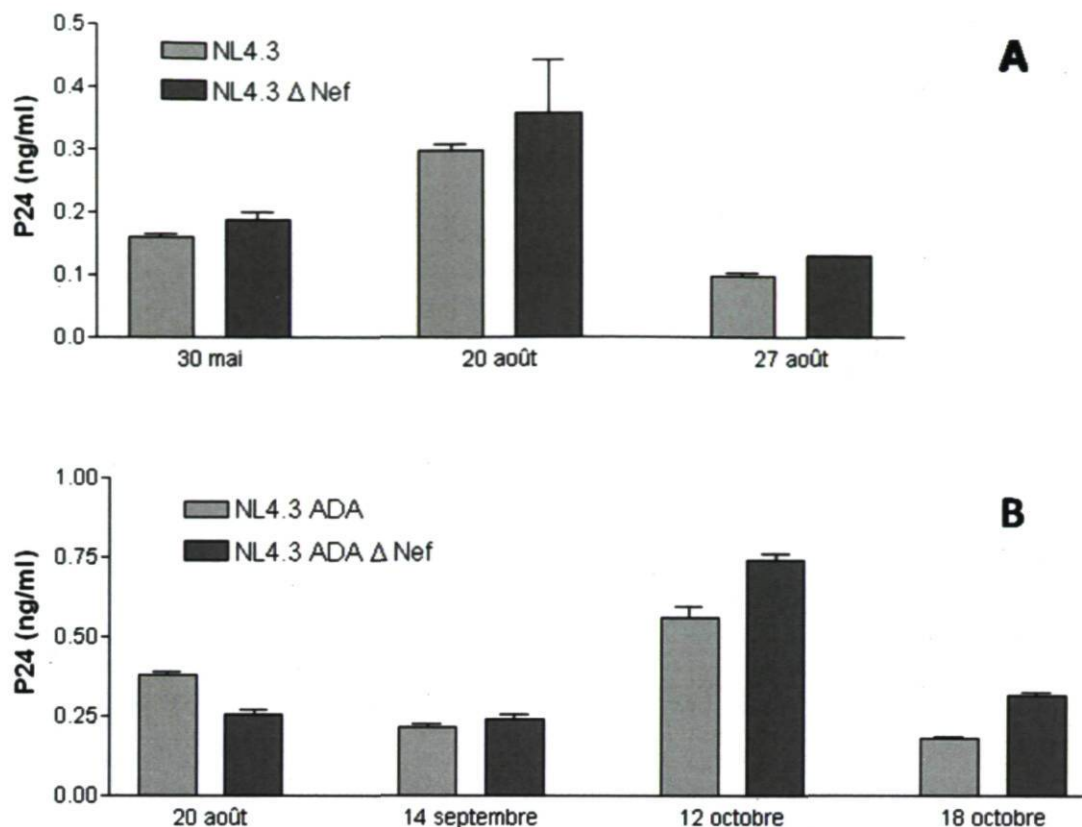


Figure 14 : Incorporation de HLA-DR lors d'infection de lymphocytes T CD4+ primaires avec ou sans Nef

Des lymphocytes CD4+ primaires ont été infectés avec NL4.3 et NL4.3ΔXHO (A), et avec NL4.3ADAenv et NL4.3ADAenvΔNef (B). Des tests d'immunocaptures par billes magnétiques avec un anti-HLA-DR et un anti-CD74 ont été effectués sur les virus issus de ces infections. Il n'y a pas de différence significative de P24 recueillie par l'anti-HLA-DR. L'anti-CD74 n'a pas recueilli de P24.

La figure 14 B montre les résultats de capture pour HLA-DR lors des infections avec NL4.3ADA-ENV et NL4.3ADA-ENVΔNef. Ici aussi, il n'y a pas de différence significative d'incorporation de HLA-DR peu importe l'expression de Nef, chez l'ensemble des quatre donneurs ($P = 0,4104$). L'incorporation de CD74 est indétectable chez l'ensemble des donneurs, peu importe la présence ou l'absence de Nef, ainsi que le tropisme de l'enveloppe virale (résultats non représentés). Ces résultats montrent que Nef n'influence pas l'incorporation de HLA-DR ou de CD74 chez les lymphocytes T CD4+ primaires. De plus, ils montrent que CD74 n'est pas incorporé chez ce type cellulaire.

7.4 Incorporation de HLA-DR et de CD74 lors d'une infection déficiente en Vpu

Tel que décrit dans l'introduction, plusieurs groupes ont montré dernièrement une modulation de HLA-DR par la protéine virale Vpu à la surface des cellules infectées. De plus, une interaction entre les portions intra-cytoplasmiques de Vpu et de CD74 a déjà été décrite. Pour ces raisons, il est possible de croire que Vpu puisse jouer un rôle dans l'incorporation de ces protéines du CMH-II. Pour vérifier cette hypothèse, des infections à l'aide de virus isogéniques, sauf pour l'expression de Vpu, ont servi à produire des échantillons qui ont ensuite été utilisés pour des immunocaptures. Les virus utilisés sont HXBH10, HXBH10-Vpu et HXBH10-Vpu S52,56/D. Ces virus ont un tropisme X4 et sont produits à l'aide d'une transfection au calcium-phosphate de cellule 293T. Le mutant S52,56/D exprime un Vpu déficient en phosphorylation. Il est utilisé ici pour éliminer un rôle possible de la phosphorylation de Vpu dans les mécanismes d'incorporation.

