

EMILIE MAURAI

**L'INCORPORATION DE CD154 PAR LE VIH-1 ET  
SON EFFET SUR L'ACTIVATION DES  
MACROPHAGES DÉRIVÉS DE MONOCYTES  
HUMAINS**

Mémoire présenté  
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.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE MÉDICALE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2008

## Résumé

Le CD154 joue un rôle crucial dans l'activation des cellules présentatrices d'antigènes. Il a été démontré que le CD154 est incorporé à la surface du VIH-1 et que de tels virus activent des lymphocytes B. Nous avons vérifié s'ils ont également la capacité d'activer des macrophages humains. Nous avons observé une augmentation de la production d'IL-8 par les macrophages dérivés de monocytes (MDM), mais celle-ci varie grandement en fonction des différentes productions virales et des donneurs utilisés. L'induction de la sécrétion d'IL-8 est spécifique au CD154 puisqu'une forme mutée ne l'induit pas et est indépendante de la gp120. L'expression des MMP-1 et -2 est influencée par le CD154 sur les cellules 293T, mais l'effet spécifique de CD154 est perdu lorsque des virus sont utilisés. L'ensemble de ces résultats suggère que l'incorporation de CD154 par le virus pourrait être un moyen additionnel d'attirer des cellules cibles au site d'infection et ainsi favoriser la réplication virale.

## **Abstract**

CD154 interacts with CD40 found on antigen-presenting cells such as macrophages and plays a crucial role in activating these cells and initiating immune responses. We have previously reported that CD154 is incorporated within HIV-1 envelope and is effective at activating primary B lymphocytes. In this study, we tested if such CD154-bearing virions are also effective in activating human monocyte-derived-macrophages (MDM). We observed an increase in IL-8 secretion, but it is highly variable depending on viral productions and donors used. The induction of IL-8 production is specific to CD154 since a mutant form does not induce it and is independent of gp120. The production of MMP-1 and -2 is influenced by CD154 on 293T cells but the specificity is lost when viral particles are used. These results suggest a possible way used by the virus to attract target cells to the site of infection and thereby favour its own replication.

## **Avant-Propos**

La réalisation de ce travail n'aurait pas pu être possible sans le support de plusieurs personnes. Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Michel J. Tremblay, pour m'avoir acceptée dans son équipe, mais particulièrement pour sa disponibilité exemplaire, sa passion pour la science, son ardeur au travail et son écoute.

Un merci aussi au Dr Réjean Cantin pour la pré-lecture de ce mémoire et pour ses conseils utiles à la progression de cette étude, de même qu'à tous les membres de l'équipe pour leur générosité à répondre à mes nombreuses questions.

J'aimerais en profiter pour remercier également les docteurs Nicole Bernard et Carlos Reyes-Moreno pour l'évaluation de ce mémoire.

Merci aux Fonds de la recherche en santé du Québec pour leur soutien financier tout au long de ma maîtrise.

Enfin, je souhaite remercier particulièrement mon conjoint, Steve Amireault, pour sa patience, ses encouragements et sa compréhension pour l'investissement personnel que représente la complétion d'un mémoire.

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	ii
Avant-propos .....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction .....	1
Chapitre 1. Le virus de l'immunodéficience humaine.....	2
1.1. Épidémiologie.....	2
1.2. Origine.....	3
1.3. Historique .....	4
1.4. Structure du VIH-1 .....	5
1.5. Cycle réplicatif .....	8
1.5.1. Entrée.....	8
1.5.2. Transcription et intégration .....	9
1.5.3. Réplication virale.....	9
1.5.4. Assemblage, bourgeonnement et maturation .....	11
1.6. Pathogénèse .....	11
1.6.1. Phase aiguë .....	12
1.6.2. Phase de latence clinique.....	13
1.6.3. Phase SIDA .....	14
Chapitre 2. L'incorporation des molécules de l'hôte.....	15
2.1. Mécanismes .....	15
2.2. Conséquences de l'incorporation de certaines molécules de l'hôte .....	16
Chapitre 3. CD40 et CD154.....	18
3.1. Les molécules de co-stimulation .....	18
3.2. Le syndrome de l'hyper IgM lié au chromosome X.....	19
3.3. L'interaction CD40-CD154 .....	20
3.3.1. Structure de l'interaction .....	20
3.3.2. Découverte et expression de CD40 .....	21

3.3.3. Structure de CD40 .....	21
3.3.4. Découverte et expression de CD154 .....	22
3.3.5. Structure de CD154 .....	23
3.3.6. Signalisation intracellulaire de CD40.....	24
Chapitre 4. Le macrophage .....	26
4.1. Différenciation et diversité des macrophages.....	26
4.2. Rôles du macrophage dans l'immunité .....	27
4.3. L'infection du macrophage par le VIH-1 .....	28
4.4. Stimulation des macrophages par le CD154.....	29
4.5. Cytokines, chimiokines et MMP dans la pathogénèse du VIH-1 .....	30
Chapitre 5. Hypothèse de recherche et objectifs.....	31
Chapitre 6. Matériels et méthodes .....	32
6.1. Réactifs et anticorps.....	32
6.2. Cellules .....	32
6.2.1. Culture des cellules 293T .....	32
6.2.2. Culture des macrophages dérivés de monocytes .....	32
6.2.3. Culture des cellules CD40-293-SEAP.....	33
6.3. Plasmides et production virale.....	33
6.4. Détection de cytokines et MMP .....	34
6.5. Détection et quantification de SEAP .....	34
6.6. Production de cellules 293T fixées exprimant ou non le CD154 .....	35
6.7. Cytométrie de flux.....	35
6.8. Isolement de lymphocytes B.....	35
6.9. Adhésion homotypique des lymphocytes B .....	36
Chapitre 7. Résultats .....	37
7.1. Activation des macrophages par le CD154 .....	37
7.1.1. Production d'IL-8 par les macrophages .....	37
7.1.2. Variabilité entre les différentes productions virales utilisées.....	38
7.2. Présence de CD154 sur les virus .....	39
7.3. Fonctionnalité du CD154 sur les virus .....	40
7.3.1. Adhésion homotypique des lymphocytes B en présence de virus arborant du CD154 .....	40

7.3.2. Production de SEAP par une lignée cellulaire rapportrice .....	41
7.4. Présence de CD40 sur les macrophages .....	42
7.5. Rôles de CD4 et de CCR5 dans l'induction d'IL-8.....	44
7.6. Production de MMP par les macrophages en présence de CD154.....	45
7.7. Spécificité de CD154.....	47
7.7.1. Présence de CD154 muté sur les virus .....	47
7.7.2. Effets d'un CD154 muté.....	48
Chapitre 8. Discussion .....	50
8.1. La présence de CD154 à la surface des virus augmente la sécrétion d'IL-8 par les macrophages .....	51
8.2. L'augmentation de la sécrétion d'IL-8 est spécifiquement due à la présence de CD154.....	53
8.3. La modulation de la sécrétion de MMP pourrait être due à la présence de CD154 sur les virus.....	53
8.4. Les protéines d'enveloppe virale ne sont pas impliquées dans le mécanisme d'induction d'IL-8 .....	55
8.5. L'expression de CD154 sur les lymphocytes T est modulée chez les individus infectés par le VIH-1 et pourrait participer au développement du SIDA.....	55
Conclusions .....	58
Perspectives .....	59
Bibliographie .....	61

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Fonctions des différentes protéines virales .....	7
Tableau 2 : Conséquences sur la pathogénèse de la présence de cytokines et chimiokines .....	30
Tableau 3 : Conséquences sur la pathogénèse de la présence de MMP .....	30
Tableau 4 : Variabilité de la sécrétion d'IL-8 entre les différentes productions virales de VIH-1 ayant incorporé du CD154 dans leur enveloppe .....	39



## Liste des figures

Figure 1 : Épidémiologie de l'infection au VIH .....	2
Figure 2 : Organisation génomique du VIH-1 .....	6
Figure 3 : Représentation schématique de la structure du VIH-1 .....	7
Figure 4 : Cycle répliatif du VIH-1 .....	8
Figure 5 : Organisation du promoteur du VIH-1 .....	10
Figure 6 : Marqueurs de la progression de l'infection.....	12
Figure 7 : Désorganisation structurale d'un nœud lymphatique.....	13
Figure 8 : Mécanismes d'incorporation des molécules de l'hôte par le VIH-1 .....	16
Figure 9 : Les molécules de co-stimulation .....	19
Figure 10 : Organisation structurale du gène et de la protéine de CD40 et CD154 .....	22
Figure 11 : Signalisation intracellulaire de CD40 dans les lymphocytes B.....	25
Figure 12 : Différenciation des monocytes en macrophages et leur distribution in vivo ..	26
Figure 13 : Sécrétion d'IL-8 par les MDM en présence de virus avec ou sans CD154 ....	38
Figure 14 : Niveau d'incorporation de CD154 par différentes productions virales .....	39
Figure 15 : Induction de l'adhésion homotypique des lymphocytes B par la présence de CD154 sur les virus.....	41
Figure 16 : Production de SEAP par les cellules CD40-293-SEAP en présence de virus avec du CD154.....	42
Figure 17 : Expression de CD40 sur les MDM .....	43
Figure 18 : Sécrétion d'IL-8 par les MDM en présence de virus $\Delta$ env avec ou sans CD154 .....	44
Figure 19 : Production de MMP par les MDM en présence de CD154.....	46
Figure 20 : Niveau d'incorporation de CD154 de type sauvage en comparaison avec une forme mutée .....	47
Figure 21 : Spécificité de CD154 dans l'induction de l'adhésion homotypique des lymphocytes B, la production de SEAP par les cellules CD40-293-SEAP et la sécrétion d'IL-8 par les MDM .....	49

## Liste d'abréviations

µg	Microgramme
nm	Nanomètre
ADN	Acide désoxyribonucléique
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G</i>
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C4BP	<i>C4 binding protein</i>
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
CCR	<i>Chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CPI	Complexe de pré-intégration
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
CypA	Cyclophiline A
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagles medium</i>
Dr	Docteur
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> (Acide éthylène-diamine tétraacétique)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>External signal-regulated kinase</i>
Fas	<i>Apoptosis stimulating fragment</i>
Fc	Fragment cristallisable
Gag	<i>Group-specific-antigen</i>
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
Gp	Glycoprotéine

HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i> (thérapie antirétrovirale hautement active)
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interféron
Iono	Ionomycine
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LAV	<i>Lymphadenopathy-associated virus</i>
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LFA	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LNGF	<i>Low affinity nerve growth factor</i>
LPS	Lipopolysaccharides
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
Lys	Lysine
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDM	<i>Monocyte-derived macrophage</i> (macrophage dérivé de monocyte)
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> (métalloprotéinase matricielle)
Nef	<i>Negative regulation factor</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NK	<i>Natural killer</i>
PBS	<i>Phosphate buffered salt solution</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoérythrine
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
Pyk	<i>Protein tyrosine kinase</i>

RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
Rev	<i>Regulator of viral expression</i>
RPMI	<i>Rossmann-Park-Memorial-Institute medium</i>
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
SEB	<i>Staphylococcal enterotoxin B</i>
SDF	<i>Stromal cell-derived factor</i>
SEAP	<i>Secreted embryonic alkaline phosphatase</i>
SIDA	<i>Syndrome d'immunodéficience acquise</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Tat	<i>Transactivator</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAP	<i>TNF related activation protein</i>
Tyr	<i>Tyrosine</i>
VEB	<i>Virus Epstein-Barr</i>
VIH	<i>Virus de l'immunodéficience humaine</i>
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
VIS	<i>Virus de l'immunodéficience simienne</i>
Vpr	<i>Viral protein R</i>
Vpu	<i>Viral protein U</i>
xMAP	<i>Multi-analyte profiling</i>

## **Introduction**

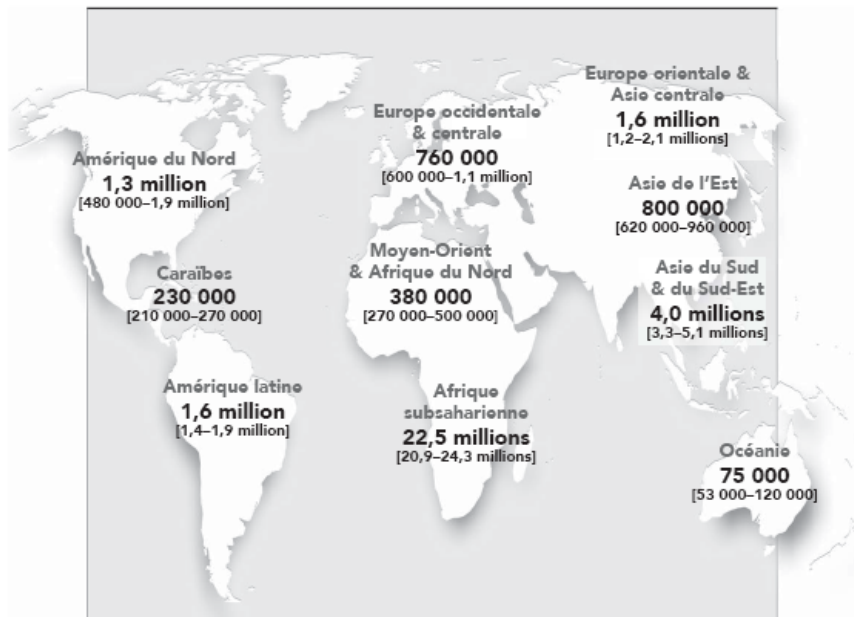
L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1) est l'une des plus grandes épidémies connues à ce jour, plusieurs millions de personnes en sont mortes depuis le début de la propagation du virus. Afin de contrer les ravages qu'occasionne ce virus dans la population mondiale, il est crucial de comprendre les facteurs favorisant l'expansion de l'épidémie. Les travaux provenant de divers domaines de recherche tels que les sciences sociales, l'épidémiologie, les études cliniques et la recherche fondamentale contribuent à la compréhension de cette maladie. La connaissance des interactions entre le pathogène et son hôte est un élément clé pour l'ensemble de ces recherches.

Le VIH-1 est connu pour affecter le système immunitaire des individus qu'il infecte. En plus de cibler les cellules essentielles au développement de la réponse immunologique, le virus incorpore plusieurs molécules provenant des membranes des cellules infectées. Ces molécules jouent, de plus, un rôle important dans l'immunité. Par leur présence à la surface des virions, elles confèrent certaines fonctions cellulaires aux virus. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets que la présence de CD154 sur les virions peut avoir sur l'activation des macrophages primaires humains.

# Chapitre 1. Le virus de l'immunodéficience humaine

## 1.1. Épidémiologie

L'épidémie du VIH, l'agent causal du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), est l'une des plus grandes causes de mortalité à l'échelle mondiale. En date de décembre 2007, selon le rapport annuel d'ONUSIDA, plus de 33 millions de personnes vivaient avec le VIH et plus de 2 millions étaient nouvellement infectées ou en mourraient chaque année dans le monde [1]. Au Canada, en 2005, 58 000 personnes vivaient avec le VIH et entre 2 300 et 4 500 nouvelles infections sont survenues cette année là seulement [2]. Pour le Québec, c'est 3 520 personnes qui vivaient avec le virus en 2006 et pour cette même année, 240 personnes ont été nouvellement infectées [3]. L'Afrique reste le continent le plus touché par ce fléau avec près de 23 millions d'individus infectés [1] (Figure 1).



**Figure 1 : Épidémiologie de l'infection au VIH.** Distribution du nombre d'individus vivant avec le VIH à travers le monde. Tirée de : Rapport ONUSIDA 2007

Ceci est principalement dû à un manque de ressources financières et matérielles. Par conséquent, les personnes atteintes n'ont pas un accès adéquat aux services de prévention et aux traitements efficaces. Heureusement, les efforts consacrés à améliorer le sort de milliers

d'individus aux prises avec ce virus commencent à porter fruit. Une diminution des comportements à risque est observée dans certaines populations, mais le plus important est que le nombre de personnes nouvellement infectées chaque année est en régression et que le nombre de décès attribués à l'infection se stabilise. Une grande part de ces avancements est due aux recherches scientifiques qui permettent une meilleure compréhension de la pathogénèse du VIH. Ainsi, des programmes d'interventions sont développés pour prévenir de nouvelles infections et de nouveaux médicaments sont mis sur le marché pour améliorer la qualité de vie des gens vivant avec le virus.

## 1.2. Origine

Comment est apparue l'épidémie du VIH? Plusieurs théories ont été exposées pour expliquer l'émergence rapide de ce virus et son syndrome. Les scientifiques s'accordent pour dire que le VIH a pour origine le virus de l'immunodéficience simienne (VIS). Il existe deux types de VIH, le type 1 (VIH-1) et le type 2 (VIH-2) qui proviennent respectivement des chimpanzés et des singes Sooty Mangabeys [4, 5]. Des études sur la diversité génétique des virus a permis de les regrouper en trois classes : M, N et O. La classe M, étant la classe la plus diversifiée et la plus répandue dans le monde, est divisée en 11 sous-groupes nommés de A à K [6]. Des études similaires classent les virus de type 2 en six groupes distincts nommés de A à F.

La période et la voie de transmission du VIS du singe à l'humain demeurent un sujet de grands débats. Il existe actuellement deux théories qui tentent d'expliquer quand et comment cette transmission a eu lieu. Tout d'abord, il faut savoir que l'infection de l'humain par le VIS n'est pas pathogénique [7, 8], par conséquent, le VIS a subi de nombreuses modifications pour s'adapter et se répliquer dans un hôte humain.

La première hypothèse de transmission favorise un transfert du VIS suite au contact entre de la peau ou des muqueuses humaines et du sang d'animaux infectés [4]. Ce type d'exposition était anciennement fréquent chez les chasseurs de singes et les bouchers. Selon cette théorie, l'adaptation du VIS à l'humain se serait produite sur plusieurs dizaines d'années dans des contrées éloignées. Par contre, cette hypothèse n'explique pas pourquoi l'épidémie n'a éclaté que vers la fin du 20<sup>ième</sup> siècle et plusieurs facteurs pouvant accélérer

l'adaptation et la propagation de l'infection ont été proposés tels que l'urbanisation, les comportements sexuels, l'utilisation de seringues souillées pour la vaccination et les voyages aériens qui ont débutés dans les années 1970 [9, 10].

Il existe aussi une deuxième théorie quant à la nature de la transmission du VIS à l'humain et de la rapidité de la propagation du virus. Celle-ci défend que le VIS serait apparu chez l'humain lors de la vaccination massive pour l'éradication de la poliomyélite entre les années 1957 et 1960 [11]. Le vaccin aurait été contaminé par le VIS lors de sa confection dans des cellules de reins de singes infectés par ce virus. Toutefois, cette hypothèse est de plus en plus remise en doute, particulièrement depuis la publication d'une étude démontrant que l'espèce de singes utilisée pour la préparation des vaccins était infectée par une souche de SIV phylogénétiquement distincte des souches donnant lieu au VIH [12].

### **1.3. Historique**

L'Amérique a été touchée pour la première fois par le SIDA en 1981 lorsqu'un jeune homosexuel est mort suite à un sarcome de Kaposi et des infections opportunistes répétées [13]. La communauté gaie a été rapidement marginalisée puisque ces hommes souffraient de ce qu'on appelait à l'époque la «peste des gais». Les manifestations cliniques laissaient croire qu'ils avaient un système immunitaire inefficace à enrayer des infections normalement inoffensives, d'où le nom de syndrome d'immunodéficience acquise. Ce n'est que quelques années plus tard que le premier cas de transmission entre hétérosexuels a été documenté, la majorité de la population devenait ainsi une cible potentielle de ce fléau [14]. En 1983, l'agent causal du SIDA a été identifié comme étant un rétrovirus par l'équipe du Professeur Montagnier de l'Institut Pasteur et nommé *lymphadenopathy-associated virus* (LAV) [15]. Plus tard, le *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) l'a nommé virus de l'immunodéficience humaine (VIH) à cause du syndrome qu'il occasionne chez son hôte. L'isolement et la culture de ce virus a permis d'identifier des protéines essentielles à son mode de réplication, menant à la découverte de molécules anti-virales les ciblant. Aujourd'hui, en occident, les individus infectés sont traités avec un cocktail d'un minimum de trois médicaments ciblant au moins deux protéines différentes (préférentiellement la transcriptase inverse et la protéase). L'utilisation de ce traitement a

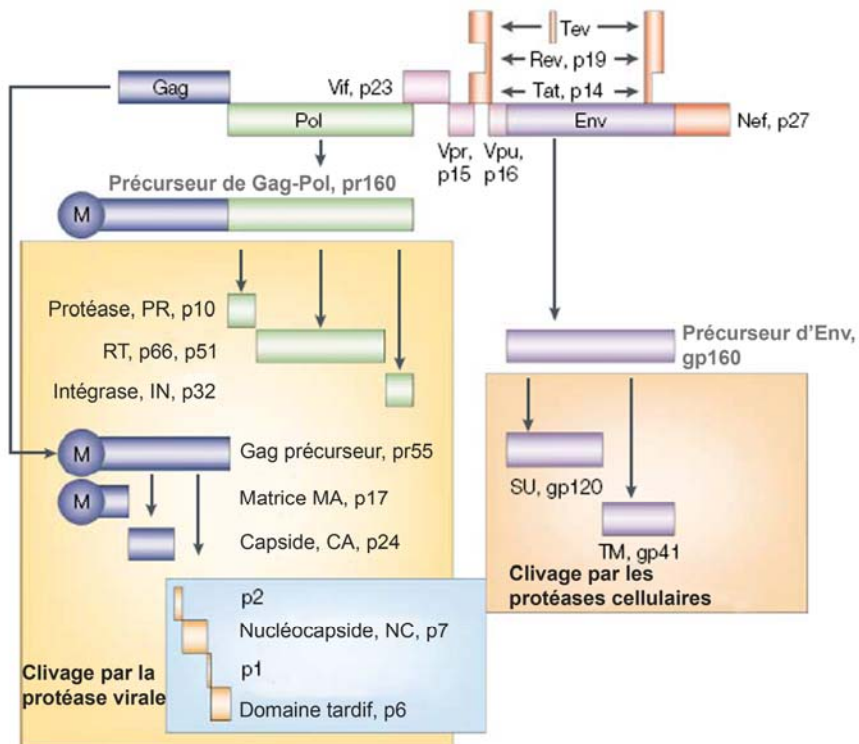


transformé cette maladie mortelle en une maladie chronique chez les individus ayant accès aux médicaments.

