

AUDREY PLANTE

**LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES
INDUITE PAR LES PAMP MODIFIE LEUR
HABILETÉ À TRANSFÉRER LE VIH-1 AUX
LYMPHOCYTES T CD4+ QUIESCENTS**

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 MICROBIOLOGIE-INFECTIOLOGIE ET D'IMMUNOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

Résumé

Les récepteurs de l'immunité innée jouent un rôle important lors de la réponse immunitaire innée, car ils sont la première barrière de reconnaissance d'un pathogène. Les cellules dendritiques ont la capacité de lier des motifs microbiens, un phénomène qui entraîne une cascade de signalisation menant à leur activation et à leur migration jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Elles activent alors les lymphocytes T CD4+ quiescents. Lors de l'infection par le VIH-1, une forte concentration de produits microbiens se retrouve dans le sang et les tissus périphériques, un phénomène dû à la translocation microbienne et à la présence de co-infections. L'objectif de ce projet de maîtrise a donc été d'étudier la susceptibilité des cellules dendritiques (DC) au VIH-1 suivant la stimulation de différents récepteurs et d'étudier leur capacité à transférer le virus aux lymphocytes T CD4+ quiescents. Les résultats indiquent qu'une stimulation du TLR2 par le Pam3CSK4 et le zymosan augmente le transfert tardif du VIH-1 de tropisme X4. Les résultats démontrent également qu'une stimulation du TLR3 diminue le transfert viral pour les deux tropismes de VIH-1. Le transfert précoce du virus R5 est également augmenté à la suite de l'activation du TLR2.

Abstract

The innate immunity receptors play an important role in the innate immune response because they are the first to recognize pathogen-associated-molecular patterns (PAMPs). They are presented on antigen-presenting cells and PAMPs-binding receptors on these cells promote maturation and migration to lymph nodes. During HIV-1 infection, a high level of microbial products is found in the blood and the peripheral tissues due to the microbial translocation and to the presence of co-infections. The primary objective of this project was to study the susceptibility of dendritic cells (DCs) to HIV-1 infection following their stimulation by different agonists and to study the capacity of these PAMPs-treated DCs to transfer HIV to resting lymphocytes T CD4 +. The results indicate that TLR2 stimulation increases the late transfer of X4 viruses. We also demonstrate that following a stimulation of the TLR3, the viral transfer is strongly decreased for both tropisms of virus. The early transfer of R5 viruses is also increased when TLR2 is triggered.

Avant-propos

Le contenu présenté à l'intérieur de ce mémoire met en lumière l'influence des produits microbiens lors d'une infection par le virus du VIH-1. Ce projet a été fait en collaboration et sous la supervision de Mélanie R. Tardif, Ph.D. Nous prévoyons soumettre prochainement un article présentant les résultats obtenus lors de cette étude.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Michel J. Tremblay, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet de maîtrise très intéressant. Cette expérience fût extrêmement enrichissante car elle m'a permis de parfaire mes connaissances sur le VIH-1 au sein d'une équipe passionnée.

Je tiens également à remercier mon chef de projet, Dre Mélanie R. Tardif. Elle a su me transmettre sa passion et son savoir en immunologie, et plus particulièrement sur les bien-aimés TLR et cellules T auxiliaires. Elle fut un excellent guide pour moi. Je ne la remercierai jamais assez pour son soutien, sa patience et sa compréhension. Les nombreuses discussions que nous avons eues concernant mon projet de maîtrise m'ont toujours permis d'amener ma réflexion plus loin et de considérer de nouveaux éléments.

Je voudrais de plus remercier toute mon équipe qui a répondu à mes nombreuses questions lors de ces deux années et plus particulièrement Katia Giguère. Elle a su m'apporter un soutien moral et une écoute qui m'ont permis de traverser des moments plus difficiles. Merci également à Sylvie Méthot pour avoir effectué la révision de ce mémoire.

Finalement, je voudrais remercier mon conjoint François pour son soutien à toute épreuve. Je le remercie de toujours avoir cru en moi et en mes capacités. Je voudrais également remercier ma famille qui m'a toujours encouragée lors de mes études, et ce, depuis longtemps.