Les cellules Raji-CD4 sont utilisées pour un premier essai. Ces cellules, en plus d'exprimer fortement les protéines du CMH-II, n'expriment pas la molécule CD317. Cette protéine, aussi appelée tetherine, inhibe le relargage du VIH. Elle est inhibée par la protéine virale Vpu. Dans un modèle expérimental où Vpu est absent et où l'on utilise le virus excrété dans le milieu de culture, il est important que cette protéine soit absente pour éliminer un biais de sélection des virus relargués. Un tel biais pourrait fausser les résultats. Une culture de cellules Raji-CD4 a été infectée avec les virus mentionnés ci-haut pendant une période de 5 jours. Le surnageant cellulaire de ces cultures est ensuite centrifugé et filtré, puis la charge virale de chaque culture est mesurée par un test ELISA p24. Ces charges virales sont présentées dans le tableau 4. Le surnageant est ensuite utilisé pour un test d'immunocapture avec billes magnétiques. Une capture est faite pour l'incorporation de HLA-DR avec l'anticorps 2.06 et pour CD74 avec l'anticorps BU45. Les anticorps IgG2a et IgG1 sont utilisés pour définir le bruit de fond de chacun des anticorps. Comme le montre les résultats de la figure 15 A, CD74 ne semble pas être incorporé, peu importe le virus utilisé. Vpu ne semble pas influencer l'incorporation de CD74. HLA-DR, pour sa part, semble être incorporé de façon partielle lors de l'infection avec le mutant de phosphorylation lorsqu'on le compare avec l'infection contenant un Vpu compétent. Lors d'une infection déficiente en

Vpu, HLA-DR semble être très faiblement incorporé. Ces résultats ont été reproduits à 3 reprises.

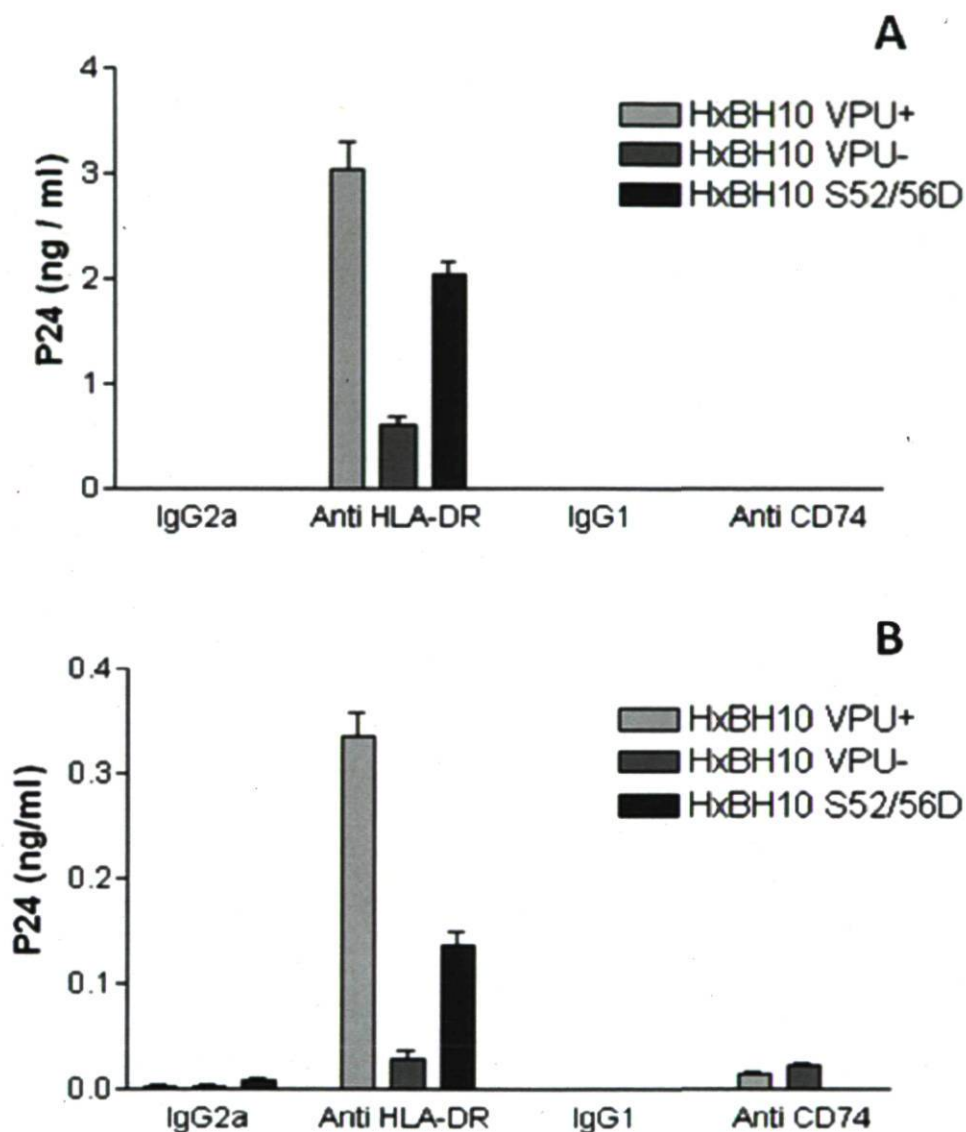


Figure 15 : Incorporation de HLA-DR et de CD74 lors d'infections déficientes en Vpu

Des cellules Raji-CD4 (A) ainsi que des lymphocytes CD4⁺ primaire (B) ont été infectées avec les virus HxBH10, HxBH10-Vpu⁻ et HxBH10-Vpu S52,56/D. Le virus produit par ces infections a servi à un test d'immunocapture par billes magnétiques avec un anti-HLA-DR (2.06) et un anti-CD74 (BU45).