## 1.4. Structure du VIH-1

Le VIH-1 est un virus enveloppé de la famille des *rétroviridae*, c'est-à-dire un virus à ARN qui insère une copie de son bagage génétique dans le génome de la cellule infectée sous la forme d'ADN. La famille des rétrovirus est divisée en deux sous-catégories : les rétrovirus à génome simple (alpha, beta, gamma et epsilon) et les rétrovirus à génome complexe (lentivirus, deltavirus et spumavirus) (revue dans [16]). Les génomes simples comprennent uniquement trois gènes: *gag*, *pol* et *env* tandis que les virus à génome complexe, en plus de ces trois gènes, possèdent aussi des gènes accessoires. La transcription de ces gènes est régulée par l'activité du LTR (de l'anglais *Long Terminal Repeat*) où se trouvent les sites de liaison des facteurs de transcription.

Le VIH-1 est du genre *lentivirus*. C'est donc un pathogène avec une période d'incubation très lente, qui établit une latence dans les cellules infectées et qui ultimement mène à la mort (revue dans [17]). Son génome contient six gènes accessoires : *vif*, *vpr*, *rev*, *vpu*, *tat* et *nef* (Figure 2). Le gène d'enveloppe (*env*) code pour deux protéines (gp120 et gp41). Ces protéines sont responsables de l'attachement du virus aux cellules et de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique résultant en l'entrée du virus dans la cellule. Le gène *gag* code pour une polyprotéine qui est clivée et forme six protéines structurales lors de la maturation du virus par la protéase virale. Ces protéines sont la matrice (p17), la capsid (p24), la nucléocapsid (p7), p6, p2 et p1. Le VIH-1 possède, en plus de la protéase, deux autres enzymes essentielles à sa réplication, la transcriptase inverse et l'intégrase. La transcriptase inverse transcrit l'ARN viral monocaténaire en ADN double brin. Cette enzyme possède aussi une activité ARNase qui digère l'ARN une fois que le premier brin d'ADN a été transcrit facilitant ainsi la transcription du brin complémentaire. L'intégrase insère par la suite l'ADN proviral dans le génome de la cellule infectée.

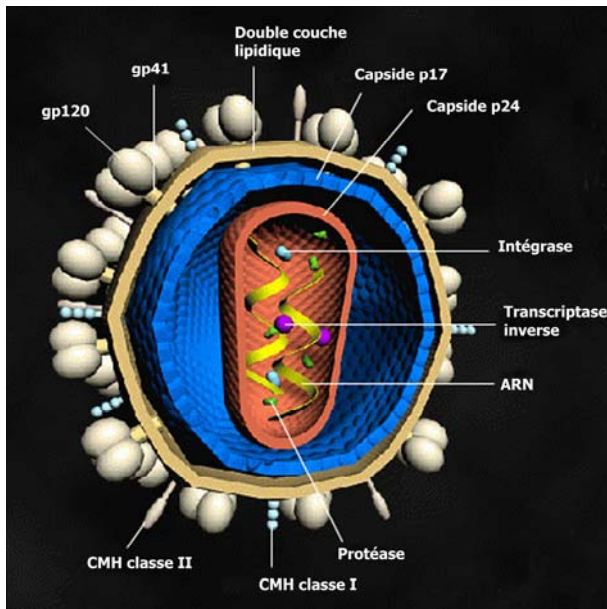


**Figure 2 : Organisation génomique du VIH-1.** La polyprotéine Gag est clivée en six sous-unités protéiques : la matrice (p17), la capside (p24), la nucléocapside (p7), le domaine tardif (p6), p2 et p1. Le clivage du précurseur Gag-Pol donne lieu à trois enzymes : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Les deux protéines d'enveloppe, gp120 et gp41, résultent du clivage du précurseur Env. Les autres gènes, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat* et *rev*, sont produits dans des cadres de lecture ouverts superposant les gènes *pol* et *env*. Adaptée de [18]

La protéase est pour sa part responsable de la maturation des virions une fois à l'extérieur de la cellule grâce à son activité sur le précurseur gag. Ces trois enzymes sont produites suite au clivage par la protéase virale du précurseur de Gag-Pol, une polyprotéine également clivée lors de la maturation du virus. Les gènes contenant l'information génétique pour les protéines régulatrices et accessoires sont traduits dans des cadres de lecture ouverts. Ces protéines participent à la réplication virale et à la progression vers le stade SIDA. Le tableau 1 résume les différentes fonctions de ces protéines accessoires (revue dans [19]).

L'enveloppe du virus est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle les protéines virales d'enveloppe (gp120 et gp41) sont insérées (Figure 3). À l'intérieur de la particule, on retrouve la protéine de matrice p17 qui tapisse la paroi interne de l'enveloppe et la

protéine de la capsid p24 qui forme une coquille protectrice (capside) renfermant les deux séquences identiques d'ARN viral simple brin. Également, au sein de la capsid se trouvent la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase nécessaires à la réplication virale.



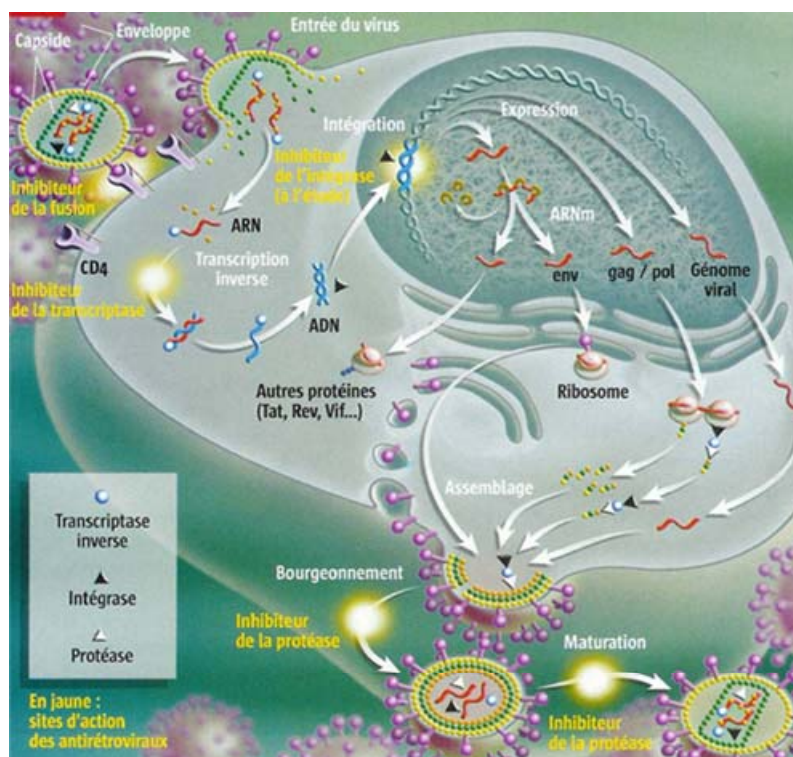
**Figure 3 : Représentation schématique de la structure du VIH-1.** La particule virale du VIH-1 est formée par la protéine de la capsid p24 dans laquelle se trouve deux brins identiques d'ARN et les protéines intégrase, transcriptase inverse et protéase. La capsid est enveloppée d'une double couche lipidique provenant de la cellule infectée dans laquelle sont insérées les protéines d'enveloppe gp120 et gp41 et des protéines dérivées de l'hôte comme les CMH de classe I et II. Adaptée de : <http://www.masef.com/non-medecins2/vih.htm>, consulté le 24 mars 2008

**Tableau 1 : Fonctions des différentes protéines virales**

Gènes	Protéines et fonctions
<i>env</i> (enveloppe)	gp120 lie le CD4 et le co-récepteur, gp41 fusionne les membranes
<i>gag</i> (group-specific antigen)	p17, p24, p7: protéines de structure
<i>pol</i> (polymérase)	transcriptase inverse, protéase, intégrase :enzymes
<i>tat</i> (transactivator)	accroît l'activité transcriptionnelle
<i>rev</i> (regulator of viral expression)	transporte l'ARN messager du noyau au cytoplasme
<i>vif</i> (viral infectivity factor)	lie la protéine APOBEC3G empêchant la désamination de l'ADN viral
<i>vpr</i> (viral protein R)	transporte l'ADN viral au noyau, augmente la production virale et contrôle le cycle cellulaire
<i>vpu</i> (viral protein U)	diminue l'expression de CD4
<i>nef</i> (negative regulation factor)	augmente la réplication virale et diminue l'expression de CD4

## 1.5. Cycle réplcatif

Le VIH-1 infecte de façon productive les lymphocytes T CD4 activés et les macrophages. En général, le cycle réplcatif est similaire dans les deux types cellulaires, mais diffère sur certains points (Figure 4).



**Figure 4 : Cycle réplcatif du VIH-1.** Représentation schématique de la réplication virale du VIH-1 dans un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> ainsi que des étapes ciblées par la thérapie antirétrovirale. Tirée de : [http://tpe.stalkr.net/tpe2/ShemaVirusBio1\\_small.jpg](http://tpe.stalkr.net/tpe2/ShemaVirusBio1_small.jpg), consulté le 24 mars 2008

### 1.5.1. Entrée

Le virus s'attache aux cellules par la liaison gp120-CD4. D'autres molécules peuvent participer à l'attachement en renforçant l'interaction entre le virus et la cellule comme la galectine-1, ICAM-1 et LFA-1 [20, 21]. Les co-récepteurs utilisés ensuite par la gp120 dictent le tropisme viral, la préférence à infecter un type cellulaire. Les virus utilisant le CXCR4 infectent principalement les lymphocytes T CD4 et sont du tropisme X4 alors que ceux utilisant le CCR5 infectent aussi les lymphocytes T CD4 activés, mais surtout les macrophages et sont du tropisme R5. La liaison avec le co-récepteur induit un changement

conformationnel dans la gp120 ce qui libère la gp41 et permet la fusion entre les membranes. Les virus peuvent également entrer par macropinocytose dans les macrophages [22]. La macropinocytose est un processus d'endocytose par invagination de la membrane plasmique qui permet d'internaliser un volume de liquide extracellulaire. Les particules virales s'y trouvant sont également internalisées dans des vésicules. La plupart des virions sont par la suite dégradés, mais certains y échappent et se répliquent. L'entrée par fusion du virus dans les cellules est devenu une cible des traitements anti-rétroviraux puisqu'un inhibiteur de fusion, le T-20, est maintenant disponible. Il cible la gp41 et empêche son repliement nécessaire à la fusion des membranes [23]. Également, des inhibiteurs de liaison aux co-récepteurs sont en développement et semblent prometteurs [24-26].

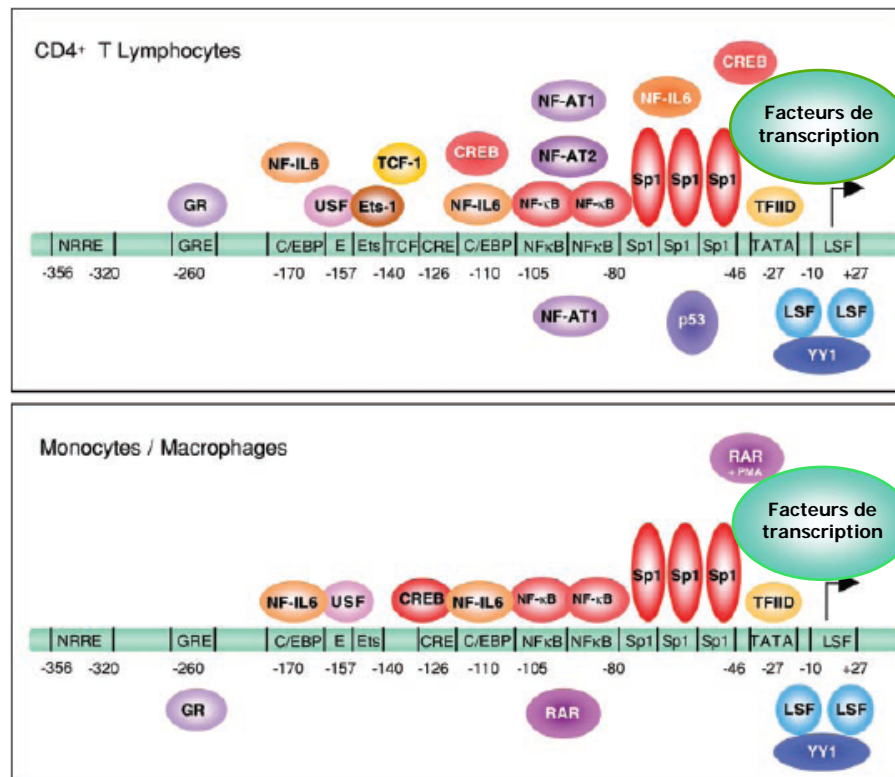
### **1.5.2. Transcription et intégration**

Une fois à l'intérieur de la cellule, la capsid est dégradée et l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN par la transcriptase inverse. L'ADN double brin viral est transporté du cytoplasme au noyau, le long du réseau de microtubules, à l'intérieur d'un complexe de pré-intégration (CPI) constitué de l'intégrase, de Vpr, de la p17 et d'autres protéines cellulaires nécessaires à l'intégration. L'ADN est par la suite inséré dans le génome de la cellule à des endroits transcriptionnellement actifs. Deux classes de molécules interviennent dans le processus de transcription inverse et sont utilisées en traitement. Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse agissent en tant qu'analogues des acides nucléiques, s'insèrent au site actif de l'enzyme de façon compétitive et bloquent son activité [27, 28]. En ce qui a trait aux inhibiteurs non-nucléosidiques, ils se fixent à proximité du site actif et modifient la structure de l'enzyme pour la rendre inactive [29-31]. Actuellement, il n'y a pas d'inhibiteurs d'intégrase disponibles, mais plusieurs essais cliniques sont en cours.

### **1.5.3. Réplication virale**

Lorsque l'ADN viral est intégré, la machinerie cellulaire peut transcrire les gènes viraux. Des facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B et NF-AT se lient au LTR et activent la réplication virale initiale. Les facteurs de transcription requis pour une initiation efficace se ressemblent mais ne sont pas les mêmes en fonction du type cellulaire infecté (Figure 5).

Le LTR est sous-divisé en différentes régions fonctionnelles [32]. La région modulatrice est comprise entre les positions -454 et -106, la région amplificatrice est située entre les positions -105 et -79 et la région promotrice se trouve entre les positions -78 et -1. La région modulatrice comprend une région de régulation négative de la transcription entre les positions -340 et -184.



**Figure 5 : Organisation du promoteur du VIH-1.** Représentation schématique des sites de liaison des facteurs de transcription cellulaires présents dans les régions modulatrice, amplificatrice et promotrice du LTR dans les deux types cellulaires principalement infectés. Les facteurs ayant un rôle d'activateurs sont indiqués dans le haut de la séquence et les inhibiteurs dans le bas. Adaptée de [33]

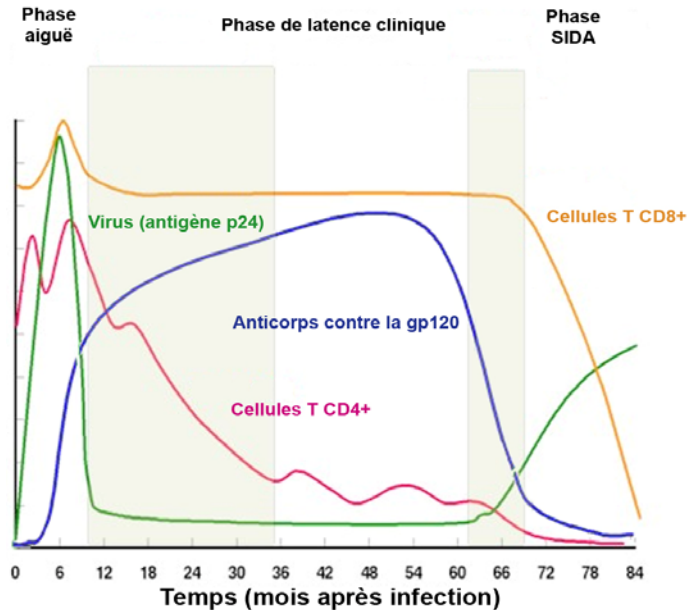
Les premiers transcrits courts d'ARN permettent la production de la protéine Tat, qui est essentielle pour une réplication virale efficace, augmentant la transcription de l'ordre de 10-1000 fois. Les premiers transcrits courts produits contiennent aussi les gènes *rev* et *nef* qui accroissent l'efficacité de la réplication virale. Par la suite, les autres protéines accessoires sont produites ainsi que les précurseurs Gag-Pol.

#### **1.5.4. Assemblage, bourgeonnement et maturation**

Les précurseurs Gag-Pol s'assemblent à la membrane plasmique dans des régions riches en lipides (radeaux lipidiques) et en protéines d'enveloppe. Des virions immatures sont alors formés et bourgeonnent hors de la cellule en incorporant des molécules cellulaires exprimées à la surface. Dans les macrophages, le bourgeonnement se produit également vers l'intérieur de corps multi-vésiculaires où les virus peuvent s'accumuler pendant plusieurs mois [34]. Ces corps ultimement fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent les virus dans le milieu extracellulaire. Cette particularité est importante pour la dissémination du virus puisque la fusion des corps avec la membrane peut se produire lors de la formation d'une synapse immunologique avec un lymphocyte T et ainsi transférer les virus d'une cellule cible à l'autre [35, 36]. Une fois à l'extérieur de la cellule, la protéase virale clive les précurseurs Gag-Pol rendant ainsi les particules virales matures et pleinement infectieuses. Il existe des inhibiteurs de protéase qui agissent au niveau du site actif de l'enzyme et empêche son action [37]. La maturation des virions est une étape essentielle pour la capacité d'infecter du virus.

#### **1.6. Pathogénèse**

La transmission du VIH-1 se fait principalement par contact sanguin entre deux personnes ou par échange de fluides corporels comme le sperme et les sécrétions vaginales. Les modes de transmission les plus souvent rapportés sont les relations sexuelles non protégées, l'échange de seringues contaminées et la transmission verticale entre la mère et l'enfant pendant la grossesse. L'infection au VIH-1 se caractérise par trois phases distinctes au cours desquelles les manifestations cliniques, virologiques et immunologiques diffèrent (revues dans [38]) (Figure 6).

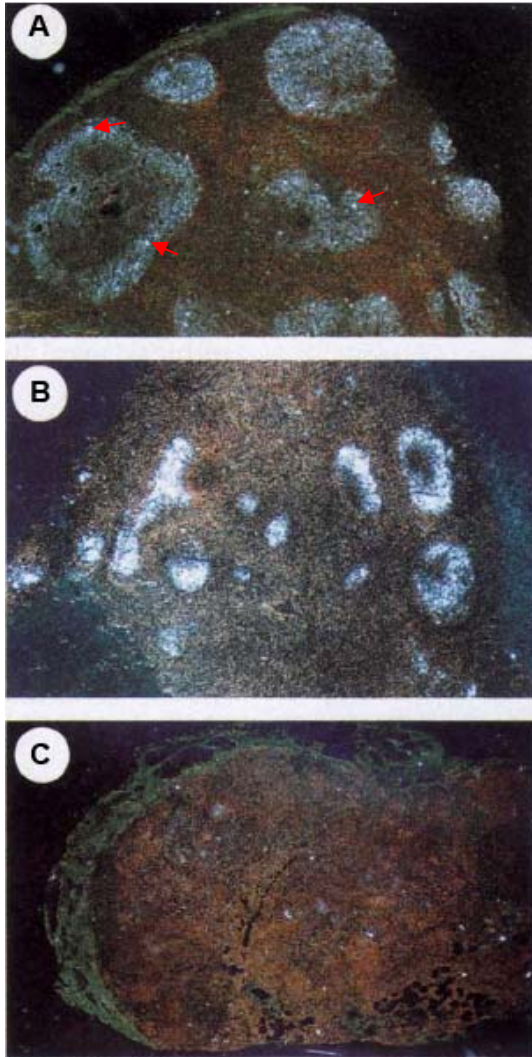


**Figure 6 : Marqueurs de la progression de l'infection.** La progression de l'infection est caractérisée par trois phases. Dans la phase aiguë, la charge virale augmente rapidement puis chute grâce à l'apparition d'anticorps spécifiques contre la gp120. Dans la phase de latence clinique, la charge virale, le niveau d'anticorps et le nombre de cellules CD8<sup>+</sup> demeurent relativement constants, alors que le nombre de cellules CD4<sup>+</sup> diminue graduellement. Lorsque la phase SIDA est atteinte, le nombre de cellules CD4<sup>+</sup> est très faible, les niveaux d'anticorps et de cellules CD8<sup>+</sup> chutent tandis que la charge virale augmente. Adaptée de : <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/HIV3.htm>, consulté le 24 mars 2008

### 1.6.1. Phase aiguë

Pendant les premières semaines d'infection par le VIH-1, les individus souffrent majoritairement de symptômes qui s'apparentent à ceux d'une grippe : maux de tête, fièvre, fatigue, sueurs, toux sèche. La charge virale dans le sang est très élevée, mais les symptômes sont pratiquement indétectables. Il y a une déplétion massive des lymphocytes T CD4 mémoires dans les muqueuses de l'intestin, qui n'affecte pas la concentration sanguine de lymphocytes T CD4, et une accumulation des virions dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes [39, 40] (Figure 7). Le système immunitaire est rapidement mis à l'épreuve. Une réponse humorale et cellulaire spécifique contre le VIH-1 est détectée tôt dans l'infection et est responsable de la diminution de la charge virale observée lors de la phase aiguë. Toutefois, le système est incapable d'éliminer toutes les particules virales comme lors d'une infection par le virus de l'influenza, par exemple. Ceci est largement dû à l'apparition d'un bassin de cellules infectées de façon latente.