*À mon amour! Merci
pour ton soutien, tes conseils,
tes encouragements et ton
amour inconditionnel.*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-propos	iii
Remerciements.....	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	1
Chapitre 1 : Le virus de l'immunodéficience humaine.....	3
1.1 L'épidémie du SIDA.....	3
1.1.1 Historique et origine du VIH-1	3
1.1.2 Épidémiologie.....	4
1.2 Le VIH-1.....	6
1.2.1 Les différents types, groupes et sous-groupes de VIH	6
1.2.2 La structure du VIH-1	7
1.2.3 L'organisation génomique du VIH-1.....	8
1.2.4 Le tropisme du VIH-1	10
1.3 Les cellules permissives à l'infection	12
1.3.1 Les lymphocytes T CD4+	12
1.3.2 Les cellules dendritiques.....	14
1.4 Le cycle réplcatif	15
1.4.1 Le transfert du VIH-1	16
1.4.2 L'attachement et l'entrée	20
1.4.3 La décapsulation, la rétro-transcription et le transport de l'ADN viral au noyau 20	
1.4.4 L'intégration et l'expression génique	21
1.4.5 L'assemblage, le bourgeonnement et la maturation	23
1.5 La pathogénèse virale	24
1.5.1 La transmission	24
1.5.2 La primo-infection	26
1.5.3 La phase chronique	26
1.5.4 Le stade SIDA.....	27
1.6 La défense de l'hôte face à l'infection virale.....	27
1.6.1 La réponse innée et les facteurs de restriction cellulaire	27
1.6.2 La réponse acquise.....	28
1.7 Les traitements.....	30
1.7.1 Les antirétroviraux et les effets secondaires	30
1.8 Conclusion	31
Chapitre 2. Les récepteurs de l'immunité innée	32
2.1 Les récepteurs de type Toll.....	32
2.1.1 Structure.....	32
2.1.2 Expression et ligands des TLR	33
2.1.3 La signalisation issue de l'engagement des TLR.....	34
2.2 Les récepteurs de type NOD.....	36

2.2.1	Structure.....	36
2.2.2	Expression et ligands de NOD1 et NOD2	37
2.2.3	La signalisation engendrée par l'engagement des récepteurs de type NOD.....	37
2.3	Le récepteur Dectine-1.....	38
2.3.1	Structure.....	38
2.3.2	Expression et ligand de dectine-1	39
2.3.3	La signalisation engendrée par l'engagement de la dectine-1	39
2.4	Collaboration entre les récepteurs de l'immunité innée	40
2.6	Les PAMP et le VIH-1.....	41
2.6.1	Co-infections microbiennes	41
2.6.2	La translocation microbienne.....	43
2.7	La maturation des cellules dendritiques et le transfert viral aux lymphocytes T CD4+ quiescents.....	44
2.7.1	Maturation de la cellule dendritique	44
2.7.2	Transfert du VIH-1 aux LyT CD4+	45
2.5	Conclusion	47
Chapitre 3. Hypothèses et objectifs de recherche		48
Chapitre 4. Matériels et méthodes		50
4.1	Culture cellulaire.....	50
4.1.1	Culture des lignées cellulaires 293T et TZM-bl	50
4.1.2	Isolement, différenciation et culture des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4+ quiescents.....	50
4.2	Production virale.....	51
4.2.1	Transfection au phosphate de calcium	51
4.2.2	Dosage de la production virale	51
4.2.3	Test d'infectivité de la production virale.....	52
4.3	Maturation des cellules dendritiques	52
4.3.1	Analyse des transcrits de cytokines	53
4.3.2	Analyse de l'expression du CXCR4 sur les cellules dendritiques.....	54
4.4	Infection des cellules dendritiques par le VIH-1	54
4.5	Transfert du VIH-1 des cellules dendritiques aux LyT CD4+ quiescents.....	55
4.6	Quantification de l'ADN viral intégré au génome cellulaire.....	55
4.7	Analyse statistique	56
Chapitre 5. Résultats		57
5.1	Analyse de l'effet des stimulations des récepteurs TLR, NOD-2 et dectine-1 sur la maturation des DC : morphologie, marqueurs phénotypiques et expression des transcrits de cytokines	58
5.2	Analyse de l'effet des stimulations des récepteurs TLR, NOD-2 et dectine-1 sur le transfert du VIH-1.....	61
5.2.1	Cinétique de transfert du virus de tropisme X4	61
5.2.2	Cinétique de transfert du VIH-1 de tropisme R5	65
5.2.3	Analyse du transfert au jour 3 post-coculture : transfert précoce	67
5.2.4	Analyse du transfert au jour 6 post-coculture : transfert précoce et transfert tardif	69
5.3	Analyse de l'effet des stimulations des récepteurs TLR, NOD-2 et dectine-1 sur la modulation de l'expression du CXCR4.	72