Tableau 4 : Charge virale mesurée en ng/mL de P24 pour différentes productions virales

(ng/mL)	HXBH10 Vpu+	HXBH10 Vpu-	HXBH10 Vpu S52,56/D
Raji-CD4	28,67	27,84	84,94
LT CD4 ⁺ primaire	175,40	57,58	141,70

Dans l'optique de présenter un modèle plus physiologique, la même expérience a été répétée avec des cellules primaires (figure 15 B). Des lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés à partir de sang provenant d'un donneur sain. Après avoir été activés, ces lymphocytes ont été infectés séparément par les 3 mêmes virus que pour la figure 15 A, soit HXBH10, HXBH10-Vpu⁻ et HXBH10-Vpu S52,56/D. Suite à une infection de 7 jours, la charge virale des trois cultures a été mesurée à l'aide d'un test ELISA p24. Ces charges virales sont présentées dans le tableau 4. Le surnageant, centrifugé et filtré, a subi ensuite un test d'immunocapture avec billes magnétiques pour les molécules HLA-DR et CD74. Les mêmes anticorps que ci-dessus ont été utilisés. Les résultats obtenus sont très similaires à ceux de la figure 15 A. Comme le montre les résultats de la figure 15 B, l'incorporation de HLA-DR est maximale avec un Vpu entier et fonctionnel, elle est partielle avec un Vpu incapable de phosphorylation et est minimale, à peine supérieur à la quantité de virus recueillie par l'isotype, lorsque Vpu est absent. Cependant, une faible quantité de P24 est récupérés avec CD74 pour les virus avec un Vpu entier et les virus avec le Vpu mutant; cette quantité étant à peine supérieure à celle de l'isotype. La P24 est indétectable pour la capture avec CD74 lors de l'infection déficiente en Vpu. Ces résultats n'ont pas encore été reproduits avec d'autres donneurs. D'autres essais sont donc nécessaires pour s'assurer qu'ils sont significatifs.

8. Discussion

Plusieurs protéines sont incorporées dans l'enveloppe du VIH-1, dont HLA-DR [68, 81, 115]. Les protéines HLA-DR incorporées sont fonctionnelles, capables de présenter un peptide antigénique et même capables de stimuler le récepteur de lymphocytes T (TCR) en combinaison avec une molécule de costimulation comme CD86. C'est donc un complexe mature du CMH-II qui est incorporé dans l'enveloppe du VIH-1. Très peu d'études ont vérifié et caractérisé l'incorporation des autres composantes du CMH-II comme HLA-DQ, HLA-DO, HLA-DM ou le complexe de présentation antigénique immature HLA-DR / CD74. De plus, on ne connaît pas le mécanisme exact pour expliquer la très forte incorporation de HLA-DR même si plusieurs mécanismes sont proposés.

D'autre part, certaines protéines accessoires du VIH-1 sont connues pour moduler l'expression membranaire de certaines composantes du CMH-II. Nef est connue pour augmenter l'expression des complexes immatures du CMH-II à la surface cellulaire en diminuant la réinternalisation médiée par CD74 par compétition avec la protéine AP-2. Nef est aussi connue pour diminuer l'expression de molécule HLA-DR mature à la surface cellulaire. Le mécanisme semble être la stimulation d'une voie de réinternalisation constitutive de HLA-DR par Nef. Aussi, la diminution d'expression de HLA-DR est peut-être en partie une conséquence de la rétention des complexes immatures à la surface cellulaire, diminuant ainsi le nombre de HLA-DR transitant dans les différents compartiments du CMH-II pour devenir mature. La protéine virale Vpu est aussi connue pour diminuer l'expression membranaire de HLA-DR. Ce phénomène est cependant plus tardif dans l'infection cellulaire. Vpu n'est pas connu pour moduler l'expression de CD74, mais une interaction entre les portions intracytoplasmiques de ces 2 protéines a déjà été décrite. Aucun lien n'a été décrit entre cette interaction et la diminution d'expression de HLA-DR induite par Vpu.

Puisque Nef et Vpu modulent l'expression à la membrane cytoplasmique des protéines du CMH-II et que c'est cette même membrane qui sert d'enveloppe virale au VIH-1, il est plausible que Nef et Vpu jouent un rôle dans l'incorporation des composantes du CMH-II.

8.1 Nef module l'expression de HLA-DR et de CD74 à la surface des cellules infectées

Avant de vérifier le rôle de Nef ou de Vpu dans l'incorporation des protéines du CMH-II, nous avons voulu confirmer les résultats affirmant que Nef module l'expression membranaire de HLA-DR et de CD74. Pour ce faire, nous avons utilisé des lymphocytes T CD4⁺ primaires pour que notre modèle soit le plus physiologique possible. Ces cellules sont le principal hôte cellulaire chez les individus infectés. De plus, nous avons utilisé un virus portant un ires-HSA, permettant l'expression de la protéine murine HSA à la surface des cellules infectées, les rendant ainsi plus facile à cibler à l'aide d'anticorps par cytofluorométrie.

Tel que déjà décrit, nos résultats montrent que Nef provoque une augmentation de l'expression de CD74 à la surface des cellules infectées ainsi qu'une diminution de l'expression de HLA-DR. Cette modulation des composantes du CMH-II procure un avantage immunologique théorique au VIH-1 en diminuant l'efficacité de la présentation antigénique par le CMH-II de la cellule infectée, diminuant ainsi la réponse adaptée face à ce pathogène et permettant son évasion. Un des avantages de notre modèle est qu'il nous permet de voir le niveau d'expression de HLA-DR et de CD74 chez la population de cellules non infectées (soit HSA négative). Les cellules HSA négatives représentent une population de cellule hétérogène quant à leur niveau d'activation cellulaire, pouvant être de cellules inactivées à cellules activées sans avoir été infectées. Cette variation a comme répercussion une variation du taux d'expression de certaines protéines membranaires pouvant être induites par l'activation cellulaire, comme HLA-DR. Malgré une diminution de l'expression de HLA-DR par Nef, l'expression de HLA-DR chez les cellules infectées demeure supérieure à celle de la population HSA négative. Ceci nous permet de penser que l'avantage immunologique conféré par cette modulation n'est pas parfait puisque, bien que l'expression de HLA-DR soit diminuée chez les cellules infectées, elle demeure augmentée en comparaison à la population non infectée (figure 10). Cette augmentation peut être due à un mécanisme de défense immunitaire des cellules infectées, voir une tentative de présentation antigénique par le CMH-II. Elle peut aussi être secondaire à une sélection des cellules fortement activées par le virus, donnant un niveau de base de HLA-DR augmenté.

Une telle sélection de cellules fortement activées pourrait être la cause de résultat faussement positif.