**Figure 7 : Désorganisation structurale d'un nœud lymphatique.** A) Stade précoce : le virus est représenté par les points argentés qui sont majoritairement concentrés dans les centres germinatifs. B) Stade intermédiaire : le signal représentant les virus est plus diffus dans l'organe, mais encore concentrés dans quelques centres germinatifs. C) Stade avancé : le signal est pratiquement disparu du nœud lymphatique. Adaptée de [40]

### 1.6.2. Phase de latence clinique

Cette phase est caractérisée par l'absence de symptômes et une charge virale sanguine basse, rarement détectable lorsque dosée en terme de protéines p24, qui perdure pendant plusieurs années. Par contre, le virus n'est pas sous une forme latente, la réplication virale est toujours présente et massive dans les organes lymphoïdes. La charge virale est alors détectable par PCR quantitatif de l'ARN viral. À cause de cette réplication virale intense, la structure des organes

lymphoïdes montre un début de désorganisation structurale (Figure 7). Les centres germinatifs sont formés de cellules dendritiques folliculaires qui trappent les particules virales. Certains centres disparaissent, diminuant ainsi la retenue des virus. Parallèlement, une augmentation graduelle de la virémie est observée avec la progression de la maladie. En ce qui a trait à la réponse immunitaire, on observe une diminution progressive de l'activité des lymphocytes T CD4 causée par une déplétion sélective de ces cellules. Les lymphocytes T CD8 sont par contre fonctionnels jusqu'à ce que le système immunitaire chute dans la phase SIDA.

### **1.6.3. Phase SIDA**

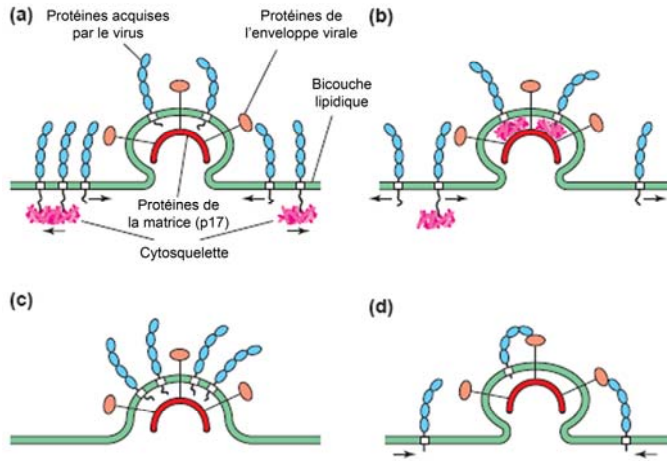
À ce stade, l'architecture des organes lymphoïdes est complètement désorganisée (Figure 7). Il n'y a plus de centres germinatifs, la virémie augmente radicalement, l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8 chute et le compte des lymphocytes T CD4 est très bas, sous la barre limite des 200 cellules par microlitre de sang. Les individus souffrent d'une immunosuppression profonde et d'infections opportunistes répétées menant ultimement à la mort.

## Chapitre 2. L'incorporation des molécules de l'hôte

### 2.1. Mécanismes

Les virus enveloppés, tel que le VIH-1, acquièrent un large éventail de molécules provenant des cellules qu'ils infectent lors du bourgeonnement. Ces molécules peuvent se retrouver à l'intérieur même des virus émergeant des cellules ou à leur surface, insérées entre les composantes de l'enveloppe virale. Leur localisation dépend grandement de leur emplacement d'origine dans la cellule hôte. De façon générale, les protéines intracellulaires se retrouvent à l'intérieur des virus tandis que les protéines dans l'enveloppe proviennent de membranes cellulaires, plasmique ou intracellulaire, tout dépend du lieu de bourgeonnement [41]. Plusieurs protéines cellulaires contribuent au cycle répliatif viral, mais seulement quelques unes d'entre elles restent associées aux particules virales une fois à l'extérieur de la cellule. De ce fait, il est peu probable que l'incorporation des molécules de l'hôte à l'intérieur du virus résulte d'un phénomène passif et aléatoire. Les mécanismes par lesquels ces molécules se retrouvent exclues ou incorporées par le virus sont encore méconnus. Plusieurs hypothèses ont été émises jusqu'à ce jour, mais quatre s'avèrent plus probables (Figure 8) [42].

(i) La forte interaction entre les molécules membranaires et les protéines de la capsid virale écarte les molécules associées au cytosquelette du site d'assemblage des particules et par conséquent du bourgeonnement. Par contre, il a été rapporté que certaines protéines associées au cytosquelette étaient présentes dans les virions. (ii) Alors, un autre mécanisme potentiel est que l'acquisition de ces molécules ait lieu par l'entremise d'interactions entre les particules virales et le cytosquelette. (iii) De plus, il se peut que les protéines incorporées le soient parce qu'elles se trouvent à cet endroit précis où le virus s'assemble. Le bourgeonnement s'effectue dans des régions particulières de la membrane cellulaire riches en certaines protéines, lesquelles seraient alors favorisées lors du processus. (iv) Finalement, des interactions directes entre des protéines virales et des protéines cellulaires permettraient l'acquisition de ces molécules et l'exclusion d'autres. Parmi les protéines incorporées les plus connues, on compte APOBEC3G, la cyclophiline A (CypA), HLA-DR et ICAM-1 [43-49].



**Figure 8 : Mécanismes d'incorporation des molécules de l'hôte par le VIH-1.** a) Exclusion des molécules par le cytosquelette b) Inclusion des molécules par le cytosquelette c) Inclusion passive d) Inclusion par sélection positive. Adaptée de [42]

## 2.2. Conséquences de l'incorporation de certaines molécules de l'hôte

De nombreuses études se sont intéressées à la fonctionnalité de ces molécules incorporées par le virus et à leurs conséquences sur le cycle répliatif viral (revue dans [41]). Par exemple, la CypA est une protéine cytosolique dont le rôle n'est pas clairement défini, mais qui serait fort probablement celui de protéine de transport intracellulaire ou de catalyseur de repliement protéique. La CypA est incorporée lors de l'assemblage des virions grâce à sa liaison avec les protéines de la capsid virale [50]. Une ambiguïté persiste quant à son apport pour le virus, mais sa présence est critique pour la capacité à infecter du virus. Originellement, il a été pensé que la CypA jouait un rôle dans la décapsidation du virus puisqu'elle est fortement liée à la capsid et qu'elle est requise pour l'initiation de la transcription inverse [51]. Or, des études subséquentes laissent croire que la CypA joue plutôt un rôle dans l'entrée du virus dans les cellules en liant des molécules héparanes [52, 53]. Celles-ci sont des chaînes de carbohydrates attachées aux protéines lors de leur passage dans l'appareil de Golgi. Lors de la maturation du virus, les molécules de CypA seraient relocalisées à la surface du virus puisque des anticorps contre la CypA bloquent l'entrée du VIH-1 dans les cellules mononuclées du sang périphérique [54].

Une autre protéine intracellulaire est incorporée par le VIH-1, APOBEC3G, une déaminase de la cytidine considérée comme une protéine anti-virale. APOBEC3G se lie aux brins d'ARN viraux et transforme les cytidines en uridines, insérant ainsi des mutations dans la

séquence d'ARN du VIH-1, ce qui inactive le virus. Afin de contrecarrer l'activité d'APOBEC3G, la protéine virale Vif inhibe l'incorporation d'APOBEC3G [44, 45]. Le mécanisme par lequel Vif réussit à exclure APOBEC3G du virion est encore méconnu. L'hypothèse actuelle est que Vif induit la dégradation d'APOBEC3G par la voie du protéasome [55-57].

ICAM-1 est une molécule d'adhésion cellulaire présente sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et dont le ligand est LFA-1. LFA-1 est une intégrine exprimée sur les lymphocytes T sous une forme de faible affinité pour ICAM-1. Lorsque le récepteur d'une cellule T (TCR, de l'anglais *T-cell Receptor*) est engagé, un signal augmente l'affinité de LFA-1, renforçant ainsi le contact entre les deux cellules. La molécule ICAM-1 associée à l'enveloppe du virus permet une augmentation de l'infectivité du VIH-1 dans les cellules arborant du LFA-1, ainsi qu'une meilleure adhésion aux cellules négatives en récepteur CD4. Lorsque le LFA-1 sur la cellule cible est sous la forme activée, l'adhésion et l'infectivité virale en sont encore plus accrues [21, 49, 58, 59].

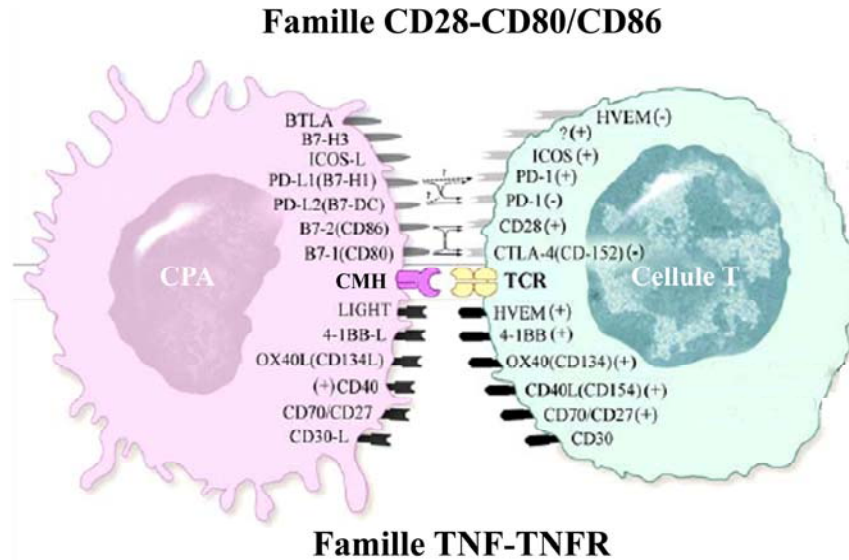
HLA-DR est une molécule faisant partie de la famille des CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et est donc responsable de la présentation antigénique. Les virions ayant incorporé du HLA-DR avec un peptide antigénique de même que la molécule de co-stimulation CD86 peuvent agir en tant que CPA et activer les lymphocytes T de façon spécifique [60]. De plus, la présence de HLA-DR peut également augmenter l'infectivité des virus [61].

Nous avons récemment rapporté que la molécule CD154 est également incorporée lors du bourgeonnement du virus [62]. Bien que cette molécule ait été largement étudiée pour son rôle dans la réponse immunologique, les études sur les effets de sa présence sur les virions ne font que débiter. Une étude antérieure démontre que l'ajout de virions ayant incorporé du CD154 induit l'adhésion homotypique des lymphocytes B ainsi que la production d'immunoglobuline G (IgG) et la sécrétion d'IL-6 par ces mêmes cellules [63].

## Chapitre 3. CD40 et CD154

### 3.1. Les molécules de co-stimulation

Pour qu'un lymphocyte T soit pleinement activé, il nécessite 2 signaux [64]. Lors d'une présentation antigénique entre une CPA et un lymphocyte T, le premier signal consiste en l'interaction entre le CMH de classe II et le TCR. Quant au deuxième signal, il est composé de plusieurs interactions entre des molécules de co-stimulation (revue dans [65]). L'engagement du TCR induit l'expression de CD154 sur le lymphocyte T qui va par la suite interagir avec le CD40 sur la CPA. Cette interaction induit une augmentation de l'expression de CD80 et CD86 sur les CPA qui lient le CD28 sur les cellules T [66]. L'activation est alors suffisante de part et d'autre pour initier une réponse immunitaire. Le lymphocyte T stimulé ainsi est apte à activer les lymphocytes B à produire des anticorps ou à activer les macrophages à détruire les pathogènes intracellulaires. D'autres molécules de co-stimulation ont été découvertes par la suite, mais leur contribution exacte n'a pas été clairement déterminée. Les molécules de co-stimulation sont regroupées en deux familles : CD28-CD80/CD86 et TNF-TNFR selon leur homologie (Figure 9). Certaines molécules au sein de ces familles ont des activités stimulatrices, d'autres, inhibitrices. L'ensemble de ces interactions résulte en un équilibre entre l'activation et la résolution de la réponse immunitaire. Plusieurs des molécules incorporées par le VIH-1 ont un rôle de co-stimulation dans la réponse immunitaire (ex. CD28, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD40 et CD154). Ces dernières appartiennent aux deux familles et sont les deux voies de co-stimulation les plus connues (CD28:CD80/CD86 et CD40:CD154).



**Figure 9 : Les molécules de co-stimulation.** Ces molécules appartiennent à deux familles : CD28-B7 et TNF-TNFR. Les interactions stimulatrices sont indiquées par le symbole (+) et les interactions inhibitrices par le symbole (-). Adaptée de [65]

### 3.2. Le syndrome de l'hyper IgM lié au chromosome X

L'importance de l'interaction CD40-CD154 a été déterminée suite à l'identification de la cause du syndrome de l'hyper IgM lié au chromosome X. Les manifestations cliniques sont des infections récurrentes des voies respiratoires, des diarrhées chroniques d'origine infectieuse ou non, d'hépatites et cirrhoses du foie, d'anémie due à des infections chroniques, de neutropénie (niveau très bas de neutrophiles circulants) et d'hyperplasies des organes lymphoïdes (revue dans [67]). Ces symptômes sont principalement dus à une incapacité à produire des anticorps ayant les isotypes IgG, IgA et IgE et donc d'initier une bonne réponse immunitaire de type humorale permettant le contrôle des infections. Malgré tout, les patients ont un niveau relativement normal d'IgM et IgD et de lymphocytes B et T. De plus, lorsque les lymphocytes B provenant de patients sont cultivés avec des lymphocytes T de donneurs sains, il y a une production d'IgG, IgA et IgE [68]. À partir de ces résultats, les études subséquentes se sont concentrées à identifier la cause de cette perte de fonctions chez les cellules T de ces patients. Plusieurs mutations ont alors été trouvées dans le gène codant pour CD154. Jusqu'à ce jour 217 patients et 105 mutations différentes ont été rapportés sur la banque de données [69]. Les mutations peuvent être ponctuelles et affecter la stabilité de la structure tridimensionnelle de la protéine ou les interactions

protéine-protéine [69]. Aussi, il peut y avoir des insertions ou des délétions d'acides nucléiques menant à l'apparition d'un codon stop prématuré, ce qui résulte en l'absence d'expression de la protéine.

### **3.3. L'interaction CD40-CD154**

Les études sur l'interaction entre CD40 et CD154 ont démontré que ces molécules sont d'une grande importance pour le contrôle de maladies de toutes sortes affectant l'humain. Elles sont impliquées dans la réussite d'une transplantation d'organe, l'apparition de maladies autoimmunitaires, le développement de maladies cardiaques et le cancer. Toutes ces pathologies sont reliées au bon fonctionnement du système immunitaire. L'importance de l'interaction CD40-CD154 a mené à la publication de plusieurs revues de qualité sur la découverte, la structure moléculaire et la régulation de l'expression de ces protéines sur plusieurs cellules [70-72].

#### **3.3.1. Structure de l'interaction**

Les interactions entre les ligands et leurs récepteurs impliquent des acides aminés spécifiques de part et d'autres des protéines. Dans le cas de l'interaction entre CD40 et CD154, cinq acides aminés sur chacune des protéines sont importants [73]. Pour le CD154, les acides aminés critiques sont les suivants : Lys143, Tyr145, Tyr146, Arg203 et Gln220. La structure tridimensionnelle d'un monomère de la protéine fait en sorte que l'acide aminé en position 203 ne se retrouve pas au site d'interaction. Par contre, lorsqu'un dimère est formé, c'est l'acide aminé à cette position provenant du monomère adjacent qui participe à l'interaction. Pour le CD40, les acides aminés impliqués dans l'interaction avec CD154 sont : Glu74, Tyr82, Asp84, Asn86 et Glu117.

Plusieurs anticorps monoclonaux sont utilisés pour stimuler spécifiquement CD40 sur les lymphocytes B [74]. Les épitopes reconnus par ces anticorps sont tous situés dans la région distale du récepteur, mais leur capacité à activer les lymphocytes B diffère. Il existe aussi des anticorps bloquants dirigés contre CD154. La présence de ces anticorps empêche l'activation des lymphocytes B par des lymphocytes T [75]. Aussi, de tels anticorps ont été



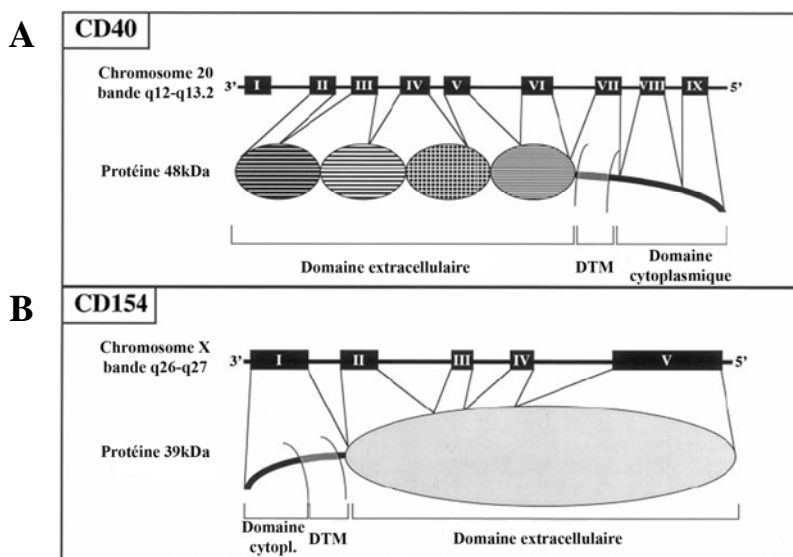
utilisés *in vivo* chez la souris et ont montré une capacité à bloquer la production de différents isotopes d'immunoglobulines [76].

### 3.3.2. Découverte et expression de CD40

Le récepteur CD40 a été découvert tout d'abord sur les lymphocytes B. L'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique contre l'antigène Bp50 (nommé ultérieurement CD40) a induit la prolifération des cellules B [77, 78]. Des études plus approfondies ont permis de détecter sa présence sur d'autres cellules : les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les basophiles, les synoviocytes et les fibroblastes. L'expression de CD40 est constitutive sur la plupart des types cellulaires, mais elle peut être augmentée en présence de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1, l'IL-3, l'IL-4, le TNF- $\alpha$  et le GM-CSF. D'autres stimuli sont également connus comme le VIH, le virus Epstein-Barr (VEB), la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, des esters phorbol, des anticorps contre des IgM ou le CD20 ainsi que l'exposition à de la lumière ultraviolet. L'induction est normalement observée entre 6 et 12 heures suivant la stimulation et atteint son maximum après 24 heures. L'effet persiste pendant une période supplémentaire de 24 à 72 heures.

### 3.3.3. Structure de CD40

Le gène codant pour CD40 est situé sur le chromosome 20 au locus q12-q13.2 (Figure 10). Sa transcription mène à la production d'une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF (de l'anglais *Tumor Necrosis Factor*). Cette famille comprend aussi Fas, OX40, CD27, CD30, 4-IBB, LNGF (de l'anglais *Low-Affinity Nerve Growth Factor*) et les récepteurs du TNF I et II. CD40 est constitué de 3 domaines : une courte queue cytoplasmique de 62 acides aminés, une région transmembranaire de 22 acides aminés et un domaine extracellulaire de 171 acides aminés. La protéine est généralement exprimée à la surface des cellules sous une forme monomérique, mais des dimères ont aussi été observés sur des lymphocytes B [79, 80].



**Figure 10 : Organisation structurale du gène et de la protéine de CD40 et CD154.** Chaque encadré contient l'organisation génomique (haut) et protéomique (bas) du CD40 (A) et CD154 (B). Adaptée de [72]

### 3.3.4. Découverte et expression de CD154

Quelques années après avoir découvert l'importance de CD40 dans la capacité proliférative des lymphocytes B, un premier ligand a été identifié, à savoir TRAP (de l'anglais *TNF Related Activation Protein*), connu maintenant sous le nom de CD154. À l'époque, il était connu que l'activation des cellules B était dépendante de la pré-activation des lymphocytes T et de leur contact physique. De plus, cette activation était polyclonale, non-spécifique et sans restriction à l'égard du CMH. Il fallait donc que le facteur soit présent sur les lymphocytes T suite à leur activation et qu'il soit capable d'activer les lymphocytes B de façon non spécifique sans interagir avec le CMH. C'est à l'aide d'un criblage de l'ADN complémentaire provenant de cellules sélectionnées pour leur capacité à lier un CD40 fusionné à une portion Fc qu'il a été possible d'identifier le ligand [75, 81-84]. Depuis, deux autres protéines ayant la capacité d'interagir avec le CD40 ont été découvertes. Hsp70 (de l'anglais *Heat shock protein*), une protéine de la famille des chaperonnes, induit une signalisation intracellulaire et stimule l'internalisation de peptides extracellulaires [85]. Aussi, une protéine régulatrice de la cascade d'activation classique du complément, C4BP (de l'anglais *C4b binding protein*) peut lier le CD40 à la surface des lymphocytes B et les activer [86].

Le CD154 est présent surtout sur les lymphocytes T, mais aussi de façon moins importante sur les basophiles, les éosinophiles, les monocytes/macrophages, les cellules NK, les lymphocytes B, les plaquettes, les mastocytes, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales. Son expression est induite et transitoire. Le CD154 peut être présent en moins de cinq minutes suivant la stimulation, ce qui indique la présence de protéines déjà formées. L'expression atteint son maximum environ six heures après la stimulation et la protéine est détectable pendant les 12 à 24 heures suivantes. La signalisation menant à la production de CD154 se fait principalement via le TCR, le CD3 et/ou le CD28. D'autres médiateurs ont démontré une capacité à induire le CD154 sur les lymphocytes T tels que l'ionomycine, le PMA, la formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) et des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-4.