5.4 Analyse de l'effet des stimulations des récepteurs TLR, NOD-2 et dectine-1 sur l'infection des cellules dendritiques	73
Chapitre 6. Discussion et conclusion	75
6.1 Les PAMP induisent différents profils de cytokines	75
6.2 Effet des différents PAMP sur la capacité des DC à transférer le VIH-1 aux LyT CD4+ quiescents	76
6.2.1 Le transfert précoce	76
6.2.2 Le transfert tardif et l'infection	80
6.3 Effet du poly I:C sur la capacité des DC à transférer le VIH-1 aux LyT CD4+ quiescents	85
Perspectives	87
Conclusion	88
Bibliographie	89

Liste des tableaux

Tableau 1. Fonctions des protéines accessoires du VIH-1	9
Tableau 2. Principaux ligands des TLR chez l'humain	34
Tableau 3. Ligands utilisés pour les expériences de maturation, d'infection et de transfert	53
Tableau 4. Séquences d'amorce des cytokines analysées.....	54

Liste des figures

Figure 1. Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH en 2008 (6).	5
Figure 2. Représentation schématique de la structure du VIH-1 (16).	7
Figure 3. Structure du génome du VIH-1 (18).	8
Figure 4. Région LTR du génome du VIH-1 (33).	10
Figure 5. Cycle de réplication du VIH-1 (95).	16
Figure 6. Transfert du VIH-1 de la DC au LyT CD4+ (106).	19
Figure 7. Pathogénèse du VIH-1 (16).	24
Figure 8. Transcytose du VIH-1 via la muqueuse vaginale (106).	25
Figure 9. Structure des TLR (177).	33
Figure 10. Signalisation via les récepteurs de l'immunité innée (187).	35
Figure 11. Membres de la famille des NLR (195).	36
Figure 12. Membre de la famille des récepteurs lectines de type C (206).	39
Figure 13. Expression des transcrits de cytokines induits par les différents PAMP.	60
Figure 14. Cinétique du transfert du VIH-1 de tropisme X4.	64
Figure 15. Cinétique du transfert du VIH-1 de tropisme R5.	66
Figure 16. Transfert du VIH-1 de tropisme X4 et R5 au jour 3.	68
Figure 17. Transfert du VIH-1 de tropisme X4 et R5 au jour 6.	71
Figure 18. Pourcentage de cellules positives exprimant le CXCR4 à la surface des DC.	72

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNv	Acide désoxyribonucléique viral
APOBEC3G	de l'anglais <i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ARNv	Acide ribonucléique viral
AZT	Azidothymidine
CA	Capside
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTL	Cellule T CD8 ⁺ cytotoxique
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CPI	Complexe de pré-intégration
DC	Cellule dendritique
mDC	Cellule dendritique myéloïde
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
DCIR	de l'anglais <i>Dendritic cell immunoreceptor</i>
DC-SIGN	de l'anglais <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin</i>
GC	gonococcus pour <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
HAART	de l'anglais <i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HTLV-III	de l'anglais <i>Human T-cell lymphotropic virus III</i>
IN	Intégrase
IFN α	Interféron alpha
IFN β	Interféron beta
IFN γ	Interféron gamma
LAV	de l'anglais <i>lymphadenopathy-associated virus</i>
LPS	Lipopolysaccharide

LTA	de l'anglais <i>Lipotechoic acid</i>
LTR	de l'anglais <i>Long terminal repeat</i>
LyT CD4+	Lymphocyte T CD4+
MA	Matrice
NC	Nucléocapside
NS	non-stimulé
NFAT	de l'anglais <i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NKκB	de l'anglais <i>Nuclear factor of kappa B</i>
NOD1/2	de l'anglais <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NRTI	de l'anglais <i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
NRRTI	de l'anglais <i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
OLS	Organes lymphoïdes secondaires
PAMP	de l'anglais <i>Pathogen- associated molecular patterns</i>
PGN	Peptidoglycan
PRR	de l'anglais <i>Pattern recognition receptor</i>
RT	Rétro-transcription
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
TAR	de l'anglais <i>Transactivation response region</i>
TI	Transcriptase inverse
TLR	de l'anglais <i>Toll-like receptor</i>
TRIM5α	de l'anglais <i>Tripartite motif 5α</i>
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne

Chapitre 1 : Le virus de l'immunodéficience humaine

1.1 L'épidémie du SIDA

Depuis une trentaine d'années, le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ne cesse de faire des ravages partout dans le monde et plus particulièrement dans les pays de l'Afrique sub-saharienne. Cette maladie, causée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1), est encore aujourd'hui incurable bien qu'il existe des traitements pour inhiber le virus et ainsi améliorer la qualité de vie chez les individus infectés. La communauté scientifique mondiale vise la prévention de cette infection, mais aussi son éradication. C'est pourquoi il est important de développer un vaccin et de nouveaux agents antirétroviraux. Cependant, pour que ces avancées puissent avoir lieu, la compréhension du fonctionnement du virus et de ses interactions avec les cellules du système immunitaire est primordiale. Cela permettra éventuellement d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de vaincre ce fléau.

1.1.1 Historique et origine du VIH-1

Au début des années 80, une nouvelle maladie fit son apparition. Celle-ci semblait au départ toucher uniquement les homosexuels. Par la suite, les chercheurs découvrirent que divers groupes de personnes étaient touchés tels que les hétérosexuels, les hémophiles, les consommateurs de drogues intraveineuses, ainsi que les personnes ayant reçu des transfusions sanguines. Ce phénomène laissa présager un mode de transmission biologique. L'origine de cette étrange maladie, caractérisée entre autres par une lymphadénopathie et la présence de maladies opportunistes rares, fut ensuite associée à un agent infectieux. En effet, l'équipe du Dr Montagnier travaillant à l'Institut Pasteur de Paris isola un nouveau virus en 1983. Ce dernier provenait d'un ganglion d'un patient infecté. Ce virus fut alors nommé LAV (de l'anglais *Lymphadenopathy-associated virus*). Cette découverte fut également confirmée l'année suivante par les résultats de l'équipe du Dr Gallo du NIH (*National Institute of Health*) aux États-Unis qui, elle, le nomma HTLV-III (de l'anglais *Human T-cell lymphotropic virus type III*). C'est seulement en 1986 que le virus fut nommé officiellement VIH-1 par la communauté scientifique internationale.

Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant l'origine du VIH-1 mais des études phylogénétiques ont par la suite révélé des ressemblances avec le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (1-4). En effet, les contacts répétés entre l'homme et le singe dans certains pays et la capacité du virus à muter fréquemment auraient entraîné sa transmission efficace chez l'humain. De plus, plusieurs facteurs tels que l'augmentation de la fréquence des voyages et les comportements sexuels à risque furent ensuite responsable de la dissémination du VIH-1 au sein de la population mondiale (5).

1.1.2 Épidémiologie

Selon le rapport 2009 de l'ONUSIDA, environ 33,4 millions de personnes vivent avec le VIH-1 dont 15,7 millions de femmes et 2,1 millions d'enfants (6). Bien que la prévalence du VIH-1 semble s'être stabilisée dans le monde, 2,7 millions de personnes ont été nouvellement infectées en 2008, dont 71% se trouvait en Afrique subsaharienne et 90% dans les pays en voie de développement (figure 1) (6).

Depuis sa découverte dans les années 1980, ce virus aurait fait plus de 25 millions de morts à l'échelle planétaire (6). Bien que l'arrivée de plusieurs traitements antirétroviraux ait augmenté l'espérance de vie des personnes séropositives, le nombre de décès annuels lié au SIDA demeure très élevé, soit 2 millions en 2008. La majorité des décès se retrouve dans les pays en voie de développement, ce qui s'explique par la difficulté des patients dans ces pays à avoir accès aux tests de dépistage et aux traitements contre le VIH-1. Malgré cela, des progrès ont été faits ces dernières années grâce au programme d'accès élargi aux traitements installé dans divers pays d'Afrique (6).

Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH, 2008

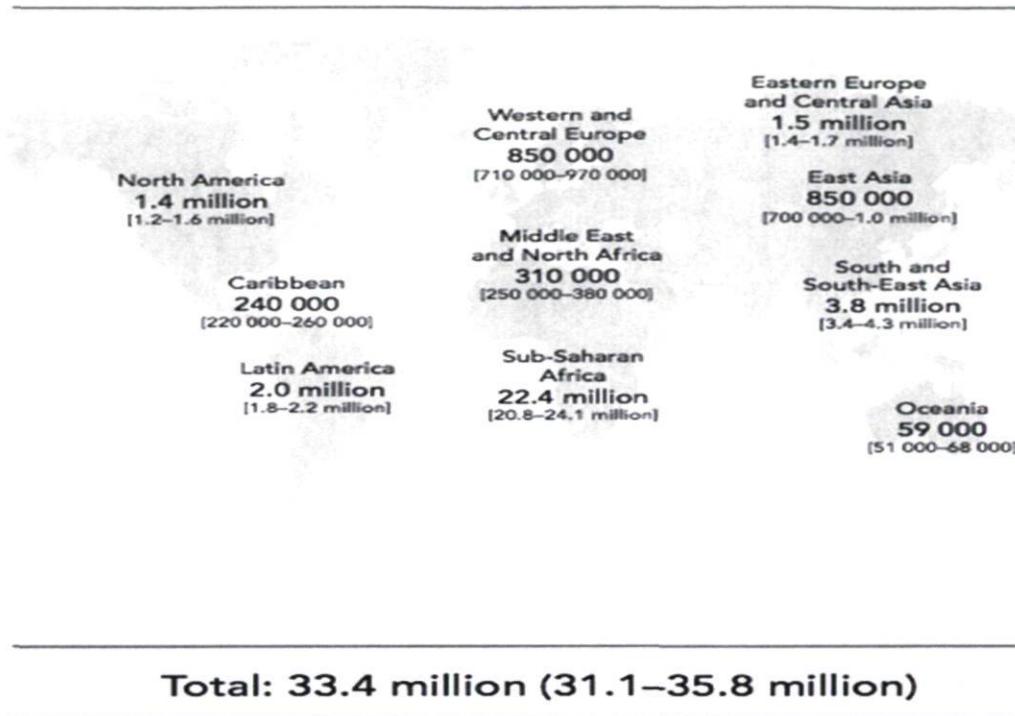


Figure 1. Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH en 2008 (6).

En Amérique du Nord, il y aurait 1,4 millions de personnes vivant avec le VIH dont 65 000 personnes au Canada. Le nombre de cas a connu dans ce pays une hausse de 14% en 2008 par rapport à 2005, et ceci est dû en partie à la disponibilité de la médication contre le VIH réduisant ainsi la mortalité des individus infectés (7). Parmi les nouveaux cas répertoriés, près de 25% seraient au Québec, ce qui totaliserait 18 000 personnes infectés en 2008 (8, 9).

1.2 Le VIH-1

Le VIH-1 est un virus du genre *lentivirus* et fait partie de la grande famille des *Retroviridea*. Ces virus partagent certaines propriétés telles que leur structure, leur composition moléculaire et leur mode de réplication. Ils ont de plus la capacité d'intégrer leur génome viral au génome cellulaire et d'y persister alors plusieurs années sous forme latente. Les rétrovirus se différencient des autres lentivirus par leur génome d'ARN qui est rétrotranscrit en ADN grâce à une enzyme virale, la transcriptase inverse (TI). Contrairement à l'ADN polymérase cellulaire, la TI ne peut corriger les mésappariements pouvant survenir lorsqu'elle accomplit sa fonction, ce qui engendre un taux élevé de mutation dans l'ADN proviral. Un autre aspect qui les différencie des autres lentivirus est leur capacité à infecter des cellules au repos, ce qui crée un réservoir de cellules infectées de façon latente. Ce réservoir constitue un des principaux obstacles à l'éradication du VIH.

1.2.1 Les différents types, groupes et sous-groupes de VIH

Il existe deux types de VIH : le VIH-1 et le VIH-2. Bien qu'ils présentent des similitudes telles que la structure de leur génome, leurs mécanismes de transactivation, leur capacité à dépléter les lymphocytes T (LyT) CD4⁺ (10, 11) et leur séquence (30% à 60% d'homologie) (12), ils se distinguent par leur origine géographique, leur lien de parenté avec le VIS et leur pathogénicité. Le VIH-1 est toutefois le type le plus répandu mondialement.