Les virus déficients en Nef sont moins infectieux. Si, pour avoir une réplication significative, ils doivent infecter des cellules fortement activées, peut-être que le niveau de HLA-DR augmenté lors de l'infection déficiente en Nef n'est que le reflet d'une activation cellulaire plus importante nécessaire à ce genre d'infection. Il n'y aurait donc pas de diminution d'expression de HLA-DR par Nef, mais une expression plus grande lors de l'infection déficiente en Nef puisque celle-ci requiert un niveau d'activation plus grand. Ce biais est peu probable dans l'expérience que nous avons menée. La transcription de la protéine HSA par l'intermédiaire d'une séquence IRES permet l'expression de cette protéine à la surface cellulaire même si le virus n'est pas transcrit. Il doit seulement être entré dans la cellule. Ceci nous permet donc de considérer les cellules plus faiblement activées où le virus est entré, donc des cellules infectées, mais où l'expression de HLA-DR n'est pas augmentée par l'activation et où il n'y a peut-être pas de production virale. Puisque l'entrée virale survient avant la transcription de Nef, on élimine le biais de sélection cellulaire en considérant toutes les cellules susceptibles aux virus, peu importe la présence ou l'absence de Nef. De plus, d'autres groupes ont mené des expériences de transfection de Nef dans des cellules exprimant HLA-DR et ont observé le même phénomène. Dans leur expérience, puisqu'il n'y avait pas d'infection, un tel biais de sélection n'était pas possible. L'infection de cellules plus fortement activées par les virus déficients en Nef n'est qu'une hypothèse. D'autre part, certain groupe ont montré que Nef augmentait l'activation cellulaire [37]. Il serait intéressant de refaire les expériences de modulation de HLA-DR en ajoutant un marqueur d'activation cellulaire, pour voir s'il y a une corrélation entre les modulations observées et l'activation cellulaire.

8.2 Les complexes immatures de CMH-II ne sont pas incorporés dans l'enveloppe virale

En contraste avec les HLA-DR matures et fonctionnelles qui sont incorporées, nous avons voulu vérifier si les complexes CMH-II immatures sont aussi incorporés dans l'enveloppe virale. Ce complexe est composé de protéine HLA-DR ayant leur niche peptidique occupée par le fragment clip de la protéine CD74. Pour vérifier si cette incorporation a lieu, nous

avons infecté des cellules Raji-CD4. Ces cellules sont de lignée lymphocytaire B, elle exprime fortement tout le CMH-II. Nous avons pensé qu'une telle infection rendrait l'incorporation de CD74 maximale, si elle a lieu. CD74 ne semble pas être incorporé dans les virus provenant de cette lignée cellulaire. Nous avons ensuite vérifié son incorporation dans des lymphocytes T CD4+ primaires. Nous avons aussi utilisé plusieurs constructions virales différentes. Les niveaux de p24 recueilli lors de toutes ces immunocaptures sont demeurés comparables aux contrôles isotypiques. CD74 semble donc ne pas être incorporé, peu importe la souche virale ou le type cellulaire. Il est à noter que notre seuil de détection n'est pas parfait et que CD74 pourrait être incorporé à des taux très faibles sous notre seuil de détection. De plus, nous n'avons pas tenté de vérifier l'incorporation de CD74 avec des virus produits à partir de macrophage, de cellule dendritique ou de monocyte. Dans la réponse immunitaire physiologique, les cellules de lignée monocytaire sont, avec les lymphocytes B, les principales cellules présentatrices d'antigènes; donc exprimant fortement le CMH-II. Il serait intéressant de compléter ces expériences avec des immunocaptures sur des virus produits par ces types cellulaires. Cependant, les résultats risquent d'être très similaires puisque nous n'avons obtenu aucune réponse avec les Raji-CD4, qui sont de lignée lymphocytaire B, et que la capture de virion par HLA-DR fonctionne très bien avec des virus produit par des lymphocytes T, même si ce type cellulaire n'est pas celui qui exprime le plus fortement le CMH-II.

Au niveau physiopathologique, l'incorporation d'un HLA-DR mature et fonctionnel permettrait au virus de se lier à ses cellules cibles et même de les activer, facilitant l'infection. D'autre part, il est logique que CD74 ne soit pas incorporé. Détenir des complexes CMH-II immatures dans son enveloppe n'aurait pas les mêmes avantages pour le virus. De plus, une telle incorporation pourrait même nuire au virus. L'interaction entre un TCR et un complexe CMH-II immature pourrait théoriquement réprimer l'activation d'un lymphocyte T, voir même induire la tolérance ou la mort cellulaire à la cellule qui autrement aurait été susceptible à l'infection.

De plus, CD74 est connue pour agir comme récepteur de signaux de différenciation monocytaire lorsqu'il est stimulé par MIF (Macrophage migration inhibitory factor) [95]. MIF est aussi connue pour stimuler la prolifération cellulaire [94]. L'incorporation de

CD74 pourrait ainsi favoriser la prolifération cellulaire de monocytes ciblés par le virus, ce qui n'est pas nécessairement avantageux pour ce dernier.

8.3 Nef n'influence pas l'incorporation des composantes du CMH-II dans l'enveloppe virale

Puisque Nef influence l'expression membranaire de HLA-DR et de CD74 (figures 10 et 11), nous avons voulu vérifier si Nef influence leur incorporation dans l'enveloppe virale. CD74 est augmenté à la surface cellulaire par Nef (figure 11). De plus, certains groupes ont montré que le virus bourgeonne dans des compartiments similaires à celui du CMH-II [64]. Peut-être que Nef empêche l'incorporation de CD74 en le maintenant à la surface cellulaire et qu'en son absence dans ces compartiments, CD74 sera incorporé. Il semble que non. Peu importe la présence ou l'absence de Nef, CD74 demeure non incorporé. Nef ne semble pas non plus avoir d'influence sur l'incorporation de HLA-DR. Bien que Nef semble promouvoir le bourgeonnement viral via les radeaux lipidiques [39] et que HLA-DR soit exprimé dans ces radeaux, l'incorporation de HLA-DR demeure similaire pour un même donneur lors des infections avec ou sans Nef. Ces résultats suggèrent la présence d'un autre facteur, viral ou cellulaire, pouvant sélectionner ou exclure HLA-DR et CD74 de la membrane lors du bourgeonnement viral. Ces résultats peuvent aussi suggérer que le bourgeonnement viral survient dans un compartiment distinct, autre que la membrane cytoplasmique ou que le compartiment du CMH-II. Ainsi, le virus serait en mesure d'incorporer les protéines présentes dans la membrane de ce compartiment, peu importe les modulations d'expression à la membrane cellulaire. Dans un même ordre d'idée, puisqu'il existe plusieurs types de radeaux lipidiques et domaines membranaires [61, 122], il est possible que le bourgeonnement survient dans des radeaux lipidiques différents de ceux où sont exprimés HLA-DR et CD74 à la surface cellulaire. Ainsi, peu importe leur modulation, le taux d'incorporation pourrait être constant. Malheureusement, encore peu est connu sur ce sujet.