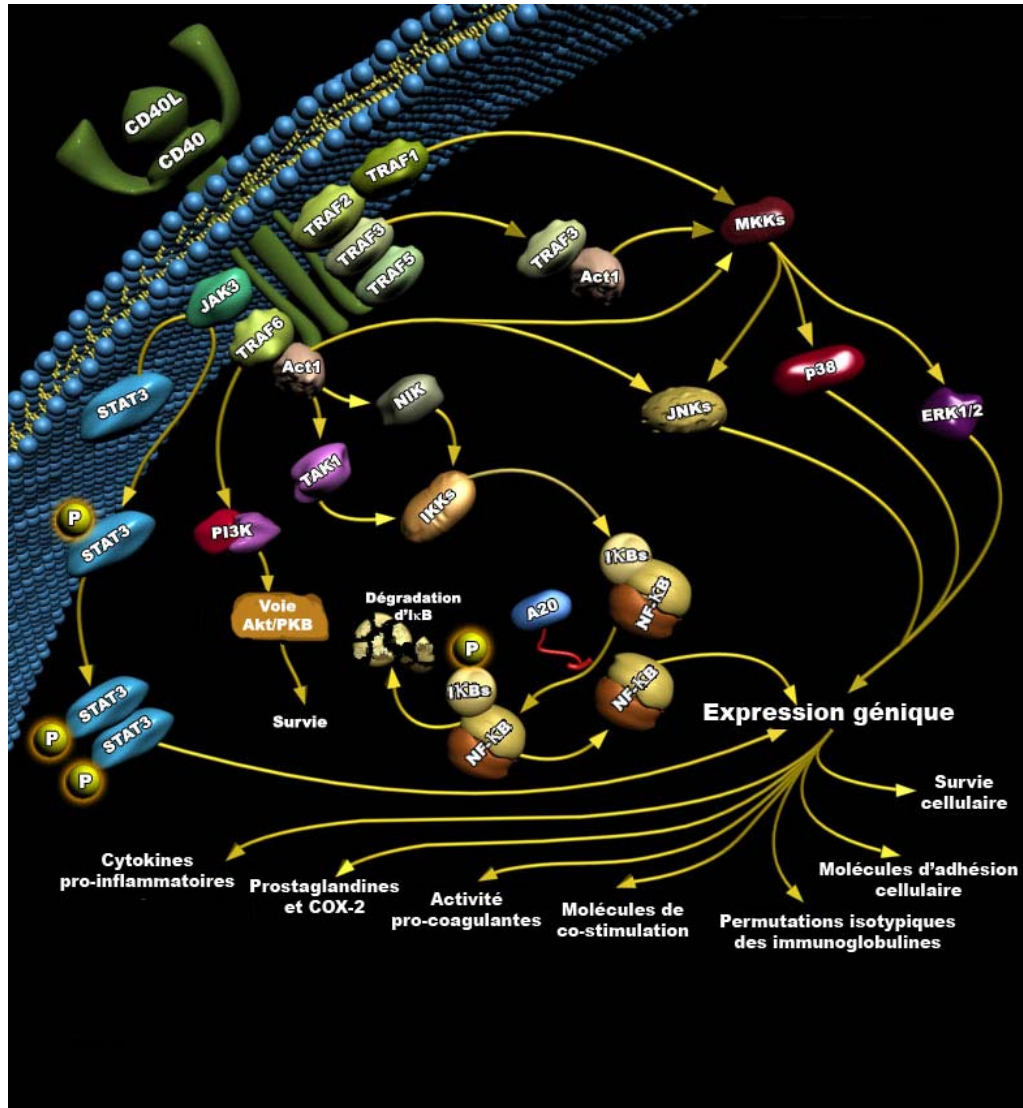
### **3.3.5. Structure de CD154**

Le gène de CD154 code pour une protéine transmembranaire de type II appartenant à la superfamille du TNF. Il est situé sur le chromosome X dans la région q26.3-q27.1 (Figure 10). Les autres membres de cette famille sont le TNF, le CD27 ligand, le CD30 ligand, le Fas ligand, l'OX40 ligand et la lymphotoxine. Elle comprend également trois domaines, une région cytoplasmique de 22 acides aminés, une portion transmembranaire de 24 acides aminés et un domaine extracellulaire de 215 acides aminés. Il a été démontré qu'une forme plus courte et soluble peut également être produite. Le mécanisme derrière la production de cette forme alternative est encore méconnu. Une ambiguïté persiste à savoir si la forme soluble est produite à partir d'un clivage de la forme membranaire ou si elle est préformée dans des vésicules suite à une modification post-transcriptionnelle [87, 88]. Chose certaine, les deux formes proviennent d'un même gène et ne résultent pas d'un épissage alternatif de l'ARN messager puisqu'aucune séquence d'initiation de traduction n'est présente pour la forme soluble [88]. La protéine est exprimée à la surface des cellules sous la forme d'un trimère pouvant être constitué uniquement de protéines entières ou avec des fragments plus courts. En plus de CD40, deux autres récepteurs de CD154 ont été découverts. L' $\alpha$ IIB $\beta$ 3 est une intégrine principalement présente à la surface des plaquettes sanguines. La liaison de cette intégrine par le CD154 stabilise les caillots sanguins lors de

thrombose [89]. CD154 a aussi la capacité de lier une autre intégrine, l' $\alpha 5\beta 1$ , et mène à l'activation de la voie de signalisation de ERK1/2 et à l'expression génique de l'IL-8 [90].

### **3.3.6. Signalisation intracellulaire de CD40**

Les voies de signalisation du CD40 ont beaucoup été étudiées avec des lymphocytes B (Figure 11). Pour qu'il y ait une signalisation, il doit y avoir une trimérisation du CD40 permettant le recrutement des protéines adaptatrices nommées facteurs associés au récepteur du TNF (TRAF) [91]. L'affinité des différents TRAF pour le récepteur varie, modifiant ainsi la signalisation. Celle-ci diffère aussi entre les types cellulaires exprimant le CD40. Toutefois, les études n'ont pas permis d'identifier tous les acteurs impliqués à ce jour. Par exemple, dans les monocytes/macrophages, il est connu que TRAF6 est recruté et mène à l'activation des voies de NF- $\kappa$ B et ERK1/2 [92-94]. Il a aussi été rapporté que JAK3 est recruté et phosphorylé chez les monocytes contrairement aux lymphocytes B dans lesquels il n'est pas phosphorylé. La phosphorylation de JAK3 mène à l'activation de STAT5 $\alpha$  [95].

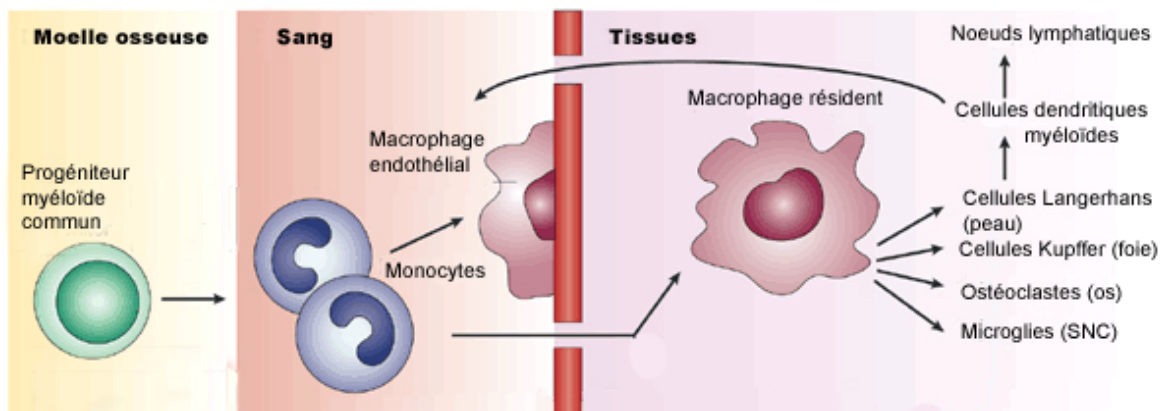


**Figure 11 : Signalisation intracellulaire de CD40 dans les lymphocytes B.** Plusieurs cascades de signalisation sont activées suite à l'interaction entre le CD154 et le CD40 à la surface des lymphocytes B. Celles-ci mènent à l'expression de gènes et à la production de protéines impliqués dans diverses fonctions cellulaires. Adaptée de : [http://www.proteinlounge.com/pathway\\_list\\_details.asp?cat=Cytokines](http://www.proteinlounge.com/pathway_list_details.asp?cat=Cytokines), consulté le 24 mars 2008

## Chapitre 4. Le macrophage

### 4.1. Différenciation et diversité des macrophages

Les macrophages sont des cellules différenciées de façon terminale, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent donner lieu à d'autres types cellulaires. Leur formation débute dans la moelle osseuse sous la forme d'un précurseur nommé monoblaste. Ce précurseur se transforme en promonocyte et monocyte avant d'être mis en circulation dans le sang. Le monocyte circule dans le corps jusqu'à ce qu'il pénètre dans un organe où il se différencie en macrophage (Figure 12). Il existe une hétérogénéité fonctionnelle, morphologique et phénotypique des macrophages en fonction du lieu de migration. Par exemple, dans les poumons ces cellules se nomment macrophages alvéolaires, sont caractérisées par la présence de plusieurs inclusions cytoplasmiques attachées à la membrane et participent à la défense locale contre les pathogènes des voies respiratoires [96]. Au contraire, dans les os, ces cellules sont multinucléées, se nomment des ostéoclastes et sont responsables de la dégradation de la matrice calcifiée [97].



**Figure 12 : Différenciation des monocytes en macrophages et leur distribution *in vivo*.** La différenciation des monocytes en macrophages débute lorsque les précurseurs quittent la moelle osseuse pour se retrouver dans le sang et devenir des monocytes. Sous l'action de différentes cytokines et chimiokines, les monocytes migrent dans différents organes, se différencient en macrophages et acquièrent un phénotype approprié à l'organe de résidence. Adaptée de [98]

## 4.2. Rôles du macrophage dans l'immunité

Les macrophages jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire. Ils sont un moyen de défense important contre une multitude de microorganismes tels que les bactéries, les virus, les champignons et les protozoaires. Ils participent à la reconnaissance de ces pathogènes et à leur phagocytose grâce à la présence de récepteurs spécifiques pour des molécules pathogéniques conservées comme les lipopolysaccharides (LPS), la flagelline, le zymosan et l'ARN simple brin. Ces récepteurs appartiennent à la famille des PRR (de l'anglais *Pathogen Recognition Receptor*) et comprennent entre autres les TLR (de l'anglais *Toll-Like Receptor*), le récepteur du mannose et le récepteur *scavenger* (revue dans [99]). Également, les macrophages possèdent des récepteurs pour la portion Fc des anticorps et pour des composantes du complément permettant la liaison de microorganismes opsonisés [100, 101].

Le processus de phagocytose mène à l'internalisation du pathogène dans un phagosome. Cette vésicule fusionne ultérieurement avec un lysosome et devient un phagolysosome, vésicule où la dégradation du corps étranger se produit. La destruction de ce dernier crée des peptides qui sont présentés au système immunitaire par les CMH-I et CMH-II. Ces peptides sont reconnus par des lymphocytes T spécifiques et l'interaction entre ces deux types cellulaires mènent à leur activation respective, initiant ainsi la réponse immunitaire. Suite à leur activation, les macrophages sécrètent des molécules ayant un potentiel modulateur sur le système immunitaire. On y retrouve entre autres des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , des dérivés de l'acide arachidonique ainsi que des espèces réactives de l'oxygène qui agissent sur l'inflammation [102].

Les macrophages participent de plus à l'hématopoïèse, à l'élimination des globules rouges, au processus de cicatrisation, à l'athérogénèse et au développement des maladies cardiaques ainsi que des maladies du système nerveux central comme la sclérose en plaque [103].

### 4.3. L'infection du macrophage par le VIH-1

Les souches de VIH-1 transmises chez l'homme sont majoritairement du tropisme R5 et infectent surtout les macrophages, en particulier les cellules résidentes comme les microglies et les macrophages alvéolaires [104]. Ces cellules sont résistantes aux effets cytopathiques de l'infection et ont une demi-vie pouvant aller jusqu'à plusieurs années dans le cas des microglies [105]. Par conséquent, elles sont idéales pour l'établissement d'un réservoir stable permettant la progression de la maladie [106, 107]. L'avantage d'établir un réservoir dans des cellules résidentes est de restreindre la biodisponibilité des anti-rétroviraux puisqu'une certaine barrière sépare le sang et les organes diminuant ainsi la concentration du médicament dans les tissus.

La cinétique de réplication du virus dans les macrophages humains dérivés de monocytes du sang périphérique (MDM) est similaire à celle des macrophages *in vivo* [108]. La production virale dans les MDM suite à l'infection par un virus R5 augmente progressivement dans le temps et est maximale au 14<sup>ième</sup> jour suivant l'infection [109]. Par contre, l'infection par un virus X4 est peu productive même si le co-récepteur CXCR4 est présent et fonctionnel à la surface des cellules [110]. Ceci peut être expliqué par le fait que le CXCR4, bien qu'actif à induire une signalisation intracellulaire serait incapable d'initier la fusion des membranes entre le virus et la cellule [110]. Une autre possibilité est qu'un blocage survienne au niveau de la formation du complexe de pré-intégration et de son transport au noyau suite à l'entrée du virus dans la cellule [111]. La réplication virale est sous le contrôle de l'activité du LTR et est influencée par plusieurs facteurs tant extracellulaires qu'intracellulaires. Par exemple, l'exposition au LPS des MDM infectés diminue considérablement la production virale et pourrait être dû à la sécrétion d'interféron de type I [112-114]. Aussi, la stimulation au TNF- $\alpha$  induit la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau qui se lie au LTR et active la transcription virale [115, 116].

La présence du virus dans les macrophages affecte grandement le fonctionnement de ces cellules (revue dans [117]). Leur capacité de phagocytose et d'élimination des pathogènes est diminuée de même que leur activité chimiotactique. De plus, la sécrétion des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires est augmentée contribuant ainsi à l'activation chronique du système immunitaire observée chez les patients.



#### 4.4. Stimulation des macrophages par le CD154

Étant donné l'importance de l'interaction CD40-CD154 dans le fonctionnement adéquat de la réponse humorale, plusieurs études ont porté sur le rôle que pourrait avoir cette interaction sur l'activation des autres cellules exprimant le récepteur comme les macrophages. L'activation du macrophage est nécessaire pour l'élimination des pathogènes intracellulaires et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires.

Tout d'abord, il a été rapporté que la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-8 est augmentée lorsque des monocytes/macrophages sont mis en présence de CD154 trimérique soluble [118-122]. Cette hausse est encore plus prononcée lorsque les macrophages sont différenciés en présence de CD154 soluble puisqu'il y a une augmentation du niveau d'expression du récepteur. De plus, la présence de TNF- $\alpha$  accroît la sécrétion de chimiokines dont le récepteur est CCR5, également le co-récepteur du VIH-1 [118]. Par conséquent, il a été rapporté que l'entrée et la réplication virale sont réduites lorsque les macrophages sont stimulés par CD154 à cause de la présence élevée de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES [118, 123, 124].

De même, une autre classe de protéines est affectée par la stimulation des macrophages avec le CD154, les métalloprotéinases matricielle (MMP). Ces protéines sont sécrétées par divers types cellulaires sous la forme de précurseurs inactifs et sont activées par des MMP déjà activées, la présence de cytokines ou de facteurs de croissance (revue dans [125]). Ce sont des enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice extracellulaire ou activent des pro-cytokines comme le pro-TNF- $\alpha$  et le pro-IL-1 $\beta$  [126, 127]. Un domaine de latence doit être clivé pour que ces protéines soit actives. L'activité des MMP se fait ressentir sur la migration cellulaire, l'angiogénèse, la cicatrisation et la prolifération cellulaire et elle est aussi hautement régulée par la présence d'inhibiteurs spécifiques, les TIMP (de l'anglais *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*) (revue dans [125, 128, 129]). Il existe plus de 20 MMP différentes, mais seulement les MMP-1, -2, -3, -9, et -12 sont augmentées par les macrophages suivant la stimulation par le CD154 [130-133].

## 4.5. Les cytokines, chimiokines et MMP dans la pathogénèse du VIH-1

Au cours de l'infection avec le VIH-1, la production de ces protéines est modulée à la hausse. Le niveau d'IL-8 et de TNF- $\alpha$  est élevé dans le sérum, les organes lymphoïdes et le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients infectés [134-137]. De même, on détecte une augmentation des MMP-2 et -9 dans le LCR et la salive [138-140]. Leur présence peut jouer un rôle important dans la pathogénèse du VIH-1 (revue dans [141] et [142]). Par exemple, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-8 augmentent la réplication virale (Tableau 2) et la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP favorise la propagation du virus dans le corps (Tableau 3).

**Tableau 2 : Conséquences sur la pathogénèse de la présence de cytokines et chimiokines**

<b>Cytokines/Chimiokines</b>	<b>Effets sur la pathogénèse</b>
<b>IL-1<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-8</b>	Stimulent la réplication virale via l'activation de NF- $\kappa$ B
<b>MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-1<math>\beta</math>, IL-8</b>	Augmentent l'infection en recrutant les lymphocytes T par chimiotactisme
<b>RANTES</b>	Augmente l'infection en activant les lymphocytes T

**Tableau 3 : Conséquences sur la pathogénèse de la présence de MMP**

<b>Activités des MMP</b>	<b>Effets sur la pathogénèse</b>
<b>Dégradation de la matrice extracellulaire</b>	Favorise la propagation du virus
	Destruction de certains organes
	Démence associé au VIH
<b>Activation de cytokines pro-inflammatoires</b>	Crée un environnement inflammatoire favorable à la réplication virale

## Chapitre 5. Hypothèse de recherche et objectifs

Il a été démontré que l'interaction CD40-CD154 est cruciale pour l'initiation d'une réponse immunitaire et la production d'anticorps de plus grande affinité (isotypes IgG, IgA, IgE). Cette interaction est suffisante pour activer les macrophages à sécréter des cytokines, des chimiokines et des MMP dont leur activité exacerbe la pathogénèse de l'infection par le VIH-1. De plus, les individus infectés présentent des niveaux élevés de ces protéines.

Martin *et coll.* ont démontré que le CD154 est incorporé dans l'enveloppe du VIH-1 et que de tels virus ont la capacité d'activer les lymphocytes B *in vitro* [62, 63]. Alors, nous avons voulu vérifier l'hypothèse générale selon laquelle un virus ayant la protéine CD154 à sa surface provoquerait l'activation des MDM en se liant à son récepteur CD40 présent sur ce type cellulaire. Nos objectifs plus spécifiques étaient :

1. Vérifier si cette interaction pouvait induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les MDM.
2. Évaluer la production de MMP suite à un tel contact entre le virus ayant du CD154 et les MDM.
3. Déterminer si les protéines d'enveloppe virale sont nécessaires à l'induction de cytokines pro-inflammatoires.
4. Vérifier si les effets observés sont spécifiquement dus à la présence de CD154.

## **Chapitre 6. Matériels et méthodes**

### **6.1. Réactifs et anticorps**

Le M-CSF a été obtenu de Genscript (Piscataway, NJ). L'hybridome sécrétant l'anticorps anti-CD40 (clone G28.5, isotype IgG1), utilisé pour l'adhésion homotypique et la cytométrie de flux, est une gracieuseté de Dr W. Mourad (Université de Montréal, Montréal). L'anticorps secondaire chèvre-anti-souris couplé au fluorochrome PE (phycoérythrine) est acheté chez Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). L'anticorps anti-CD154 (clone M90.1, isotype IgG1) utilisé pour l'immunocapture est acheté chez BD Biosciences (San Jose, CA). L'ensemble de détection de SEAP, Quanti-Blue™, provient de chez InvivoGen (San Diego, CA).

### **6.2. Cellules**

#### **6.2.1. Culture des cellules 293T**

Les cellules humaines embryonnaires de rein 293T ont été obtenues de l'ATCC et sont cultivées dans du milieu DMEM (Invitrogen, Burlington, ON) dans lequel 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 10% de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur sont ajoutés.

#### **6.2.2. Culture des macrophages dérivés de monocytes**

Les MDM sont obtenus à partir de monocytes primaires purifiés par adhérence au plastique dans du RPMI 1640 (Wisent, St-Bruno, QC) dans lequel 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 5% de sérum autologue inactivé par la chaleur sont ajoutés. Brièvement, les cellules mononucléées du sang périphérique sont isolées par Ficoll-Hypaque et  $1 \times 10^7$  cellules/mL sont réparties dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> dans du RPMI 1640 complet. Après une heure d'adhésion, les cellules non-adhérentes sont retirées et les cellules restantes sont lavées avec une solution de PBS 1X. Les monocytes sont par la suite cultivés dans du RPMI 1640 complet et 10 ng/mL de M-CSF pendant sept jours. Les MDM sont alors incubés dans une solution de PBS 1X EDTA 5 mM pendant 20 minutes et

récupérés en grattant doucement le fond du flacon. Les cellules sont réparties dans des puits de plaques 24 puits à raison de  $2 \times 10^5$  cellules/puit dans du RPMI 1640 complet.

### **6.2.3. Culture des cellules CD40-293-SEAP**

La lignée cellulaire CD40-293-SEAP est une gracieuseté du Dr R. Kornbluth (Université de Californie, San Diego). Ces cellules rapportrices ont été conçues pour répondre à la présence de CD154 puisqu'elles expriment le récepteur CD40 et contiennent le gène rapporteur codant pour l'enzyme SEAP (de l'anglais *Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase*). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM dans lequel 10% de sérum bovin fœtal, 500 µg/mL de généticine et 100 µg/mL de zéocine sont ajoutés.

## **6.3. Plasmides et production virale**

Le plasmide codant pour l'ADN complet d'un virus infectieux de type R5, le pNL4.3Balenv, nous a été fourni par le Dr R. Pomerantz (Thomas Jefferson University, Philadelphie). Le plasmide codant pour l'ADN d'un virus déficient en protéine de l'enveloppe, le pNL4.3Δenv, est une gracieuseté du Dr D.E. Ott (National Cancer Institute). Les plasmides codant pour le CD154 (pcDNA3.1\_CD40L) et sa forme mutée (pcDNA3.1\_CD40L\_T147N) proviennent du Dr R. Kornbluth (Université de la Californie, San Diego).

Les virus exprimant ou non du CD154 à leur surface sont produits par co-transfection selon la méthode de précipitation au calcium-phosphate de cellules 293T. Les cellules sont mises dans des flacons 75 cm<sup>2</sup> à une concentration de  $2 \times 10^4$  cellules/mL la veille de la transfection. La transfection s'effectue en mélangeant 40 µg d'ADN à 62,5 µL d'une solution de CaCl<sub>2</sub> 2 M et le volume est complété à 500 µL avec de l'eau stérile. Le tout est ajouté à 500 µL d'une solution de HBS 2X. Les plasmides sont utilisés à un ratio de 4:1 (32 µg d'ADN viral et 8 µg d'ADN de CD154). Pour les virus sans CD154, le plasmide contenant l'insert codant pour le CD154 est remplacé par un plasmide seul sans insert. Le contrôle négatif correspond à une culture témoin à infection simulée dans laquelle les cellules 293T sont transfectées avec 8 µg du plasmide codant pour le CD154 et d'un plasmide vide pour compléter la quantité d'ADN à 40 µg. Environ 16 h suivant la

transfection, les cellules sont lavées avec une solution de PBS 1X et 10 mL de milieu DMEM complet est ajouté. Vingt-quatre heures après, les surnageants contenant les virus sont récupérés, filtrés à 0,22  $\mu\text{m}$ , aliquotés en 500  $\mu\text{L}$  et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La quantité de virus est évaluée en utilisant un test ELISA maison qui détecte la p24 et l'incorporation de CD154 est évaluée par un test d'immunocapture maison.

#### **6.4. Détection de cytokines et MMP**

Les MDM ( $2 \times 10^5$  cellules) sont mis en présence de 40 ng de p24, d'un volume de surnageant d'infection simulée équivalent à celui des virus les moins concentrés ou de cellules 293T fixées exprimant ou non du CD154 à un ratio de 1 (293T) : 2 (macrophages) pendant 24 h pour les cytokines et pendant 24 h et 48 h pour les MMP. Les surnageants des cellules ainsi stimulées sont récoltés, conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  et analysés pour détecter la présence de la chimiokine IL-8. Pour le test de détection des MMP, les surnageants sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'IL-8 est dosée avec l'ensemble ELISA DuoSet selon les instructions du manufacturier (R&D System, Mineapolis, MN). Les MMP sont dosés avec l'ensemble Fluorokine® MAP selon les instructions du manufacturier (R&D System, Mineapolis, MN) en utilisant la technologie xMAP de Luminex™ (Luminex Corp, Austin, TX).

#### **6.5. Détection et quantification de SEAP**

Les cellules CD40-293-SEAP sont réparties dans les puits d'une plaque 96 puits à raison de  $2 \times 10^4$  cellules par puits dans 100  $\mu\text{L}$  et incubées toute la nuit. Le lendemain, 16 ng de p24, le volume de surnageant d'infection simulée correspondant aux virus les moins concentrés ou des cellules 293T fixées exprimant ou non du CD154 à un ratio 1:1 sont ajoutés pour un volume total de 200  $\mu\text{L}$ . Après 24 h, les surnageants sont récoltés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La quantité de SEAP est mesurée selon le protocole du test Quanti-Blue™ fourni par la compagnie. Brièvement, 200  $\mu\text{L}$  de la solution Quanti-Blue™ sont répartis dans chaque puit d'une plaque 96 puits et 20  $\mu\text{L}$  de chaque surnageant sont ajoutés. La réaction enzymatique se déroule pendant trois heures et la densité optique est lue à la longueur d'onde 630 dans un spectrophotomètre.

## **6.6. Production de cellules 293T fixées exprimant ou non le CD154**

Les cellules 293T sont transfectées par la méthode de précipitation au calcium-phosphate avec 8 µg d'ADN de CD154 et 32 µg d'un plasmide vide pour un total de 40 µg selon le protocole standard. Une fois transfectées, les cellules sont incubées dans une solution de PBS 1X EDTA 5 mM pendant 20 minutes et récupérées en grattant doucement pour les décoller. Elles sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde 1% pendant 20 minutes, puis les cellules sont lavées à plusieurs reprises avec une solution de PBS 1X pour éliminer toute trace de paraformaldéhyde. Finalement, elles sont comptées et congelées à -80°C à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/mL.

## **6.7. Cytométrie de flux**

Les MDM sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde 2% pendant 20 minutes et lavés plusieurs fois avec une solution de PBS 1X. Ensuite, les cellules sont incubées 30 minutes à 4°C dans une solution de PBS 1X et de 10% de sérum humain pour bloquer les récepteurs Fc, lavées et incubées 30 minutes à 4°C avec 1 µg d'anticorps anti-CD40 ou de l'isotype approprié. Les cellules sont lavées une fois de plus et incubées 30 minutes à 4°C avec un anticorps secondaire spécifique contre la portion Fc des anticorps et couplé au fluorochrome PE. Les cellules sont lavées une dernière fois et la fluorescence est mesurée sur un appareil Epics®XL FACS (Beckman Coulter).

## **6.8. Isolement de lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont isolés à partir d'amygdales obtenues de jeunes enfants suite à une amygdalectomie. Brièvement, à la réception, l'amygdale est immergée dans 30 mL d'une solution de PBS 1X, pénicilline, streptomycine et fungizone pendant une heure. Ensuite, elle est coupée en très petits morceaux et broyées dans une solution de PBS 1X. Le broyat est pré-filtré dans un filtre de pré-séparation de chez Miltenyi Biotec (Auburn, CA) pour éliminer les morceaux restants et les cellules sont purifiées par sélection positive à l'aide du marqueur CD19, spécifique aux lymphocytes B. L'ensemble de séparation cellulaire pour

lymphocytes B de Miltenyi Biotec ainsi que le séparateur automatique AutoMACS™ sont utilisés à cette fin.

### **6.9. Adhésion homotypique des lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont purifiés à partir d'amygdale et  $3 \times 10^5$  cellules sont réparties dans chaque puit d'une plaque 48 puits dans 300  $\mu\text{L}$  de RPMI complet dans lequel 400 U/mL d'IL-4 et 50 ng/mL d'IL-10 sont ajoutés. 60 ng de p24, le volume de surnageant d'infection simulée équivalent au virus le moins concentré ou 0,3  $\mu\text{g}$  d'anticorps anti-CD40 sont ajoutés aux cellules pendant 72 h. La formation d'amas de cellules est évaluée à l'œil sur un microscope inversé et supportée par la prise de photos.



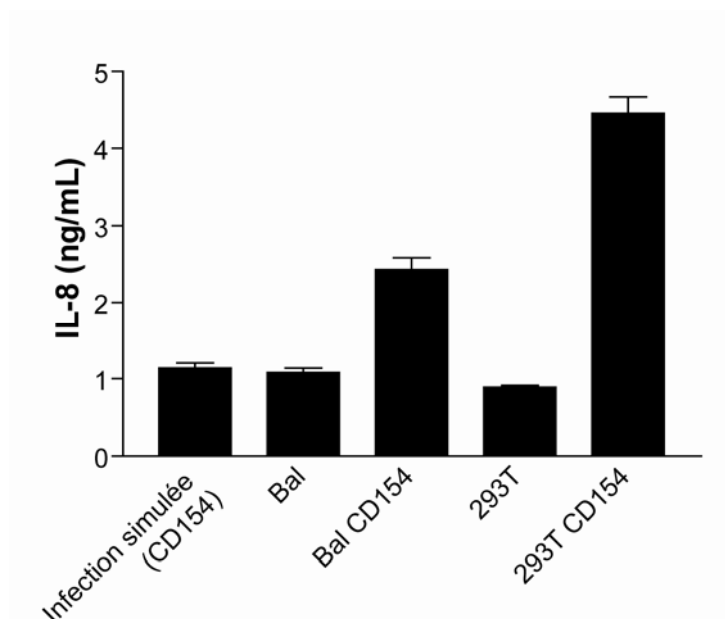
## **Chapitre 7. Résultats**

### **7.1. Activation des macrophages par le CD154**

L'activation du macrophage induit la sécrétion de plusieurs facteurs solubles comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . De plus, il a été démontré que ces cytokines de même que l'IL-6 et l'IL-8 sont produites suite à l'interaction entre le CD154 et le CD40 sur les macrophages [118-122]. Nous avons donc vérifié si un virus arborant du CD154 à sa surface a la capacité de stimuler la production de la chimiokine IL-8 suite à l'interaction avec le macrophage.

#### **7.1.1. Production d'IL-8 par les macrophages**

Nous avons mis des MDM en présence de virus de type R5 qui ont (Bal CD154) ou n'ont pas (Bal) de CD154 à leur surface. Après 24 h de stimulation, nous avons mesuré la présence d'IL-8 dans le surnageant des cellules par ELISA. Nous avons observé que seul les virus ayant incorporé du CD154 (Bal CD154) peuvent induire la sécrétion d'IL-8 à un niveau supérieur que le contrôle d'infection simulée (respectivement 2,43 ng/mL et 1,14 ng/mL) (Figure 13). Les surnageants provenant des cellules stimulées par des virus sans CD154 (Bal) contiennent des quantités d'IL-8 similaires au contrôle négatif d'infection simulée (1,08 ng/mL). Nous avons également observé que l'utilisation de cellules 293T transfectées avec du CD154 (293T CD154) s'avère un bon choix de contrôle positif d'autant plus que les cellules transfectées avec un plasmide sans insert (293T) n'ont pas d'effets sur la sécrétion d'IL-8 (respectivement 4,46 ng/mL et 0,89 ng/mL). Donc, un virus produit sur des cellules exprimant la molécule CD154 interagit avec les macrophages et induit la sécrétion d'IL-8.



**Figure 13 : Sécrétion d'IL-8 par les MDM en présence de virus avec ou sans CD154.** Les MDM ( $2 \times 10^5$ ) ont été exposés à 40 ng de p24 ou à volume équivalent de surnageant d'infection simulée provenant de la production virale A pendant 24 h. Infection simulée : contrôle de production virale avec le plasmide de CD154 seulement; Bal : VIH-1 seul; Bal CD154 : VIH-1 avec du CD154 à sa surface; 293T : cellules transfectées avec un plasmide sans insert; 293T CD154 : cellules transfectées avec un plasmide codant pour le CD154. La sécrétion d'IL-8 a été mesurée par ELISA. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de triplicata et sont représentatifs de six donneurs différents.

### 7.1.2. Variabilité entre les différentes productions virales utilisées

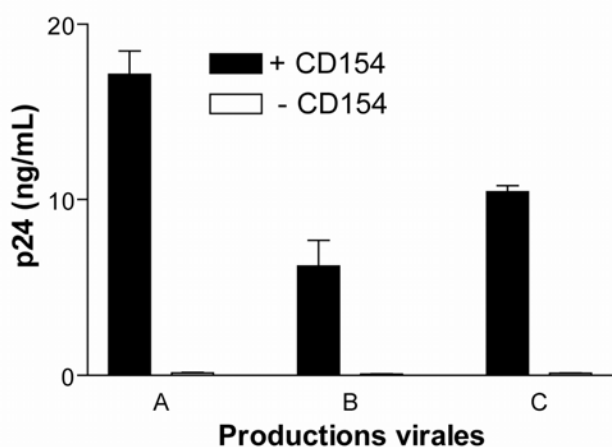
Nous avons par la suite tenté de confirmer ces résultats avec d'autres productions virales de souche Bal. Nous avons remarqué que la capacité des virus à induire la sécrétion d'IL-8 n'était pas la même pour chaque production virale. Le tableau 4 résume leur utilisation et leur efficacité. Par exemple, la production virale A a été utilisée six fois et dans tous les cas l'IL-8 a été détecté en plus grande quantité dans les surnageants de cellules exposées au virus arborant du CD154. Ces observations sont les mêmes pour la production virale C, mais celle-ci n'a été utilisée qu'une seule fois. Toutefois, la production virale B n'a fonctionné qu'une seule fois sur quatre. Bien que la présence de CD154 stimule la production de cette chimiokine, un autre facteur semble en cause puisque l'augmentation d'IL-8 n'est pas toujours observée.

**Tableau 4 : Variabilité de la sécrétion d'IL-8 entre les différentes productions virales de VIH-1 ayant incorporé du CD154 dans leur enveloppe**

Productions Virales	Efficacité (réussites/tentatives)
A	6/6
B	1/4
C	1/1

## 7.2. Présence de CD154 sur les virus

Nous avons alors examiné différents facteurs pouvant être responsables de cette variabilité. Tout d'abord, nous avons vérifié la présence de CD154 sur les virus. Puisque toutes les productions virales ont fonctionné au moins une fois, nous nous attendions à ce que le CD154 soit incorporé. Par contre, cette expérience nous a permis de comparer le niveau d'incorporation de CD154 entre les productions virales. La technique d'immunocapture ne permet pas de quantifier le CD154 sur les virus, mais permet plutôt de quantifier la p24 associée au CD154, c'est-à-dire, la p24 provenant des virus qui ont incorporé une quantité minimale de CD154 pour être capturés. Les productions virales A et C ont donné une quantité de p24 associée au CD154 de 17,1 ng et 10,4 ng respectivement tandis que la production virale B n'a donné que 6,2 ng (Figure 14). Ces résultats suggèrent que la production virale A contient davantage de virus avec du CD154 à leur surface que les autres productions virales.



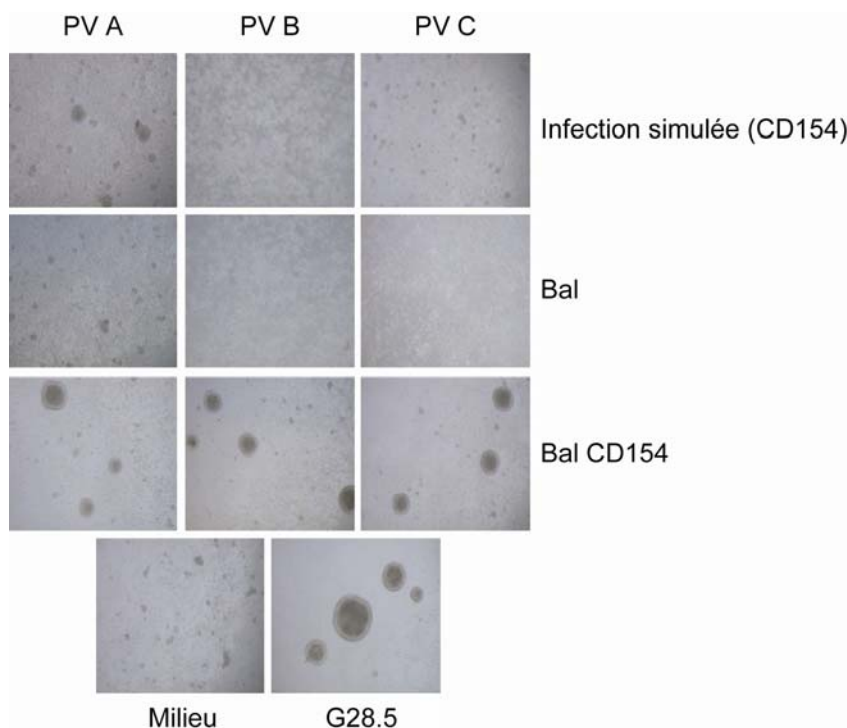
**Figure 14 : Niveau d'incorporation de CD154 par différentes productions virales.** Le niveau d'incorporation de CD154 sur les virus a été évalué par immunocapture. Les valeurs obtenues avec l'isotype ont été soustraites des valeurs obtenues avec l'anticorps anti-CD154 pour chaque virus. Les valeurs correspondent à la moyenne +/- l'erreur-type de duplicata.

### **7.3. Fonctionnalité du CD154 sur les virus**

Après avoir confirmé l'incorporation de CD154 par les virus et comparé les productions entre elles, nous voulions nous assurer que la protéine était fonctionnelle à activer les macrophages. Notre équipe avait déjà démontré que le CD154 incorporé par des virus produits par la même technique était fonctionnel et avait la capacité d'induire l'adhésion homotypique des lymphocytes B [63]. Nous nous attendions donc à ce qu'il en soit de même. Néanmoins, nous nous devons de vérifier toutes les possibilités.

#### **7.3.1. Adhésion homotypique des lymphocytes B en présence de virus arborant du CD154**

Tout d'abord, nous avons répété une expérience réalisée par Martin *et coll.* avec nos productions virales. Nous avons isolé des lymphocytes B d'amygdales et les avons exposés à nos diverses préparations virales pendant 72 h. Des études ont suggéré que la formation d'amas de lymphocytes B résulte de la signalisation intracellulaire via le CD40 [143, 144]. Nous avons observé que les virus ayant incorporé des molécules de CD154 et provenant des différentes productions virales ont la capacité d'induire l'adhésion des lymphocytes B (Figure 15). Les amas formés suite à l'activation des cellules sont différents de ceux retrouvés dans le milieu contrôle. Ils sont pour la plupart plus gros et ceinturés d'un anneau clair. Donc, le CD154 à la surface de nos virus est fonctionnel pour l'adhésion homotypique chez les lymphocytes B.



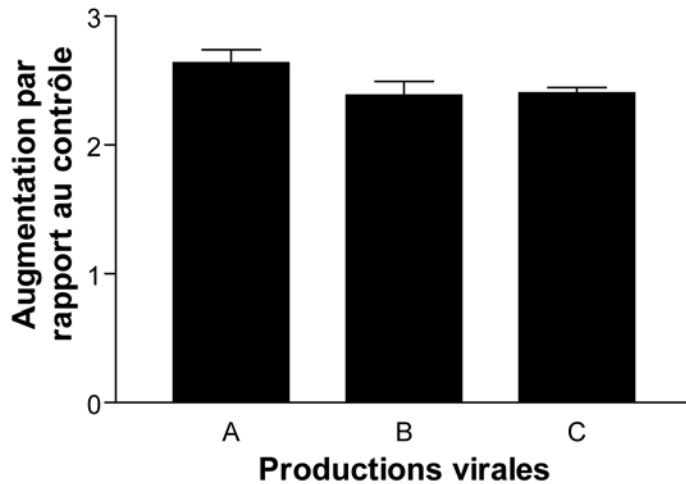
**Figure 15 : Induction de l'adhésion homotypique des lymphocytes B par la présence de CD154 sur les virus.** Les lymphocytes B ( $3 \times 10^5$ ) ont été mis en présence de virus avec ou sans CD154 ou un volume équivalent de surnageant d'infection simulée pendant 72 h. La formation d'amas cellulaires a été évaluée par observation microscopique. Infection simulée : contrôle de production virale avec le plasmide de CD154 seulement; Bal : VIH-1 seul; Bal CD154 : VIH-1 avec du CD154 à sa surface; G28.5 : contrôle positif.

### 7.3.2. Production de SEAP par une lignée cellulaire rapportrice

Une lignée cellulaire rapportrice nous a été gracieusement donnée pour vérifier la fonctionnalité de CD154 sur nos virus. Cette lignée consiste en des cellules 293 transfectées à la fois avec un plasmide codant pour le récepteur CD40 et un plasmide codant pour la SEAP. La production de SEAP est sous le contrôle de l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Lorsque le CD40 est engagé par son ligand, une signalisation intracellulaire est enclenchée et mène à l'activation de NF- $\kappa$ B. Ce dernier active la production de SEAP qui est ensuite sécrétée dans le surnageant. Il est possible de mesurer la présence de SEAP par un simple test colorimétrique.

Nous avons exposé les cellules aux différents virus sur une période de 24 h et récupéré les surnageants afin de détecter la présence de SEAP. Les surnageants ont été incubés avec la solution Quanti-blue™ pendant trois heures et la densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 630 nm. La figure 16 représente l'augmentation de la production de SEAP avec un virus arborant du CD154 par rapport à celle d'un virus sans CD154. Nous avons observé que la production de SEAP varie très peu entre les productions virales

malgré le fait que le niveau d'incorporation de CD154 par le virus et sa capacité à induire la sécrétion d'IL-8 par les MDM varient beaucoup.

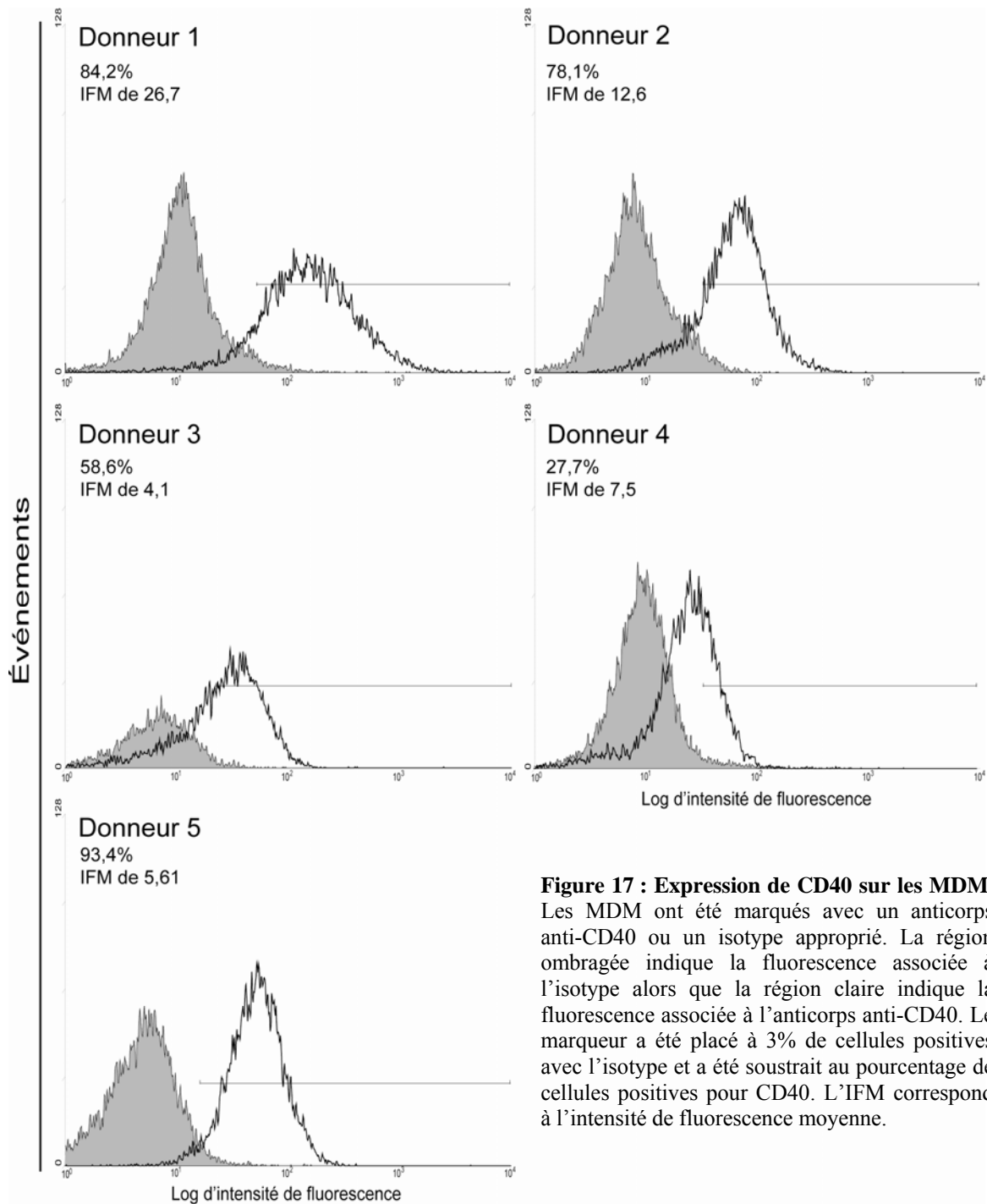


**Figure 16 : Production de SEAP par les cellules CD40-293-SEAP en présence de virus avec du CD154.** Les cellules CD40-293-SEAP ( $2 \times 10^4$ ) ont été mises en présence de 16 ng de p24 de virus avec ou sans CD154 pendant 24 h. La sécrétion de SEAP a été évaluée avec la solution Quanti-Blue™ et la densité optique a été mesurée à la longueur d'onde 630. Les valeurs représentent l'augmentation de la densité optique par un virus avec du CD154 par rapport à un virus sans CD154 et correspondent à la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de triplicata.