8.4 Vpu joue un rôle dans le processus d'incorporation de HLA-DR

Vpu influence l'expression de HLA-DR et est un ligand de CD74. De plus, Vpu co-localise avec la tetherine pour l'inhiber, molécule qui maintient le virus lié à la membrane cellulaire au site de bourgeonnement. Nous avons donc pensé que Vpu pouvait lui aussi jouer un rôle dans l'incorporation de HLA-DR et de CD74. Les infections avec un virus déficient en Vpu ont montré un niveau d'incorporation de HLA-DR très faible, suggérant que Vpu sélectionne HLA-DR pour son incorporation ou le dirige vers le bon compartiment ou le bon radeau lipidique. Le mutant non phosphorylé de Vpu permet une incorporation partielle de HLA-DR. Ceci suggère qu'une interaction avec Vpu seule peut permettre l'incorporation de HLA-DR, mais qu'elle n'est pas suffisante pour une incorporation maximale. Vpu est connu pour interagir avec le cofacteur cellulaire β -TrCP par des interactions de phosphorylation [123]. β -TrCP est un récepteur pour l'enzyme "multi-subunit ubiquitin ligase" impliquée dans les voies de conjugaison par l'ubiquitine [124]. Ces ubiquitinations peuvent promouvoir le transfert de certaines molécules vers d'autres compartiments. Physiologiquement, elles servent entre autres à la réinternalisation de HLA-DR présente à la surface cellulaire. Nous pensons donc que Vpu sélectionne les molécules HLA-DR via un phénomène d'ubiquitination vers le compartiment où a lieu le bourgeonnement viral. Les résultats obtenus avec les virus mutants de Vpu peuvent aussi suggérer que la cinétique de l'infection est différente avec de tels virus. Cette avenue devrait aussi être approfondie.

Vpu est connue pour interagir avec CD74, mais ne semble pas influencer son niveau d'incorporation. Les molécules de HLA-DR sélectionnées pour l'incorporation étaient peut-être initialement liées à un CD74, où l'interaction Vpu-CD74 a permis l'ubiquitination de HLA-DR, permettant ainsi sa relocalisation vers le compartiment où surviennent le bourgeonnement et l'incorporation dans l'enveloppe virale. Dans le même ordre d'idée, peut-être n'y a-t-il pas de changement de compartiment, mais un changement du type de radeau lipidique dans lequel HLA-DR est exprimé en présence de Vpu. De ce fait, HLA-DR se retrouverait au sein des mêmes radeaux lipidiques où survient le bourgeonnement viral et non le CD74.

Des expériences additionnelles sont nécessaires pour vérifier ces hypothèses. Il serait intéressant de vérifier si les molécules HLA-DR incorporées ont un patron d'ubiquitination différents de celles non incorporées. Il serait aussi intéressant de comparer l'ubiquitination des HLA-DR chez des cellules infectées avec ou sans Vpu. Pour ce faire, des tests d'immunoprécipitation ou des immunocaptures, suivies de gel de protéine permettant la détection de l'ubiquitine pourraient mettre en évidence des phénomènes d'ubiquitination provoqués par Vpu et nécessaire à l'incorporation de HLA-DR. La colocalisation de CD74 avec le virus qui bourgeonne, même s'il n'est pas incorporé, ou sa colocalisation avec Vpu pourrait être vérifiée en microscopie. De même, la distribution cellulaire de HLA-DR pourrait être comparée entre des cellules infectées avec et sans Vpu. L'utilisation de fluoromicroscopie ou de microscopie confocale pourrait être très pertinente à ses essais. Cette information permettrait d'évaluer l'importance des différents compartiments cellulaires dans l'incorporation.

Un médicament interfère avec la prénylation des GTPases Rab et Rho, et a pour effet de perturber le trafic de HLA-DR et de l'exclure des radeaux lipidiques. Il s'agit du SIMVASTATIN [125]. Ce médicament semble affecter de façon préférentielle le trafic de HLA-DR induit par la chaîne invariante, pour ainsi l'exclure des radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques même ne présentent aucune perturbation mesurable. Dans le contexte de l'incorporation de HLA-DR lors de l'infection au VIH-1, pour vérifier l'importance de la localisation de cette molécules dans les radeaux lipidiques, un traitement des cellules avec du SIMVASTATIN préalablement à l'infection pourrait être utilisé. Un tel traitement préalable à des infections avec ou sans Vpu permettrait de vérifier si l'impact de Vpu sur l'incorporation de HLA-DR passe par l'expression de cette molécule au sein des radeaux lipidiques. Ces essais pourraient donc être envisagés pour répondre à cette question.

Conclusion

Nef module à la hausse CD74 à la surface des cellules infectées et réprime l'expression de HLA-DR. Ce phénomène, déjà connu, a été vérifié à l'aide d'un modèle expérimental différent, ce qui renforce les certitudes sur la survenue de ce phénomène. Bien que Nef provoque ces effets sur l'expression de HLA-DR et de CD74, il n'influence pas leur incorporation dans l'enveloppe virale. HLA-DR demeure fortement incorporé alors que CD74 n'est pas incorporé dans aucun cas, peu importe la présence ou l'absence de Nef. Vpu, connu pour son interaction avec CD74 et sa modulation à la baisse de l'expression membranaire de HLA-DR, permet l'incorporation optimale de HLA-DR. L'absence de Vpu entraîne une faible incorporation de HLA-DR. Le mutant de phosphorylation de Vpu permet une incorporation partielle de HLA-DR suggérant un rôle joué par la phosphorylation de Vpu dans ce phénomène. Vpu n'influence pas l'incorporation de CD74, qui demeure non incorporée ou l'est à une quantité non détectable.