#### 7.4. Présence de CD40 sur les macrophages

Puisqu'une même production virale génère des résultats variés entre des donneurs différents, nous avons émis l'hypothèse que le niveau d'expression du récepteur CD40 sur les macrophages pourrait être important dans la réponse de la cellule au stimulus CD154. Nous avons alors vérifié par cytométrie le pourcentage de cellules positives pour la présence de CD40 sur cinq donneurs différents (Figure 17).

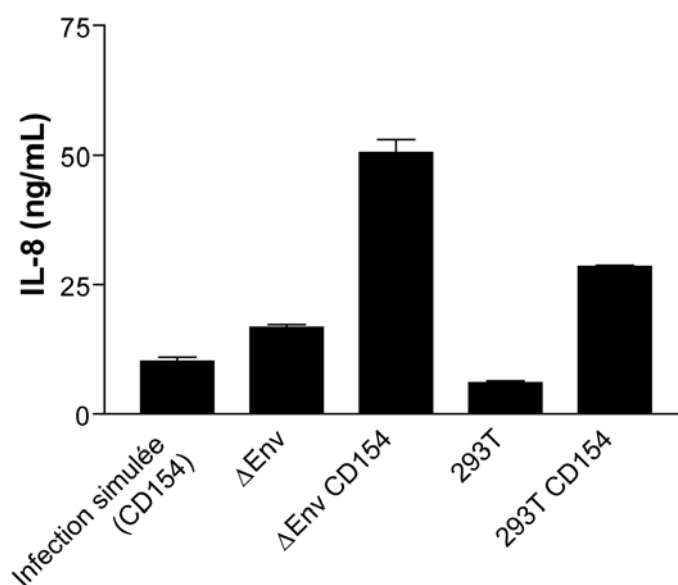
À notre grande surprise, l'expression de CD40 diffère grandement entre les donneurs pouvant être aussi peu que 27,7% et allant jusqu'à 93,4 %. Ceci indique que les cellules peuvent aussi être une cause de la variabilité observée. Nous ne pouvons en être certains, puisqu'il nous est impossible à ce jour de corréliser le niveau d'expression de CD40 avec la sécrétion d'IL-8. Ces deux données n'ont pas été évaluées sur un même donneur encore.



**Figure 17 : Expression de CD40 sur les MDM.** Les MDM ont été marqués avec un anticorps anti-CD40 ou un isotype approprié. La région ombragée indique la fluorescence associée à l'isotype alors que la région claire indique la fluorescence associée à l'anticorps anti-CD40. Le marqueur a été placé à 3% de cellules positives avec l'isotype et a été soustrait au pourcentage de cellules positives pour CD40. L'IFM correspond à l'intensité de fluorescence moyenne.

## 7.5. Rôles de CD4 et de CCR5 dans l'induction d'IL-8

Nous nous sommes demandés si l'interaction entre les protéines de l'enveloppe virale et les récepteurs CD4 et CCR5 participait à l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 observée chez les MDM. Il est connu qu'une signalisation intracellulaire est possible par ces récepteurs. Celle-ci pourrait influencer la signalisation requise pour la production d'IL-8. Nous avons produits des virus déficients en gp120 et gp41 ( $\Delta$ env). Ces virus ne peuvent pas entrer dans une cellule par fusion puisqu'ils sont incapables de lier le récepteur CD4 et les co-récepteurs CCR5 et CXCR4. Nous avons mis les MDM en présence de tels virus qui ont ( $\Delta$ Env CD154) ou n'ont pas ( $\Delta$ Env) de CD154 à leur surface et mesuré la présence d'IL-8 dans les surnageants. Les virus avec du CD154 induisent trois fois plus la sécrétion de la chimiokine par les MDM que les virus sans CD154 (50,5 ng et 16,7 ng respectivement) (Figure 18). Ces résultats indiquent que les protéines de l'enveloppe ne participent pas à l'augmentation de la production d'IL-8 par les MDM.

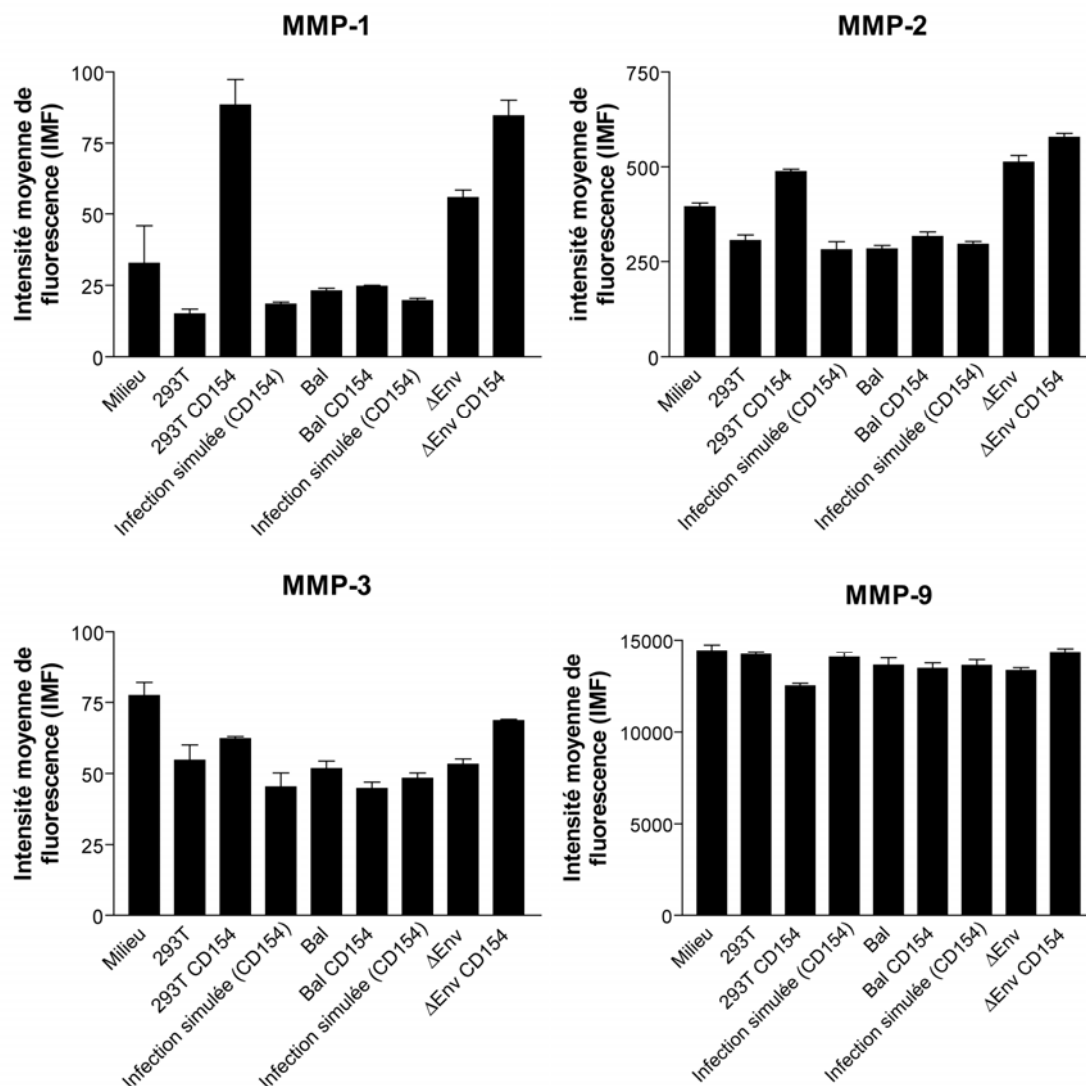


**Figure 18 : Sécrétion d'IL-8 par les MDM en présence de virus  $\Delta$ env avec ou sans CD154.** Les MDM ( $2 \times 10^5$ ) ont été exposés à 40 ng de p24 ou d'un volume équivalent de surnageant d'infection simulée pendant 24 h. Infection simulée : contrôle de production virale avec le plasmide de CD154 seul;  $\Delta$ Env : VIH-1 déficient en protéines d'enveloppe;  $\Delta$ Env CD154 : VIH-1 déficient en protéines d'enveloppe avec du CD154; 293T : cellules transfectées avec un plasmide sans insert; 293T CD154 : cellules transfectées avec le plasmide de CD154. La sécrétion d'IL-8 a été mesurée par ELISA. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de triplicata.



## 7.6. Production de MMP par les macrophages en présence de CD154

Plusieurs études ont rapporté que l'interaction entre CD154 et CD40 sur les macrophages mène à une production de MMP [130-133]. Il existe une grande variété de ces enzymes, mais quelques unes seulement sont produites par les macrophages. Puisque les MMP pouvant être produites dans notre système étaient inconnues, nous avons utilisé la technologie xMAP de Luminex™ pour les détecter. Cette technique permet un étalonnage de plusieurs protéines pour un même échantillon. Nous avons inclus le matériel de détection pour les MMP-1, -2, -3 et -9 puisque ce sont celles rapportées dans la littérature comme étant produites par les macrophages suite à l'interaction CD40-CD154 [130-133]. De plus, nous ne connaissions pas la cinétique de production et sécrétion de ces protéines dans notre système. Nous avons alors mis les MDM en présence de nos virus avec ou sans CD154 sur une période de 24 et 48 h et avons récolté les surnageants pour l'analyse. Puisque nous avons observé une grande variabilité entre nos productions virales et afin de maximiser nos chances de réussite, nous avons utilisé la production virale A, celle qui a montré une plus grande efficacité. Aussi, nous avons utilisé le virus  $\Delta$ env puisqu'il avait donné une bonne augmentation de la production d'IL-8 et nous fournissait un élément comparatif. Malheureusement, les résultats n'ont pas été très concluants. Aucune MMP ne semblent modulées par la présence de CD154 sur nos virus (Figure 19). Par contre, la présence de CD154 sur les cellules 293T utilisées en contrôle positif accroît la sécrétion de la MMP-1 en comparaison avec les cellules qui n'en ont pas. Les virus  $\Delta$ env influencent aussi à la hausse la sécrétion de la MMP-1, mais cette augmentation ne semble pas spécifique à la présence de CD154 (Figure 19). Bien que l'augmentation de la MMP-1 soit plus importante avec le virus arborant du CD154, il reste néanmoins que le virus sans CD154 a lui aussi un effet positif significatif. Ces observations s'appliquent également à la MMP-2 (Figure 19), mais l'augmentation est moins apparente lorsque nous comparons avec l'ajout de milieu seul. Pour ce qui est des MMP-3 et -9, aucune différence n'est détectable entre les conditions. Toutefois, les valeurs pour la MMP-9 se situent à la limite supérieure de la détection et une dilution supplémentaire nous permettrait peut-être de détecter une modulation. Les observations sont similaires à 24 h pour les quatre MMP (données non présentées).

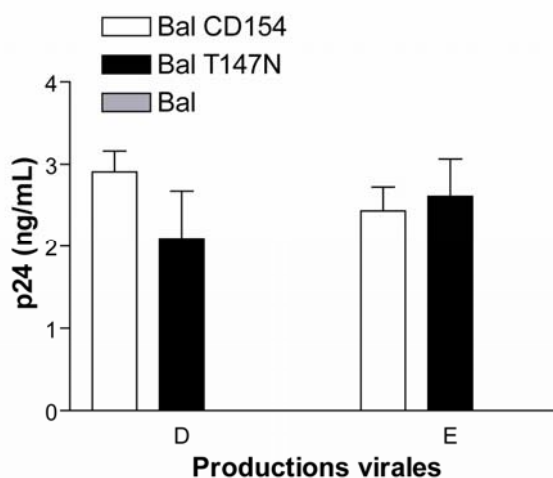


**Figure 19 : Production de MMP par les MDM en présence de CD154.** Les MDM ( $2 \times 10^5$ ) ont été mis en présence de virus Bal ou  $\Delta env$  avec ou sans CD154 pendant 24 h et 48 h. Infection simulée : contrôle de production virale avec le plasmide de CD154 seulement; Bal : VIH-1; Bal CD154 : VIH-1 avec du CD154;  $\Delta Env$  : VIH-1 déficient en protéines d'enveloppe;  $\Delta Env$  CD154 : VIH-1 déficient en protéines d'enveloppe avec du CD154; 293T : cellules transfectées avec un plasmide sans insert; 293T CD154 : cellules transfectées avec le plasmide de CD154. La production des différentes MMP a été mesurée par la technologie xMAP de Luminex™. Les résultats correspondent à la moyenne +/- l'erreur-type de triplicata.

## 7.7. Spécificité de CD154

### 7.7.1. Présence de CD154 muté sur les virus

Afin de s'assurer de la spécificité de CD154 dans nos observations, nous avons produit des virus en présence d'un CD154 muté. Plusieurs mutations existent naturellement dans le gène codant pour CD154. Elles sont pour la plupart responsables de l'apparition du syndrome d'hyper IgM associé au chromosome X [69]. Ces mutations affectent l'expression, la structure tridimensionnelle ou l'interaction de la protéine avec son récepteur. La mutation utilisée dans nos expériences est caractérisée par une substitution de la thréonine en asparagine à la position 147 (T147N) et affecte la liaison avec le CD40 [145]. Tout d'abord, nous avons vérifié que la forme mutée était bel et bien incorporée. La quantité de p24 associée au CD154 récupérée par la technique d'immunocapture est semblable pour les deux virus (2,90 ng/mL (Bal CD154) et 2,10 ng/mL (Bal T147N) pour la production virale D et 2,44 ng/mL (Bal CD154) et 2,61 ng/mL (Bal T147N) pour la production virale E) (Figure 20). Ces résultats suggèrent que le niveau d'incorporation des deux formes de la protéine, est similaire et permet une comparaison entre les résultats obtenus pour ces virus.



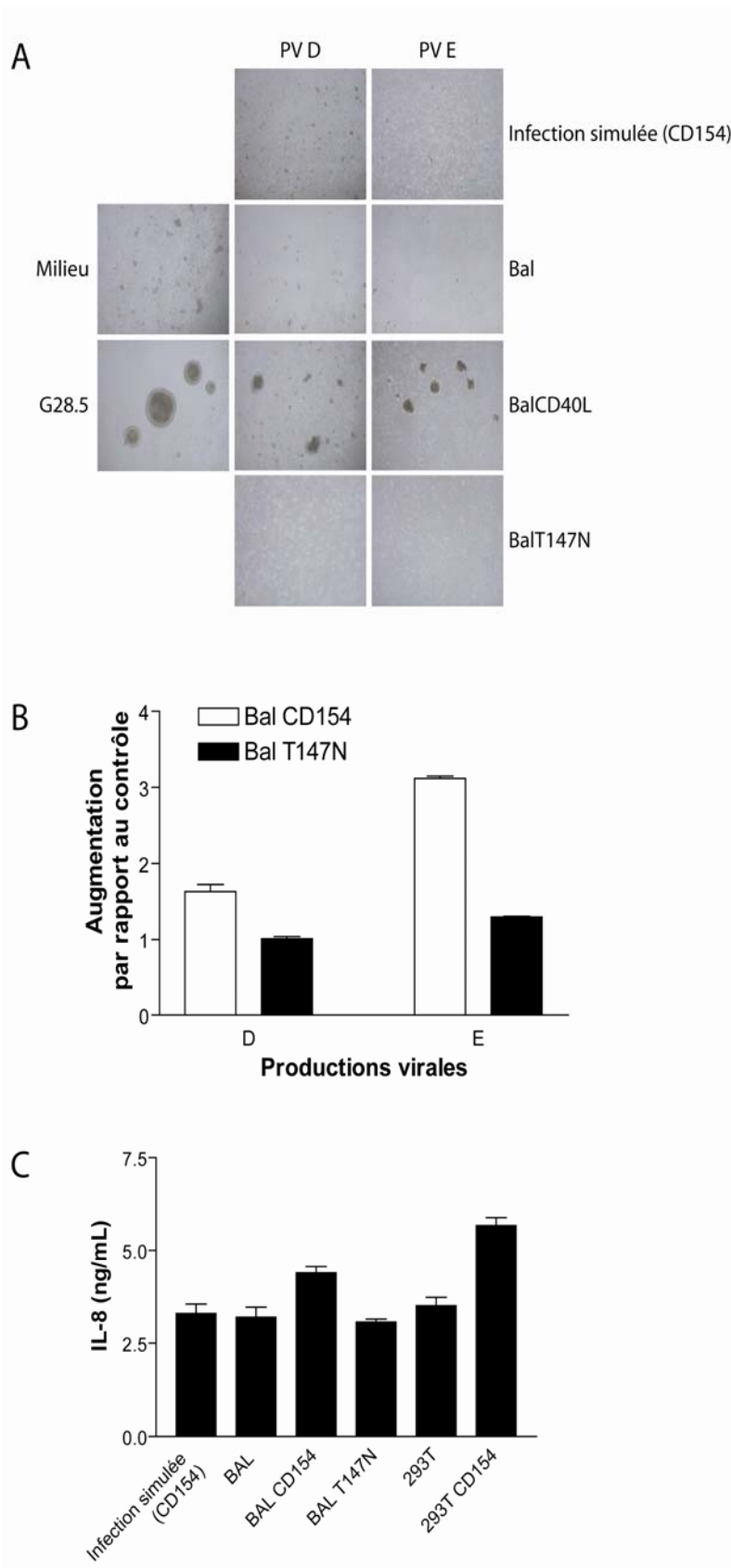
**Figure 20 : Niveau d'incorporation de CD154 de type sauvage en comparaison avec une forme mutée.** Le niveau d'incorporation des deux formes de CD154 sur les virus a été évalué par immunocapture. Les valeurs obtenues avec l'isotype ont été soustraites des valeurs obtenues avec l'anticorps anti-CD154 pour chaque virus. Bal CD154 : virus produits avec la forme sauvage de CD154; Bal T147N : virus produits avec la forme mutée de CD154. Les valeurs correspondent à la moyenne +/- l'erreur-type d'un duplicata.

### 7.7.2. Effets d'un CD154 muté

Avec ces nouvelles productions virales nous avons répété l'expérience d'adhésion homotypique des lymphocytes B pour s'assurer de l'inactivité du mutant. En effet, aucun amas cellulaire n'est apparent lorsque le virus avec le mutant est ajouté contrairement à celui avec la forme sauvage (Figure 21A).

Nous avons également testé ces virus sur la lignée cellulaire rapportrice. Les virus de la production virale D arborant du CD154 de type sauvage induisent 1,63 fois plus de SEAP que les virus sans CD154 tandis que ceux avec la forme mutée ne l'induisent pas (1,01 fois). Pour la production virale E, ces proportions sont respectivement 3,12 et 1,30 (Figure 21B). Le niveau de SEAP dans les surnageants des cellules exposées aux virus ayant incorporé la forme mutée est similaire à celui du niveau de base des cellules.

Puisque ces expériences ont confirmé que le mutant T147N est inactif, nous avons vérifié la capacité des virus produits en sa présence à activer les macrophages à produire la chimiokine IL-8. Nous avons réalisé les expériences comme décrit précédemment. Ces nouvelles productions virales n'induisent pas la chimiokine chez tous les donneurs, ce qui est cohérent avec la variabilité observée en utilisant les autres productions virales. La figure 21C montre en exemple un donneur pour lequel la présence de virus avec du CD154 de type sauvage induit la sécrétion d'IL-8 (4,39 ng/mL) par rapport à l'infection simulée (3,30 ng/mL) ou aux virus sans CD154 (3,20 ng/mL) (Figure 21C). On observe aussi que les virus arborant le CD154 muté n'augmentent pas la production d'IL-8 (3,07 ng/mL). Ceci est vrai pour toutes les expériences réalisées (données non présentées). Ces trois expériences, l'adhésion homotypique, la production de SEAP et la sécrétion d'IL-8, prouvent que le mutant T147N est bel et bien incapable d'induire la signalisation via CD40 et que les effets observés sont dus uniquement à la présence de CD154.



**Figure 21 : Spécificité de CD154 dans l'induction de l'adhésion homotypique des lymphocytes B, la production de SEAP par les cellules CD40-293-SEAP et la sécrétion d'IL-8 par les MDM.** A) Adhésion homotypique des lymphocytes B. Les lymphocytes B ( $3 \times 10^5$ ) ont été mis en présence de virus avec ou sans CD154 ou un volume équivalent de surnageant d'infection simulée pendant 72 h. La formation d'amas cellulaires a été évaluée par observation microscopique. B) Production de SEAP par les cellules CD40-293-SEAP. Les cellules CD40-293-SEAP ( $2 \times 10^4$ ) ont été mises en présence de 16 ng de p24 de virus avec ou sans CD154 pendant 24 h. La sécrétion de SEAP a été évaluée avec la solution Quanti-Blue™ et la densité optique a été mesurée à la longueur d'onde 630. Les valeurs représentent l'augmentation de la densité optique par les virus avec un CD154 de type sauvage ou muté par rapport aux virus sans CD154 et correspondent à la moyenne  $\pm$  l'erreur-type d'un triplicata. C) Sécrétion d'IL-8 par les MDM. Les MDM ( $2 \times 10^5$ ) ont été exposés à 40 ng de p24 ou d'un volume équivalent de surnageant d'infection simulée pendant 24 h. La sécrétion d'IL-8 a été mesurée par ELISA. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  l'erreur-type d'un triplicata. Infection simulée : contrôle de production virale avec le plasmide de CD154; Bal : VIH-1; Bal CD154 : VIH-1 avec du CD154 sauvage; Bal T147N : VIH-1 avec du CD154 muté; G28.5 contrôle positif; 293T : cellules transfectées avec un plasmide sans insert; 293T CD154 : cellules transfectées avec le plasmide de CD154.

## Chapitre 8. Discussion

Plusieurs molécules de l'hôte sont acquises par le VIH-1 lors de son bourgeonnement. Ces molécules sont fonctionnelles et interagissent avec leurs ligands respectifs. Des études ont démontré que ces interactions entre les virus et les cellules influencent la réponse immunitaire et par conséquent la pathogénèse du virus (revue dans [42]). L'incorporation de CD154 a été rapportée récemment et a montré une capacité à activer les lymphocytes B [62]. Dans le cadre de notre étude, nous avons évalué la capacité des virus ayant incorporé du CD154 à activer les macrophages à sécréter de l'IL-8 et des MMP. Nous démontrons que la présence de CD154 à la surface des virions induit la sécrétion de la chimiokine. Par contre, les résultats sont moins concluants quant à l'augmentation de la sécrétion des MMP. Il semble que l'induction des MMP ne soit pas totalement dépendante de CD154.

Nous rapportons également une variabilité dans la capacité à induire l'IL-8 entre une même production virale et différents donneurs. Nos résultats sur l'expression du récepteur CD40 nous portent à croire que la variabilité du niveau d'expression de cette molécule entre les donneurs pourrait être une explication de ces variations. Également, une variabilité dans le niveau d'incorporation de CD154 entre les productions virales produites peut en être un facteur additionnel. Cette variabilité n'est pas causée par une fonctionnalité inadéquate de CD154 puisque nous observons une adhésion homotypique des lymphocytes B et une sécrétion de SEAP. Les effets de CD154 observés sur les lymphocytes B, les cellules CD40-293-SEAP et les macrophages sont spécifiques à la présence de la protéine puisqu'une forme mutée de CD154 ne les induit pas. De plus, nous démontrons que les protéines d'enveloppe virale ne participent pas à l'induction d'IL-8 puisque les virus déficients en gp120 et gp41 n'influencent pas la sécrétion.

## **8.1. La présence de CD154 à la surface des virus augmente la sécrétion d'IL-8 par les macrophages**

L'IL-8 est une chimiokine normalement sécrétée lors d'une réaction inflammatoire par les neutrophiles et les macrophages. Une de ces fonctions est d'attirer les lymphocytes T au site inflammatoire afin d'initier une réponse immunologique de type cellulaire. Dans le contexte d'une infection au VIH-1, la production d'IL-8 peut devenir un couteau à deux tranchants. Bien que davantage de lymphocytes T participent à la réponse antivirale, ils représentent aussi une cible de choix pour le virus. La sécrétion accrue d'IL-8 en présence de CD154 sur les virus peut favoriser l'attraction de cellules cibles et exacerber la réplication virale. En effet, il a été rapporté que l'IL-8 stimule la réplication virale dans les macrophages et les lymphocytes T [134]. Aussi, des études immunoenzymatiques de type ELISA et immunohistochimiques ont démontré que l'IL-8 est présente en plus grande quantité dans le sérum, les poumons et les organes lymphoïdes secondaires de personnes infectées [134, 146, 147].

Les expériences que nous avons réalisées pour tenter d'expliquer la variabilité observée dans la capacité des virus à induire la sécrétion d'IL-8 par les MDM nous ont permis d'identifier deux facteurs critiques qui méritent d'être étudiés plus en profondeur; à savoir le niveau d'incorporation de CD154 par les virus et le niveau d'expression de CD40 par les macrophages. D'une part, les résultats d'incorporation démontrent que la quantité de CD154 associée aux virus varie grandement entre les trois productions virales utilisées. La production virale A démontre une plus grande incorporation de CD154 sur les virus que les productions B et C. Donc, nous pouvons supposer qu'elle contient potentiellement plus de molécules de CD154 par particule virale. D'autre part, le pourcentage de cellules positives pour CD40 sur les macrophages varie aussi grandement entre les donneurs. Si des macrophages avec un niveau de CD40 élevé sont en présence de virus à forte incorporation de CD154, la probabilité que le CD154 rencontre son récepteur est élevée. Si le niveau de l'une ou l'autre de ces molécules est réduit, la probabilité demeure tout de même grande puisqu'une des deux molécules est présente en quantité suffisante. Par contre, lorsque le niveau de ces deux molécules est faible, la probabilité qu'elles se rencontrent est fortement diminuée. Cette possibilité demeure à l'état hypothétique, car la relation entre le niveau

d'expression de CD40 sur les macrophages et la capacité à induire la sécrétion d'IL-8 n'a pas été évaluée dans la présente étude.

Les résultats obtenus avec la lignée cellulaire CD40-293-SEAP montrent qu'il n'y a pas de différences entre les productions virales dans leur capacité à engager une signalisation via le CD40. Ces observations laissent croire que notre hypothèse pourrait se révéler fautive. Or, cette lignée cellulaire a été transfectée avec un plasmide d'expression pour le CD40. Le récepteur est, par conséquent, hautement exprimé à la surface de ces cellules et celles-ci se comparent alors aux macrophages exprimant beaucoup de CD40. Selon notre hypothèse, la probabilité que les molécules de CD154 se lient à celle de CD40 est élevée et ceci pourrait expliquer pourquoi la sécrétion de SEAP est similaire entre les productions virales.

L'expérience d'adhésion homotypique n'a pas démontré non plus de différences significatives par les observations microscopiques entre les différentes productions virales. Une explication plausible pourrait se trouver dans la manière dont le CD40 est présenté à la surface des lymphocytes B et des macrophages. En effet, il a été rapporté que le CD40 sur les lymphocytes B peut se retrouver naturellement sous la forme d'homodimères [79, 80]. La formation d'homodimères de CD40 est requise pour l'expression de CD86 sur les lymphocytes B. De même, la sécrétion d'IL-8 par des cellules HEK293 semble dépendante de cette homodimérisation [80, 148]. La forme monomérique n'active que très faiblement la signalisation via CD40 et ne provoque qu'une adhésion homotypique des cellules [80]. Bien que dans cette étude nous n'avons regardé que la capacité à induire des amas cellulaires, les travaux de Martin *et coll.* démontrent que les virus avec du CD154 induisent aussi une production d'IgG et une sécrétion d'IL-6 [63]. De plus, pour que les molécules adaptatrices TRAF se lient au CD40 et initient une signalisation, il doit y avoir une multimérisation du CD40 à la surface de la cellule [149]. De telles études n'ont pas été réalisées avec des macrophages, mais à partir des résultats obtenus, nous émettons l'hypothèse que l'homodimérisation du CD40 nécessaire pour qu'un signal soit complet est plus difficilement atteignable sur les macrophages que sur les lymphocytes B pour une même stimulation.



## **8.2. L'augmentation de la sécrétion d'IL-8 est spécifiquement due à la présence de CD154**

Afin de s'assurer de la spécificité de CD154 dans nos expériences, nous avons produits des virus qui incorporent une forme mutée et inactive de CD154. Lorsque ces virus ont été utilisés dans nos expériences, ils n'ont en aucun cas induit la chimiokine. La mutation T147N résulte de la substitution de la thréonine par une asparagine et affecte la liaison du CD154 avec son récepteur [145]. L'acide aminé à la position 147 n'est pas exposé à la surface du trimère de CD154 et n'est donc pas directement impliqué dans la liaison avec le CD40. Néanmoins, la mutation à cette position a été rapportée chez des individus souffrant du syndrome de l'hyper IgM associé au chromosome X [145]. De plus, une autre équipe a utilisé la construction contenant cette forme mutée de CD154 et ils ont démontré que les cellules exprimant le mutant n'induisaient pas de chimiokines de type  $\beta$  (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES) par les macrophages alors que les cellules exprimant la forme sauvage les induisaient [123]. Nos résultats sont donc cohérents avec ces observations.

## **8.3. La modulation de la sécrétion de MMP pourrait être due à la présence de CD154 sur les virus.**

Les MMP sont des enzymes protéolytiques dont les substrats sont principalement des composantes de la matrice extracellulaire. De plus en plus d'études indiquent que la pathogénèse du VIH-1 est associée à un déséquilibre entre la production de MMP et leurs inhibiteurs, les TIMP. Ce déséquilibre serait impliqué dans la dissémination virale, la désorganisation structurale de certains organes et l'apparition de maladies connexes (revue dans [142, 150]). L'activité des MMP sur la matrice extracellulaire détruit les barrières physiologiques entre les organes. Par exemple, l'intérieur des vaisseaux sanguins est tapissé d'un endothélium qui restreint le transport des substances sanguines vers l'extérieur. Lorsque ce tissu est endommagé, le virus peut facilement circuler dans les brèches et affecter des organes difficilement accessibles. Au cours de la maladie, certaines personnes infectées développent une démence causée par des dommages à la barrière hémato-encéphalique, une dégradation de la myéline et une mort accrue des neurones (revue dans [151]). Des analyses réalisées à partir de prélèvements chez des patients séropositifs ont révélé une quantité élevée de MMP-2 et MMP-9 dans le LCR et la salive de ces individus

en comparaison avec des donneurs sains [138-140, 152, 153]. Les MMP présentes dans le LCR des patients atteints de démence peuvent dégrader la myéline et produire des molécules neurotoxiques par clivage de certaines protéines. Par exemple, la MMP-2 agit sur la chimiokine SDF-1 $\alpha$  sécrétée par les astrocytes et la substance produite suite à l'activité de la MMP-2 induit la mort des neurones [154].

Les MMP peuvent aussi agir sur la structure des organes. Les organes lymphoïdes secondaires ont une structure particulière permettant les interactions cellulaires requises pour le développement d'une réponse immunologique efficace [155]. Par exemple, dans les nœuds lymphatiques, les lymphocytes B sont regroupés dans des follicules et des centres germinatifs et les lymphocytes T se retrouvent principalement dans une zone adjacente. Avec la progression de la maladie, des études histologiques ont démontré la disparition des centres germinatifs et un vieillissement prématuré du thymus [40, 156]. Ceci pourrait être causé par l'activité des MMP sur la matrice définissant les structures.

Le mécanisme par lequel les MMP sont surproduites lors de l'infection par le VIH-1 est encore méconnu. Il a été suggéré que l'activation chronique du système immunitaire participerait à ce phénomène. La production des MMP est fortement stimulée par la présence de cytokines pro-inflammatoires (revue dans [157] et [158]). Nous avons vérifié si la présence de CD154 sur les virus pouvait induire une hausse de la sécrétion de certaines MMP par les macrophages. Bien que les cellules 293T transfectées avec le plasmide codant pour le CD154 et fixées induisent la production de MMP-1 et MMP-2 par les MDM, il en est autrement avec l'utilisation de virus avec ou sans CD154. En fait, l'augmentation ne semble pas dépendre de CD154. Peut-être que l'induction se produit de manière indirecte par la sécrétion de cytokines. Il a été rapporté que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  augmentent la transcription génique de la MMP-1 et la MMP-2 [159, 160]. De plus, il est connu que ces cytokines sont produites lors de l'infection par le VIH-1. Les protéines virales peuvent aussi activer la production de telles molécules. Par exemple, la protéine Tat est un transactivateur de plusieurs gènes cellulaires dont les gènes des cytokines et chimiokines suivantes : IL-2, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  [161-166]. Il se peut que le virus  $\Delta$ env induise des cytokines qui influencent par la suite la production de MMP et dissimule l'effet de CD154.

Ceci n'est pas observé avec les cellules fixées puisque seul le CD154 induit une signalisation.

#### **8.4. Les protéines d'enveloppe virale ne sont pas impliquées dans le mécanisme d'induction d'IL-8**

Nous démontrons que la présence des protéines de l'enveloppe virale gp120 et gp41 ne sont pas requises pour l'induction de la chimiokine IL-8. L'utilisation d'un virus déficient pour ces deux protéines n'affecte pas l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 causée par la présence de CD154. Il aurait été par contre possible que la liaison entre la gp120 et le CCR5 influence la production d'IL-8. Le CCR5 appartient à la famille des récepteurs couplés à la protéine G, une petite protéine permettant la signalisation intracellulaire. Lorsque la gp120 lie le CCR5, il y a une ouverture des canaux ioniques, une mobilisation du calcium intracellulaire, une phosphorylation des kinases Pyk2, JNK/SAPK et p38, une translocalisation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et une sécrétion de chimiokines et cytokines (MIP-1 $\beta$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) [167-173]. La signalisation engendrée par la gp120 via le CCR5 comporte des éléments pouvant agir dans la cascade signalétique activant la production d'IL-8. NF- $\kappa$ B est un facteur essentiel à la transcription du gène de l'IL-8 [174, 175] et la MAP kinase p38 stabilise l'ARN messager produit [176].

#### **8.5. L'expression de CD154 sur les lymphocytes T est modulée chez les individus infectés par le VIH-1 et pourrait participer au développement du SIDA**

Le CD154 est une molécule de co-stimulation exprimée sur les lymphocytes T CD4 suite à leur activation. Son expression est hautement régulée et transitoire. L'interaction avec son récepteur joue un rôle important dans l'activation des cellules du système immunitaire. Elle induit la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires afin d'amplifier la réponse [70-72]. Puisque le CD154 est présent uniquement suite à l'activation des lymphocytes T CD4 et que la pathogénèse du VIH-1 est caractérisée par une hyperactivation du système immunitaire, de nombreuses études se sont consacrées à évaluer la présence de CD154 sur les lymphocytes T CD4 d'individus séropositifs. De façon générale, l'expression de CD154 est augmentée sur les cellules provenant de patients

infectés en comparaison avec des donneurs sains [177-179]. Des études ont aussi évalué la capacité des cellules à exprimer le CD154 suite à diverses stimulations (SEB, PMA/iono, anti-CD3/anti-CD28). Les analyses révèlent que le pourcentage de cellules positives en CD154 dépend du nombre de cellules T CD4 en circulation chez le donneur. Les sujets avec un taux de cellules T CD4 supérieur à 500 cellules/ $\mu$ L montrent une capacité à exprimer le CD154 comparable à celle des donneurs sains. Or, lorsque le taux de cellules T CD4 diminue, l'expression de CD154 aussi [180-183]. En progressant vers la maladie, les lymphocytes T CD4 deviennent de moins en moins nombreux et de plus en plus affectés par l'infection. Il est fort probable que leur capacité à s'activer et à exprimer du CD154 soit réduite. Subauste *et coll.* ont aussi démontré que l'expression de CD154 sur les lymphocytes T CD4 était diminuée lorsque le récepteur CD40 était présent en culture [181]. De plus, lorsque le taux de cellules T CD4 diminue, le pourcentage de monocytes positifs en CD40 augmente [180]. Ceci pourrait être une autre hypothèse pour expliquer la diminution d'expression de CD154 sur les cellules lorsqu'elles sont moins nombreuses.

Il est connu que la thérapie HAART (de l'anglais *Highly Active Antiretroviral Therapy*) diminue considérablement la charge virale et ramène un compte de lymphocytes T CD4 à un niveau relativement normal. Les médicaments ciblent des protéines virales afin d'empêcher leur activité et, par conséquent, réduire la réplication virale. Il a aussi été rapporté que ce traitement restaure le niveau d'expression de CD154 sur les cellules [177]. Ainsi, l'activation du système immunitaire est moins importante et la réponse immunologique est de meilleure qualité.

L'interaction CD40-CD154 semble importante dans l'apparition des symptômes associés à la phase SIDA. Il existe un modèle murin dans lequel les souris sont infectées par un rétrovirus qui cause un syndrome d'immunodéficience similaire au SIDA. Les souris souffrent, en plus d'une immunodéficience, d'une lymphadénopathie, d'hypergammaglobulinémie et d'infections opportunistes. Green *et coll.* ont traité ces souris infectées avec un anticorps spécifique contre le CD154 et l'apparition des symptômes était grandement diminuée, suggérant que cette interaction joue un rôle dans la progression de la maladie [184].

Par contre, nous ne croyons pas qu'un anticorps spécifique contre le CD154 pourrait servir éventuellement en thérapie. Les résultats obtenus par Green *et coll.* suggèrent que le CD154 joue un rôle dans l'apparition des symptômes de la maladie. Or, l'expression de CD154 sur les lymphocytes T n'est pas constante au cours de l'infection et l'interaction est nécessaire au fonctionnement du système immunitaire. Si des anticorps sont utilisés en primo-infection pour contrer les effets de la surexpression de CD154 qui est plus importante à ce stade, ils risquent aussi de perturber le développement d'une réponse immunologique cruciale pour le contrôle de l'infection. Alors, nous ne croyons pas que ce soit une avenue envisageable.

## Conclusions

Dans le cadre de cette étude, nous avons vérifié si l'incorporation de CD154 par le VIH-1 pouvait induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de MMP par les MDM. Pour ce faire, nous avons produits des virus de type R5 (Bal) qui ont ou n'ont pas de CD154 à leur surface et des virus qui ont incorporé une forme mutée inactive de CD154. Nous montrons que les virus avec du CD154 stimulent la production d'IL-8, mais que notre système expérimental comporte une grande variabilité dans la capacité à sécréter la cytokine entre les différentes productions virales et les donneurs. Nous avons évalué le niveau d'incorporation de CD154, la fonctionnalité de la protéine à la surface des virus et le niveau d'expression de CD40 sur les MDM afin d'identifier la source de cette variation. Les résultats suggèrent que le niveau de CD154 sur les virus et de CD40 sur les MDM en serait la cause. Nous avons répété ces expériences avec des virus ayant incorporé un mutant de CD154 à un niveau similaire à celui du type sauvage et nous montrons que les effets observés sont spécifiques à la présence de CD154. De plus, les protéines d'enveloppe virale ne sont pas requises pour induire la sécrétion d'IL-8 puisque des virus qui en sont exempts et qui arborent du CD154 à leur surface produisent des résultats comparables. La sécrétion de MMP par les macrophages est influencée par la présence de CD154 sur les cellules 293T. Toutefois, l'effet spécifique de CD154 est perdu lorsque des virus sont utilisés, car les virus sans la molécule modulent aussi à la hausse leur sécrétion.

En somme, des études avec un modèle murin et des cellules provenant d'individus infectés ont démontré que l'interaction entre CD40 et CD154 favorise l'apparition des symptômes, la progression de la maladie et l'hyperactivation du système immunitaire. Nous avons montré que les virus arborant du CD154 induisent la sécrétion d'IL-8 par les MDM. Cette chimiokine pro-inflammatoire est importante pour le recrutement des lymphocytes T, les cellules cibles du virus, au site inflammatoire et elle stimule la réplication virale dans les macrophages et les lymphocytes T. En plus, elle a été détectée en plus grande quantité dans le sérum et les organes lymphoïdes d'individus séropositifs en comparaison avec des individus sains. Les observations *in vivo* chez la souris supportent nos observations *in vitro* et, par conséquent, nous croyons que l'incorporation de CD154 par le VIH-1 pourrait avoir un rôle non négligeable dans la façon dont la maladie progresse.

## Perspectives

Nous envisageons plusieurs perspectives à ce projet. Tout d'abord, à court terme, il serait important de confirmer notre hypothèse concernant la variabilité entre les productions virales et les différents donneurs. Ceci est facilement réalisable en déterminant le niveau d'expression de CD40 sur les macrophages et en quantifiant la sécrétion d'IL-8 pour un même donneur. Aussi, il faudrait répéter l'expérience nous permettant de mesurer les MMP produites par les macrophages en présence de CD154 afin de déterminer si l'augmentation observée est spécifique à la présence de CD154. Nous pourrions utiliser un ensemble de détection par ELISA pour les MMP-1 et -2, puisque ce sont celles qui semblent modulées dans notre système expérimental.

À plus long terme, étant donné que les MMP dégradent la matrice extracellulaire, il serait intéressant d'explorer les conséquences que pourrait avoir une infection par le VIH-1 sur la structure d'une amygdale. Dans le laboratoire, nous avons l'expertise pour cultiver des explants d'amygdale *in vitro*. Par des coupes histologiques, nous pourrions détecter les changements dans l'organisation de l'organe. Par la technique ELISA ou Luminex™, nous pourrions détecter la présence de cytokines ou de MMP qui participeraient à ce phénomène.

Puisqu'il y a une augmentation de CD154 sur les lymphocytes T CD4 plus importante en début d'infection par le VIH-1 chez les individus, il serait intéressant d'évaluer si les virus présents dans le sérum de patients en primo-infection contiennent du CD154 à leur surface. Il serait important que ces patients ne soient pas sous thérapie puisque le traitement HAART restaure l'expression de CD154. Advenant de telles observations, elles prouveraient hors de tout doute que le CD154 est incorporé par les virus *in vivo* et apporteraient un élément supplémentaire de taille pour soutenir nos résultats. Cette expérience peut être réalisée par une immunocapture plus sensible que celle utilisée dans le cadre de cette étude. Aussi, nous aimerions produire des virus provenant de lymphocytes T CD4 primaires et qui incorporent du CD154. Cette expérience est plus difficile à réaliser puisqu'elle nécessite une bonne synchronisation entre l'expression de la protéine et la réplication virale. L'utilisation de virus arborant du CD154 et provenant de cellules

primaires nous permettrait de réaliser des expériences s'approchant davantage à un système physiologique.