Le HIV-1 incorpore donc de façon sélective les complexes CMH-II matures. Bien que des hypothèses soient jetées sur les mécanismes probables permettant l'incorporation de HLA-DR, plusieurs expériences sont encore essentielles pour les bien caractériser. La compréhension des mécanismes essentiels à cette incorporation augmente nos connaissances sur ce virus et vise l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Le rôle physiopathologique de l'incorporation de HLA-DR est encore mal connu, mais a certes, une importance dans l'évolution de l'infection au VIH-1 compte tenue du rôle de HLA-DR dans l'élaboration d'une réponse immunitaire spécifique et de l'activation des lymphocytes T CD4+.

Bibliographie

1. *Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1981. **30**(25): p. 305-8.
2. *Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1982. **31**(48): p. 652-4.
3. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
4. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes.* Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
5. Marx, P.A., C. Apetrei, and E. Drucker, *AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics.* J Med Primatol, 2004. **33**(5-6): p. 220-6.
6. Marx, P.A., et al., *Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a west African pet sooty mangabey.* J Virol, 1991. **65**(8): p. 4480-5.
7. ONUSIDA, *Rapport sur l'épidémie mondiale de sida.* 2008.
8. Canada, A.d.l.s.p.d., *Actualités en épidémiologie sur le VIH/sida.* novembre 2007.
9. Gerald L. Mandell, J.E.B., Raphael Dolin, *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 7th ed. 2010: Expert Consult Premium Edition. 4320.
10. Brenchley, J.M., et al., *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract.* J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 749-59.
11. Locher, C.P., et al., *Differential effects of R5 and X4 human immunodeficiency virus type 1 infection on CD4+ cell proliferation and activation.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 4): p. 1171-9.
12. Jiang, W., et al., *Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection.* J Infect Dis, 2009. **199**(8): p. 1177-85.
13. McMichael, A.J. and S.L. Rowland-Jones, *Cellular immune responses to HIV.* Nature, 2001. **410**(6831): p. 980-7.
14. Rosenberg, E.S., et al., *Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia.* Science, 1997. **278**(5342): p. 1447-50.
15. Coiras, M., et al., *Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs.* Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(11): p. 798-812.
16. Molina-Pinelo, S., et al., *Premature immunosenescence in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low-level CD4 T cell repopulation.* J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(3): p. 579-88.
17. Kestens, L., et al., *Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection.* Clin Exp Immunol, 1994. **95**(3): p. 436-41.
18. Peters, B.S., *The basis for HIV immunotherapeutic vaccines.* Vaccine, 2001. **20**(5-6): p. 688-705.

19. Rerks-Ngarm, S., et al., *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand*. N Engl J Med, 2009. **361**(23): p. 2209-20.
20. Pancre, V., et al., *Novel promiscuous HLA-DQ HIV Nef peptide that induces IFN-gamma-producing memory CD4+ T cells*. Clin Exp Immunol, 2002. **129**(3): p. 429-37.
21. Depil, S., et al., *Peptide-binding assays and HLA II transgenic Abeta degrees mice are consistent and complementary tools for identifying HLA II-restricted peptides*. Vaccine, 2006. **24**(13): p. 2225-9.
22. Gonda, M.A., *Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **724**: p. 22-42.
23. Weiss, R.A., *The discovery of endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 67.
24. Gibbs, J.S., D.A. Regier, and R.C. Desrosiers, *Construction and in vitro properties of HIV-1 mutants with deletions in "nonessential" genes*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. **10**(4): p. 343-50.
25. Malim, M.H. and M. Emerman, *HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 388-98.
26. Adamson, C.S. and E.O. Freed, *Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation*. Adv Pharmacol, 2007. **55**: p. 347-87.
27. Ganser-Pornillos, B.K., M. Yeager, and W.I. Sundquist, *The structural biology of HIV assembly*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(2): p. 203-17.
28. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 1-25.
29. Strebel, K., *HIV accessory genes Vif and Vpu*. Adv Pharmacol, 2007. **55**: p. 199-232.
30. Henriot, S., et al., *Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(2): p. 211-32.
31. Aiken, C. and D. Trono, *Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 5048-56.
32. Das, S.R. and S. Jameel, *Biology of the HIV Nef protein*. Indian J Med Res, 2005. **121**(4): p. 315-32.
33. Miller, M.D., et al., *The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 101-13.
34. Roeth, J.F. and K.L. Collins, *Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(2): p. 548-63.
35. Costa, L.J., et al., *Interactions between Nef and AIP1 proliferate multivesicular bodies and facilitate egress of HIV-1*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 33.
36. Coleman, S.H., et al., *Leucine-specific, functional interactions between human immunodeficiency virus type 1 Nef and adaptor protein complexes*. J Virol, 2005. **79**(4): p. 2066-78.
37. Shapira-Nahor, O., et al., *Replication of HIV-1 deleted Nef mutants in chronically immune activated human T cells*. Virology, 2002. **303**(1): p. 138-45.