## Bibliographie

1. *Le point sur l'épidémie de SIDA*. Décembre 2007, ONUSIDA.
2. *Actualités en épidémiologie sur le VIH/ sida*. Novembre 2007, Division de la surveillance et de l'évaluation des risques, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Agence de la santé publique du Canada.
3. Bitera, R., et al., *Programme de surveillance de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au Québec. Cas déclarés de janvier à juin 2006 et cumulatifs avril 2002-juin 2006*. 2007, Institut national de santé publique du Québec.
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., 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.
6. Kuiken, C., et al., *HIV Sequence Compendium 2008*, B.K. Editors, Editor. 2008, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics: Los Alamos, NM.
7. Khabbaz, R.F., et al., *Simian immunodeficiency virus needlestick accident in a laboratory worker*. *Lancet*, 1992. **340**(8814): p. 271-3.
8. Khabbaz, R.F., et al., *Brief report: infection of a laboratory worker with simian immunodeficiency virus*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(3): p. 172-7.
9. Pela, A.O. and J.J. Platt, *AIDS in Africa: emerging trends*. *Soc Sci Med*, 1989. **28**(1): p. 1-8.
10. Marx, P.A., P.G. Alcibes, and E. Drucker, *Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001. **356**(1410): p. 911-20.
11. Hooper, E., *Experimental oral polio vaccines and acquired immune deficiency syndrome*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001. **356**(1410): p. 803-14.
12. Worobey, M., et al., *Origin of AIDS: contaminated polio vaccine theory refuted*. *Nature*, 2004. **428**(6985): p. 820.
13. CDC, *Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men*. 1981, *Morbidity & Mortality Weekly Report: New York City and California*. p. 305-308.
14. CDC, *Epidemiologic notes and reports: possible transfusion associated acquired immune deficiency syndrome, AIDS*. 1982, *Morbidity & Mortality Weekly Report: California*. p. 652-654.
15. 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.
16. Weiss, R.A., *The discovery of endogenous retroviruses*. *Retrovirology*, 2006. **3**: p. 67.
17. Gonda, M.A., *Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **724**: p. 22-42.

18. Peterlin, B.M. and D. Trono, *Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 97-107.
19. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 1-25.
20. Ouellet, M., et al., *Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4120-6.
21. Fortin, J.F., R. Cantin, and M.J. Tremblay, *T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2105-12.
22. Marechal, V., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 11166-77.
23. Furuta, R.A., et al., *Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(4): p. 276-9.
24. Fadel, H. and Z. Temesgen, *Maraviroc*. Drugs Today (Barc), 2007. **43**(11): p. 749-58.
25. Stone, N.D., et al., *Multiple-dose escalation study of the safety, pharmacokinetics, and biologic activity of oral AMD070, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in human subjects*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(7): p. 2351-8.
26. Gulick, R.M., et al., *Phase 2 study of the safety and efficacy of vicriviroc, a CCR5 inhibitor, in HIV-1-Infected, treatment-experienced patients: AIDS clinical trials group 5211*. J Infect Dis, 2007. **196**(2): p. 304-12.
27. Furman, P.A., et al., *Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(21): p. 8333-7.
28. St Clair, M.H., et al., *3'-Azido-3'-deoxythymidine triphosphate as an inhibitor and substrate of purified human immunodeficiency virus reverse transcriptase*. Antimicrob Agents Chemother, 1987. **31**(12): p. 1972-7.
29. Merluzzi, V.J., et al., *Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor*. Science, 1990. **250**(4986): p. 1411-3.
30. Wu, J.C., et al., *A novel dipyridodiazepinone inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase acts through a nonsubstrate binding site*. Biochemistry, 1991. **30**(8): p. 2022-6.
31. Debyser, Z., et al., *An antiviral target on reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 revealed by tetrahydroimidazo-[4,5,1-jk][1,4]benzodiazepin-2 (1H)-one and -thione derivatives*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1451-5.
32. Pereira, L.A., et al., *A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(3): p. 663-8.
33. Rohr, O., et al., *Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(5): p. 736-49.
34. Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh, *Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages*. J Cell Biol, 2003. **162**(3): p. 443-55.
35. Sharova, N., et al., *Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans*. Embo J, 2005. **24**(13): p. 2481-9.
36. Jolly, C. and Q.J. Sattentau, *Retroviral spread by induction of virological synapses*. Traffic, 2004. **5**(9): p. 643-50.

37. Roberts, N.A., et al., *Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors*. Science, 1990. **248**(4953): p. 358-61.
38. Pantaleo, G. and A.S. Fauci, *Immunopathogenesis of HIV infection*. Annu Rev Microbiol, 1996. **50**: p. 825-54.
39. 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.
40. Pantaleo, G., et al., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature, 1993. **362**(6418): p. 355-8.
41. 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.
42. 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.
43. Kao, S., et al., *The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11398-407.
44. Mariani, R., et al., *Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif*. Cell, 2003. **114**(1): p. 21-31.
45. Sheehy, A.M., et al., *Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein*. Nature, 2002. **418**(6898): p. 646-50.
46. Franke, E.K., H.E. Yuan, and J. Luban, *Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 359-62.
47. Thali, M., et al., *Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 363-5.
48. 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.
49. 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.
50. BonHomme, M., et al., *The pH dependence of HIV-1 capsid assembly and its interaction with cyclophilin A*. Biophys Chem, 2003. **105**(1): p. 67-77.
51. Luban, J., *Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1157-9.
52. Wieggers, K., et al., *Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid*. Virology, 1999. **257**(1): p. 261-74.
53. Saphire, A.C., M.D. Bobardt, and P.A. Gallay, *Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans*. Embo J, 1999. **18**(23): p. 6771-85.
54. Sherry, B., et al., *Role of cyclophilin A in the uptake of HIV-1 by macrophages and T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1758-63.
55. Marin, M., et al., *HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1398-403.
56. Mehle, A., et al., *Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7792-8.

57. Dang, Y., L.M. Siew, and Y.H. Zheng, *APOBEC3G is degraded by the proteasomal pathway in a Vif-dependent manner without being polyubiquitylated*. J Biol Chem, 2008. **sous presse**.
58. Castilletti, C., et al., *HIV type 1 grown on interferon gamma-treated U937 cells shows selective increase in virion-associated intercellular adhesion molecule 1 and HLA-DR and enhanced infectivity for CD4-negative cells*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**(5): p. 547-53.
59. Rizzuto, C.D. and J.G. Sodroski, *Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4847-51.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Lafferty, K.J. and A.J. Cunningham, *A new analysis of allogeneic interactions*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1975. **53**(1): p. 27-42.
65. Weaver, T.A., A.H. Charafeddine, and A.D. Kirk, *Costimulation blockade: towards clinical application*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2120-39.
66. Roy, M., et al., *Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 596-603.
67. Schneider, L.C., *X-linked hyper IgM syndrome*. Clin Rev Allergy Immunol, 2000. **19**(2): p. 205-15.
68. Mayer, L., et al., *Evidence for a defect in "switch" T cells in patients with immunodeficiency and hyperimmunoglobulinemia M*. N Engl J Med, 1986. **314**(7): p. 409-13.
69. Thusberg, J. and M. Vihinen, *The structural basis of hyper IgM deficiency - CD40L mutations*. Protein Eng Des Sel, 2007. **20**(3): p. 133-41.
70. Clark, L.B., T.M. Foy, and R.J. Noelle, *CD40 and its ligand*. Adv Immunol, 1996. **63**: p. 43-78.
71. Van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 1-77.
72. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(1): p. 4-43.
73. Bajorath, J., et al., *Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis*. Biochemistry, 1995. **34**(31): p. 9884-92.

74. Malmborg Hager, A.C., et al., *Affinity and epitope profiling of mouse anti-CD40 monoclonal antibodies*. Scand J Immunol, 2003. **57**(6): p. 517-24.
75. Noelle, R.J., et al., *A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6550-4.
76. Foy, T.M., et al., *In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1567-75.
77. Paulie, S., et al., *A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes*. Cancer Immunol Immunother, 1985. **20**(1): p. 23-8.
78. Clark, E.A. and J.A. Ledbetter, *Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4494-8.
79. Braesch-Andersen, S., et al., *Biochemical characteristics and partial amino acid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CDw40*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 562-7.
80. Reyes-Moreno, C., et al., *CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7799-806.
81. Armitage, R.J., et al., *Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40*. Nature, 1992. **357**(6373): p. 80-2.
82. Lederman, S., et al., *Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help)*. J Exp Med, 1992. **175**(4): p. 1091-101.
83. Graf, D., et al., *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells*. Eur J Immunol, 1992. **22**(12): p. 3191-4.
84. Hollenbaugh, D., et al., *The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity*. Embo J, 1992. **11**(12): p. 4313-21.
85. Becker, T., F.U. Hartl, and F. Wieland, *CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes*. J Cell Biol, 2002. **158**(7): p. 1277-85.
86. Brodeur, S.R., et al., *C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 837-48.
87. Matthies, K.M., et al., *Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells*. Cell Immunol, 2006. **241**(1): p. 47-58.
88. Graf, D., et al., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. Eur J Immunol, 1995. **25**(6): p. 1749-54.
89. Andre, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 247-52.
90. Leveille, C., et al., *CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5143-51.
91. Pullen, S.S., et al., *CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14246-54.

92. Mukundan, L., et al., *TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 1081-90.
93. Subauste, C.S., R.M. Andrade, and M. Wessendarp, *CD40-TRAF6 and autophagy-dependent anti-microbial activity in macrophages*. Autophagy, 2007. **3**(3): p. 245-8.
94. Suttles, J., et al., *CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5835-42.
95. Revy, P., et al., *Activation of the Janus kinase 3-STAT5a pathway after CD40 triggering of human monocytes but not of resting B cells*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 787-93.
96. Zhang, P., et al., *Innate immunity and pulmonary host defense*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 39-51.
97. Marks, S.C., Jr., *The origin of osteoclasts: evidence, clinical implications and investigative challenges of an extra-skeletal source*. J Oral Pathol, 1983. **12**(4): p. 226-56.
98. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
99. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 901-44.
100. Berken, A. and B. Benacerraf, *Properties of antibodies cytophilic for macrophages*. J Exp Med, 1966. **123**(1): p. 119-44.
101. Lay, W.H. and V. Nussenzweig, *Receptors for complement of leukocytes*. J Exp Med, 1968. **128**(5): p. 991-1009.
102. Guzik, T.J., R. Korbut, and T. Adamek-Guzik, *Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation*. J Physiol Pharmacol, 2003. **54**(4): p. 469-87.
103. Ross, J.A. and M.J. Auger, *Introduction to the role of mononuclear phagocytes in health and disease*, in *The macrophage*, B. Burke and C.E. Lewis, Editors. 2002, Oxford University Press: New York. p. 49-56.
104. van't Wout, A.B., et al., *Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission*. J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 2060-7.
105. Lassmann, H., et al., *Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation*. Glia, 1993. **7**(1): p. 19-24.
106. Orenstein, J.M., C. Fox, and S.M. Wahl, *Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections*. Science, 1997. **276**(5320): p. 1857-61.
107. Ghorpade, A., et al., *Human immunodeficiency virus neurotropism: an analysis of viral replication and cytopathicity for divergent strains in monocytes and microglia*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3340-50.
108. Crowe, S., T. Zhu, and W.A. Muller, *The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(5): p. 635-41.
109. Bagnarelli, P., et al., *Dynamics and modulation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in vitro and in vivo*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7603-13.
110. Collman, R.G., et al., *Chemokine signaling and HIV-1 fusion mediated by macrophage CXCR4: implications for target cell tropism*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(3): p. 318-23.

111. Schmidtayerova, H., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 T-lymphotropic strains enter macrophages via a CD4- and CXCR4-mediated pathway: replication is restricted at a postentry level.* J Virol, 1998. **72**(6): p. 4633-42.
112. Simard, S., et al., *LPS reduces HIV-1 replication in primary human macrophages partly through an endogenous production of type I interferons.* Clin Immunol, 2008. **127**(2): p. 198-205.
113. Franchin, G., et al., *Lipopolysaccharide inhibits HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages through direct and sustained down-regulation of CC chemokine receptor 5.* J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2592-601.
114. Equils, O., et al., *Repeated lipopolysaccharide (LPS) exposure inhibits HIV replication in primary human macrophages.* Microbes Infect, 2006. **8**(9-10): p. 2469-76.
115. Griffin, G.E., et al., *Induction of NF-kappa B during monocyte differentiation is associated with activation of HIV-gene expression.* Res Virol, 1991. **142**(2-3): p. 233-8.
116. Kornbluth, R.S., et al., *Interferons and bacterial lipopolysaccharide protect macrophages from productive infection by human immunodeficiency virus in vitro.* J Exp Med, 1989. **169**(3): p. 1137-51.
117. Kedzierska, K. and S.M. Crowe, *The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection.* Curr Med Chem, 2002. **9**(21): p. 1893-903.
118. Cotter, R.L., et al., *Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infection, beta-chemokine production, and CCR5 expression in CD40L-stimulated macrophages: immune control of viral entry.* J Virol, 2001. **75**(9): p. 4308-20.
119. Bergamini, A., et al., *Increased CD4 and CCR5 expression and human immunodeficiency virus type 1 entry in CD40 ligand-stimulated macrophages.* J Infect Dis, 2002. **185**(11): p. 1567-77.
120. Kiener, P.A., et al., *Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes.* J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4917-25.
121. Bolacchi, F., et al., *Effect of different activation stimuli on the cytokine response of human macrophages to CD40L.* Cytokine, 2001. **16**(4): p. 121-5.
122. Bergamini, A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 infection modulates the interleukin (IL)-1beta and IL-6 responses of human macrophages to CD40 ligand stimulation.* J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 776-84.
123. Kornbluth, R.S., K. Kee, and D.D. Richman, *CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive beta-chemokines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5205-10.
124. di Marzio, P., et al., *Soluble CD40 ligand induces beta-chemokine production by macrophages and resistance to HIV-1 entry.* Cytokine, 2000. **12**(10): p. 1489-95.
125. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
126. Gearing, A.J., et al., *Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases.* Nature, 1994. **370**(6490): p. 555-7.
127. Schonbeck, U., F. Mach, and P. Libby, *Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing.* J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3340-6.

128. McCawley, L.J. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!* *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(5): p. 534-40.
129. Chang, C. and Z. Werb, *The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis.* *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(11): p. S37-43.
130. Chase, A.J., et al., *Role of nuclear factor-kappa B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(5): p. 765-71.
131. Mach, F., et al., *Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor.* *Circulation*, 1997. **96**(2): p. 396-9.
132. Malik, N., et al., *Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases.* *J Immunol*, 1996. **156**(10): p. 3952-60.
133. Wu, L., et al., *Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **269**(3): p. 808-15.
134. Lane, B.R., et al., *Interleukin-8 stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication and is a potential new target for antiretroviral therapy.* *J Virol*, 2001. **75**(17): p. 8195-202.
135. Emilie, D., et al., *Production of interleukins in human immunodeficiency virus-1-replicating lymph nodes.* *J Clin Invest*, 1990. **86**(1): p. 148-59.
136. Molina, J.M., et al., *Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus.* *J Clin Invest*, 1989. **84**(3): p. 733-7.
137. Roux-Lombard, P., et al., *Purified blood monocytes from HIV 1-infected patients produce high levels of TNF alpha and IL-1.* *Clin Immunol Immunopathol*, 1989. **50**(3): p. 374-84.
138. Mellanen, L., et al., *72-kDa and 92-kDa gelatinases in saliva of patients with human immunodeficiency virus infection.* *Acta Odontol Scand*, 1998. **56**(3): p. 135-42.
139. Conant, K., et al., *Cerebrospinal fluid levels of MMP-2, 7, and 9 are elevated in association with human immunodeficiency virus dementia.* *Ann Neurol*, 1999. **46**(3): p. 391-8.
140. Johnston, J.B., et al., *Lentivirus infection in the brain induces matrix metalloproteinase expression: role of envelope diversity.* *J Virol*, 2000. **74**(16): p. 7211-20.
141. Decrion, A.Z., et al., *HIV and inflammation.* *Curr HIV Res*, 2005. **3**(3): p. 243-59.
142. Webster, N.L. and S.M. Crowe, *Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases.* *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(5): p. 1052-66.
143. Barrett, T.B., G. Shu, and E.A. Clark, *CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells.* *J Immunol*, 1991. **146**(6): p. 1722-9.
144. Gordon, J., et al., *Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling.* *J Immunol*, 1988. **140**(5): p. 1425-30.
145. Bajorath, J., et al., *Classification of mutations in the human CD40 ligand, gp39, that are associated with X-linked hyper IgM syndrome.* *Protein Sci*, 1996. **5**(3): p. 531-4.



146. Denis, M. and E. Ghadirian, *Dysregulation of interleukin 8, interleukin 10, and interleukin 12 release by alveolar macrophages from HIV type 1-infected subjects*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. **10**(12): p. 1619-27.
147. Matsumoto, T., et al., *Elevated serum levels of IL-8 in patients with HIV infection*. Clin Exp Immunol, 1993. **93**(2): p. 149-51.
148. Girouard, J., et al., *Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 773-80.
149. Pullen, S.S., et al., *High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization*. Biochemistry, 1999. **38**(31): p. 10168-77.
150. Weeks, B.S., *The role of HIV-1 activated leukocyte adhesion mechanisms and matrix metalloproteinase secretion in AIDS pathogenesis (Review)*. Int J Mol Med, 1998. **1**(2): p. 361-6.
151. Rumbaugh, J.A. and A. Nath, *Developments in HIV neuropathogenesis*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(9): p. 1023-44.
152. Sporer, B., et al., *Presence of matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected patients*. J Infect Dis, 1998. **178**(3): p. 854-7.
153. Liuzzi, G.M., et al., *Increased activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological diseases*. J Neurovirol, 2000. **6**(2): p. 156-63.
154. Zhang, K., et al., *HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration*. Nat Neurosci, 2003. **6**(10): p. 1064-71.
155. Janeway, C.A., et al., *The component of the immune system*, in *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 2001. p. 2-11.
156. Davis, A.E., Jr., *The histopathological changes in the thymus gland in the acquired immune deficiency syndrome*. Ann N Y Acad Sci, 1984. **437**: p. 493-502.
157. Nagase, H., *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases*. Biol Chem, 1997. **378**(3-4): p. 151-60.
158. Mauviel, A., *Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression*. J Cell Biochem, 1993. **53**(4): p. 288-95.
159. Brenner, D.A., et al., *Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha*. Nature, 1989. **337**(6208): p. 661-3.
160. Unemori, E.N., M.S. Hibbs, and E.P. Amento, *Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines*. J Clin Invest, 1991. **88**(5): p. 1656-62.
161. Westendorp, M.O., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4177-85.
162. Vacca, A., et al., *Human immunodeficiency virus type-1 tat enhances interleukin-2 promoter activity through synergism with phorbol ester and calcium-mediated activation of the NF-AT cis-regulatory motif*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(1): p. 467-74.
163. Ott, M., et al., *Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway*. Science, 1997. **275**(5305): p. 1481-5.

164. Ambrosino, C., et al., *HIV-1 Tat induces the expression of the interleukin-6 (IL6) gene by binding to the IL6 leader RNA and by interacting with CAAT enhancer-binding protein beta (NF-IL6) transcription factors*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 14883-92.
165. Mahieux, R., et al., *Cell cycle regulation of human interleukin-8 gene expression by the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein*. J Virol, 2001. **75**(4): p. 1736-43.
166. Sawaya, B.E., et al., *Regulation of TNFalpha and TGFbeta-1 gene transcription by HIV-1 Tat in CNS cells*. J Neuroimmunol, 1998. **87**(1-2): p. 33-42.
167. Liu, Q.H., et al., *HIV-1 gp120 and chemokines activate ion channels in primary macrophages through CCR5 and CXCR4 stimulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4832-7.
168. Del Corno, M., et al., *HIV-1 gp120 and chemokine activation of Pyk2 and mitogen-activated protein kinases in primary macrophages mediated by calcium-dependent, pertussis toxin-insensitive chemokine receptor signaling*. Blood, 2001. **98**(10): p. 2909-16.
169. Lee, C., et al., *Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(5): p. 676-82.
170. Clouse, K.A., et al., *The HIV-1 gp120 envelope protein has the intrinsic capacity to stimulate monokine secretion*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 2892-901.
171. Francois, F. and M.E. Klotman, *Phosphatidylinositol 3-kinase regulates human immunodeficiency virus type 1 replication following viral entry in primary CD4+ T lymphocytes and macrophages*. J Virol, 2003. **77**(4): p. 2539-49.
172. Fantuzzi, L., et al., *HIV-1 gp120 stimulates the production of beta-chemokines in human peripheral blood monocytes through a CD4-independent mechanism*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5381-7.
173. Fantuzzi, L., et al., *Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activation is required for CCR5-dependent, NF-kB-driven CCL2 secretion elicited in response to HIV-1 gp120 in human primary macrophages*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3355-63.
174. Harant, H., et al., *Synergistic activation of interleukin-8 gene transcription by all-trans-retinoic acid and tumor necrosis factor-alpha involves the transcription factor NF-kappaB*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26954-61.
175. Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima, *Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines*. J Biol Chem, 1990. **265**(34): p. 21128-33.
176. Holtmann, H., et al., *Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6742-53.
177. Sousa, A.E., et al., *Early reduction of the over-expression of CD40L, OX40 and Fas on T cells in HIV-1 infection during triple anti-retroviral therapy: possible implications for lymphocyte traffic and functional recovery*. Clin Exp Immunol, 1999. **116**(2): p. 307-15.
178. Muller, F., et al., *Possible role of interleukin-10 (IL-10) and CD40 ligand expression in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in human*

- immunodeficiency virus infection: modulation of IL-10 and Ig production after intravenous Ig infusion.* Blood, 1998. **92**(10): p. 3721-9.
179. Zhang, R., et al., *CD40 ligand dysregulation in HIV infection: HIV glycoprotein 120 inhibits signaling cascades upstream of CD40 ligand transcription.* J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2678-86.
180. Vanham, G., et al., *Decreased CD40 ligand induction in CD4 T cells and dysregulated IL-12 production during HIV infection.* Clin Exp Immunol, 1999. **117**(2): p. 335-42.
181. Subauste, C.S., A. Subauste, and M. Wessendarp, *Role of CD40-dependent down-regulation of CD154 in impaired induction of CD154 in CD4(+) T cells from HIV-1-infected patients.* J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1645-53.
182. Brugnoli, D., et al., *The ability of CD4+ cells from HIV+ individuals to express CD40 ligand after in vitro stimulation is not impaired.* Clin Immunol Immunopathol, 1995. **74**(1): p. 112-4.
183. O'Gorman, M.R., et al., *Abnormal CD40 ligand (CD154) expression in human immunodeficiency virus-infected children.* Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(6): p. 1104-9.
184. Green, K.A., R.J. Noelle, and W.R. Green, *Evidence for a continued requirement for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in the progression of LP-BM5 retrovirus-induced murine AIDS.* Virology, 1998. **241**(2): p. 260-8.