38. Schindler, M., et al., *Association of Nef with p21-activated kinase 2 is dispensable for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and cytopathicity in ex vivo-infected human lymphoid tissue.* J Virol, 2007. **81**(23): p. 13005-14.
39. Zheng, Y.H., et al., *Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts.* Curr Biol, 2001. **11**(11): p. 875-9.
40. Keppler, O.T., et al., *Modulation of specific surface receptors and activation sensitization in primary resting CD4⁺ T lymphocytes by the Nef protein of HIV-1.* J Leukoc Biol, 2006. **79**(3): p. 616-27.
41. Schindler, M., et al., *Nef alleles from children with non-progressive HIV-1 infection modulate MHC-II expression more efficiently than those from rapid progressors.* Aids, 2007. **21**(9): p. 1103-7.
42. Pandori, M., et al., *Virological importance of the protease-cleavage site in human immunodeficiency virus type 1 Nef is independent of both intravirion processing and CD4 down-regulation.* Virology, 1998. **251**(2): p. 302-16.
43. Baugh, L.L., J.V. Garcia, and J.L. Foster, *Functional characterization of the human immunodeficiency virus type 1 Nef acidic domain.* J Virol, 2008. **82**(19): p. 9657-67.
44. Terwilliger, E.F., et al., *Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): p. 5163-7.
45. Nomaguchi, M., M. Fujita, and A. Adachi, *Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis.* Microbes Infect, 2008. **10**(9): p. 960-7.
46. Wittlich, M., B.W. Koenig, and D. Willbold, *Structural consequences of phosphorylation of two serine residues in the cytoplasmic domain of HIV-1 VpU.* J Pept Sci, 2008. **14**(7): p. 804-10.
47. Willey, R.L., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4.* J Virol, 1992. **66**(12): p. 7193-200.
48. Yao, X.J., et al., *Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export.* J Virol, 1992. **66**(8): p. 5119-26.
49. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu.* Nature, 2008. **451**(7177): p. 425-30.
50. Gottlinger, H.G., *HIV/AIDS: virus kept on a leash.* Nature, 2008. **451**(7177): p. 406-8.
51. Tokarev, A., et al., *Antiviral Activity of the Interferon-Induced Cellular Protein BST-2/Tetherin.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2009.
52. Waheed, A.A., et al., *Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 assembly and release by the cholesterol-binding compound amphotericin B methyl ester: evidence for Vpu dependence.* J Virol, 2008. **82**(19): p. 9776-81.
53. Tiganos, E., et al., *Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein.* Virology, 1998. **251**(1): p. 96-107.
54. Kerkau, T., et al., *The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules.* J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1295-305.
55. Tilton, J.C. and R.W. Doms, *Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection.* Antiviral Res, 2009.

56. Goodenow, M.M. and R.G. Collman, *HIV-1 coreceptor preference is distinct from target cell tropism: a dual-parameter nomenclature to define viral phenotypes*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(5): p. 965-72.
57. Carter, C.A. and L.S. Ehrlich, *Cell biology of HIV-1 infection of macrophages*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 425-43.
58. Paiardini, M., et al., *Lessons learned from the natural hosts of HIV-related viruses*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 485-95.
59. Freed, E.O. and A.J. Mouland, *The cell biology of HIV-1 and other retroviruses*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 77.
60. Romani, B., S. Engelbrecht, and R.H. Glashoff, *Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1*. J Gen Virol, 2009.
61. Waheed, A.A. and E.O. Freed, *Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 162-76.
62. Luo, C., et al., *The functional roles of lipid rafts in T cell activation, immune diseases and HIV infection and prevention*. Cell Mol Immunol, 2008. **5**(1): p. 1-7.
63. Bieniasz, P.D., *The cell biology of HIV-1 virion genesis*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(6): p. 550-8.
64. Finzi, A., et al., *Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9789-97.
65. Jouvenet, N., et al., *Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly*. PLoS Biol, 2006. **4**(12): p. e435.
66. Tremblay, M.J., J.F. Fortin, and R. Cantin, *The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1*. Immunol Today, 1998. **19**(8): p. 346-51.
67. Stevenson, M., *HIV-1 pathogenesis*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 853-60.
68. Cantin, R., S. Methot, and M.J. Tremblay, *Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6577-87.
69. Lando, Z., et al., *Association of human T-cell leukaemia/lymphoma virus with the Tac antigen marker for the human T-cell growth factor receptor*. Nature, 1983. **305**(5936): p. 733-6.
70. Knox, P.G. and L.S. Young, *Epstein-Barr virus infection of CR2-transfected epithelial cells reveals the presence of MHC class II on the virion*. Virology, 1995. **213**(1): p. 147-57.
71. Wright, J.F., et al., *Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 4784-91.
72. Rossio, J.L., et al., *HLA class II on HIV particles is functional in superantigen presentation to human T cells: implications for HIV pathogenesis*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**(12): p. 1433-9.
73. Fortin, J.F., et al., *Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 3588-96.
74. Hoxie, J.A., et al., *Nonrandom association of cellular antigens with HTLV-III virions*. Hum Immunol, 1987. **18**(1): p. 39-52.
75. Ott, D.E., et al., *Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7734-43.
76. Cosson, P., *Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1*. Embo J, 1996. **15**(21): p. 5783-8.

77. Martin, G. and M.J. Tremblay, *HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L, and CD86 are incorporated to a similar degree into clinical human immunodeficiency virus type 1 variants expanded in natural reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured ex vivo*. Clin Immunol, 2004. **111**(3): p. 275-85.
78. Losier, M., et al., *Virion-bound ICAM-1 and activated LFA-1: a combination of factors conferring resistance to neutralization by sera from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals independently of the disease status and phase*. Clin Immunol, 2003. **108**(2): p. 111-8.
79. Bounou, S., et al., *The importance of virus-associated host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 dissemination depends on the cellular context*. Faseb J, 2004. **18**(11): p. 1294-6.
80. Martin, G., et al., *Human immunodeficiency virus type 1-associated CD40 ligand transactivates B lymphocytes and promotes infection of CD4+ T cells*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5872-81.
81. Cantin, R., G. Martin, and M.J. Tremblay, *A novel virus capture assay reveals a differential acquisition of host HLA-DR by clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 expanded in primary human cells depending on the nature of producing cells and the donor source*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 12): p. 2979-87.
82. Lakhashe, S.K., et al., *Quantitation of HLA proteins incorporated by human immunodeficiency virus type 1 and assessment of neutralizing activity of anti-HLA antibodies*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 428-34.
83. Roy, J., et al., *HIV type 1 can act as an APC upon acquisition from the host cell of peptide-loaded HLA-DR and CD86 molecules*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4779-88.
84. Sullivan, B.A., N.A. Nagarajan, and M. Kronenberg, *CD1 and MHC II find different means to the same end*. Trends Immunol, 2005. **26**(5): p. 282-8.
85. Matucci, A., et al., *HLA-C increases HIV-1 infectivity and is associated with gp120*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 68.
86. Bryant, P. and H. Ploegh, *Class II MHC peptide loading by the professionals*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 96-102.
87. Matza, D., A. Kerem, and I. Shachar, *Invariant chain, a chain of command*. Trends Immunol, 2003. **24**(5): p. 264-8.
88. Stein, R., et al., *CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(18 Pt 2): p. 5556s-5563s.
89. Cresswell, P., *Invariant chain structure and MHC class II function*. Cell, 1996. **84**(4): p. 505-7.
90. Podolin, P.L., et al., *Inhibition of invariant chain processing, antigen-induced proliferative responses, and the development of collagen-induced arthritis and experimental autoimmune encephalomyelitis by a small molecule cysteine protease inhibitor*. J Immunol, 2008. **180**(12): p. 7989-8003.
91. Berger, A.C. and P.A. Roche, *MHC class II transport at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 1): p. 1-4.
92. Roche, P.A., et al., *Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8581-5.

93. Koch, N., et al., *Rapid intracellular pathway gives rise to cell surface expression of the MHC class II-associated invariant chain (CD74)*. J Immunol, 1991. **147**(8): p. 2643-51.
94. Starlets, D., et al., *Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4807-16.
95. Leng, L., et al., *MIF signal transduction initiated by binding to CD74*. J Exp Med, 2003. **197**(11): p. 1467-76.
96. Naujokas, M.F., et al., *The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44*. Cell, 1993. **74**(2): p. 257-68.
97. Sekaly, R.P., et al., *Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain*. J Exp Med, 1986. **164**(5): p. 1490-504.
98. Wraight, C.J., et al., *Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface*. J Biol Chem, 1990. **265**(10): p. 5787-92.
99. Rocha, N. and J. Neefjes, *MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation*. Embo J, 2008. **27**(1): p. 1-5.
100. Chen, X. and P.E. Jensen, *MHC class II antigen presentation and immunological abnormalities due to deficiency of MHC class II and its associated genes*. Exp Mol Pathol, 2008. **85**(1): p. 40-4.
101. Bouillon, M., et al., *Lipid raft-dependent and -independent signaling through HLA-DR molecules*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7099-107.
102. Zilber, M.T., et al., *MHC class II/CD38/CD9: a lipid-raft-dependent signaling complex in human monocytes*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3074-81.
103. Shin, J.S., et al., *Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination*. Nature, 2006. **444**(7115): p. 115-8.
104. Barriere, H., et al., *Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(10): p. 3952-65.
105. Stumptner-Cuvelette, P., et al., *HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12144-9.
106. Schindler, M., et al., *Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles*. J Virol, 2003. **77**(19): p. 10548-56.
107. Mitchell, R.S., et al., *Competition model for upregulation of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain by human immunodeficiency virus type 1 Nef*. J Virol, 2008. **82**(16): p. 7758-67.
108. Toussaint, H., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 nef expression prevents AP-2-mediated internalization of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8373-82.
109. Chaudhry, A., et al., *HIV-1 Nef promotes endocytosis of cell surface MHC class II molecules via a constitutive pathway*. J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2415-24.
110. Chaudhry, A., et al., *A two-pronged mechanism for HIV-1 Nef-mediated endocytosis of immune costimulatory molecules CD80 and CD86*. Cell Host Microbe, 2007. **1**(1): p. 37-49.

111. Chaudhry, A., et al., *HIV-1 Nef induces a Rab11-dependent routing of endocytosed immune costimulatory proteins CD80 and CD86 to the Golgi*. *Traffic*, 2008. **9**(11): p. 1925-35.
112. Hussain, A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation*. *J Virol*, 2008. **82**(2): p. 893-902.
113. Maldarelli, F., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein*. *J Virol*, 1993. **67**(8): p. 5056-61.
114. Cantin, R., J.F. Fortin, and M. Tremblay, *The amount of host HLA-DR proteins acquired by HIV-1 is virus strain- and cell type-specific*. *Virology*, 1996. **218**(2): p. 372-81.
115. Cantin, R., et al., *The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity*. *J Virol*, 1997. **71**(3): p. 1922-30.
116. Giguere, J.F., et al., *New insights into the functionality of a virion-anchored host cell membrane protein: CD28 versus HIV type 1*. *J Immunol*, 2002. **169**(5): p. 2762-71.
117. Martin, G., et al., *Envelope glycoproteins are dispensable for insertion of host HLA-DR molecules within nascent human immunodeficiency virus type 1 particles*. *Virology*, 2005. **335**(2): p. 286-90.
118. Ahmad, N. and S. Venkatesan, *Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR*. *Science*, 1988. **241**(4872): p. 1481-5.
119. Binette, J., et al., *Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum*. *Retrovirology*, 2007. **4**: p. 75.
120. Imbeault, M., et al., *Efficient magnetic bead-based separation of HIV-1-infected cells using an improved reporter virus system reveals that p53 up-regulation occurs exclusively in the virus-expressing cell population*. *Virology*, 2009. **393**(1): p. 160-7.
121. Dorfman, T., et al., *Nef enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity in the absence of matrix*. *J Virol*, 2002. **76**(13): p. 6857-62.
122. Lajoie, P., et al., *Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane*. *J Cell Biol*, 2009. **185**(3): p. 381-5.
123. Margottin, F., et al., *A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif*. *Mol Cell*, 1998. **1**(4): p. 565-74.
124. Fuchs, S.Y., V.S. Spiegelman, and K.G. Kumar, *The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer*. *Oncogene*, 2004. **23**(11): p. 2028-36.
125. Ghittoni, R., et al., *Simvastatin inhibits the MHC class II pathway of antigen presentation by impairing Ras superfamily GTPases*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(11): p. 2885-93.