Il existe trois groupes de VIH-1. Ces groupes ont été formés en se basant sur l'analyse des séquences nucléotidiques des virus. Il s'agit des groupes M, N et O. Le groupe M, le plus répandu, est subdivisé en 11 sous-groupes (A à K). Le sous-groupe B est celui qui prédomine en Amérique du Nord, en Europe, en Asie et en Australie alors que les sous-groupes A, C, D et E sont prévalents en Afrique (14, 15). Aucun sous-groupe n'a été identifié pour les groupes N et O (13).

1.2.2 La structure du VIH-1

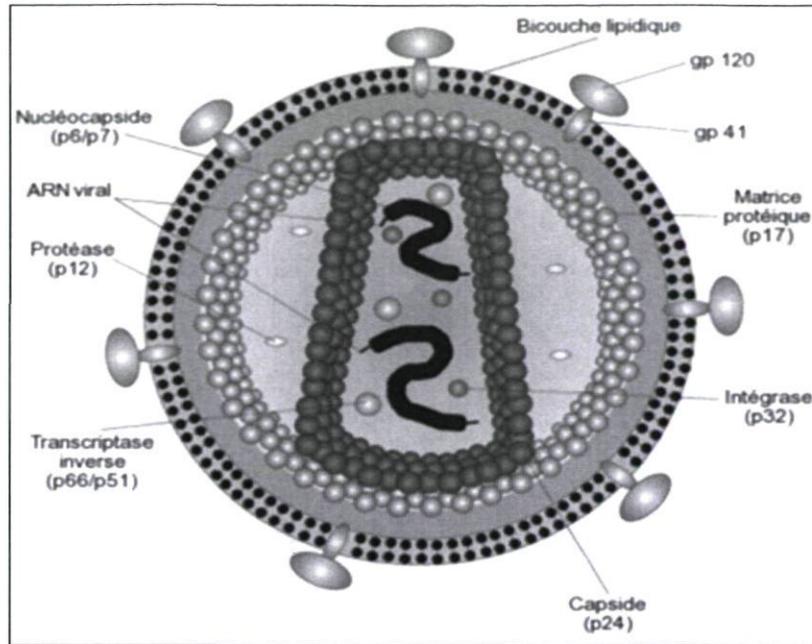


Figure 2. Représentation schématique de la structure du VIH-1 (16).

Le VIH-1 est un virus enveloppé d'une bicouche lipidique provenant de la membrane cellulaire de la cellule infectée. Deux glycoprotéines virales s'y retrouvent, soit la gp120 et la gp41 (figure 2). Ces dernières servent respectivement à lier le virus au récepteur spécifique présent à la surface de la cellule cible et à fusionner les membranes virale et cellulaire afin d'y faire pénétrer le génome du virus. La gp120 est composée de 5 régions constantes (C1 à C5) intercalées par 5 régions variables (V1 à V5). Ces dernières (à l'exception de V5) forment des boucles couvrant l'extérieur de la protéine et servant au processus d'attachement et d'entrée du virus.

Le centre du virus renferme une structure conique formée de la protéine p24 constituant la capside virale. Celle-ci protège le génome composé de deux copies d'un brin d'acide ribonucléique (ARN) à polarité positive. Trois enzymes importantes se retrouvent également à l'intérieur du virus, dont deux à l'intérieur de la capside. Ces enzymes, la transcriptase inverse (TI), l'intégrase (INT) et la protéase (PR), sont essentielles à la survie du virus, car elles ont un rôle important à jouer lors du cycle répliatif. La TI transcrit

l'ARN viral simple brin en acide désoxyribonucléique (ADN) double brin. Cette enzyme possède également une activité RNaseH permettant d'éliminer l'ARN simple brin lors du changement en ADN (17). Le génome viral est ensuite inséré à l'intérieur du génome cellulaire par l'action de l'intégrase virale. Par la suite, la protéase virale permet le clivage des précurseurs protéiques viraux afin d'obtenir les protéines matures nécessaires à l'assemblage des virions.

1.2.3 L'organisation génomique du VIH-1

Le génome du VIH-1 contient 9 gènes codant pour 15 protéines. Les trois principaux gènes sont *gag*, *pol* et *env* et sont communs chez tous les rétrovirus. Le premier, *gag*, code pour des protéines de structure, soit la matrice (p17), la capside (p24) et la nucléocapside (p7) ainsi que la petite protéine p6. Le second, *pol*, code pour les trois protéines enzymatiques, soit la TI, l'INT et la PR. Le troisième, *env*, code pour les glycoprotéines de surface du virus, soit la gp120 et la gp41 (figure 3).

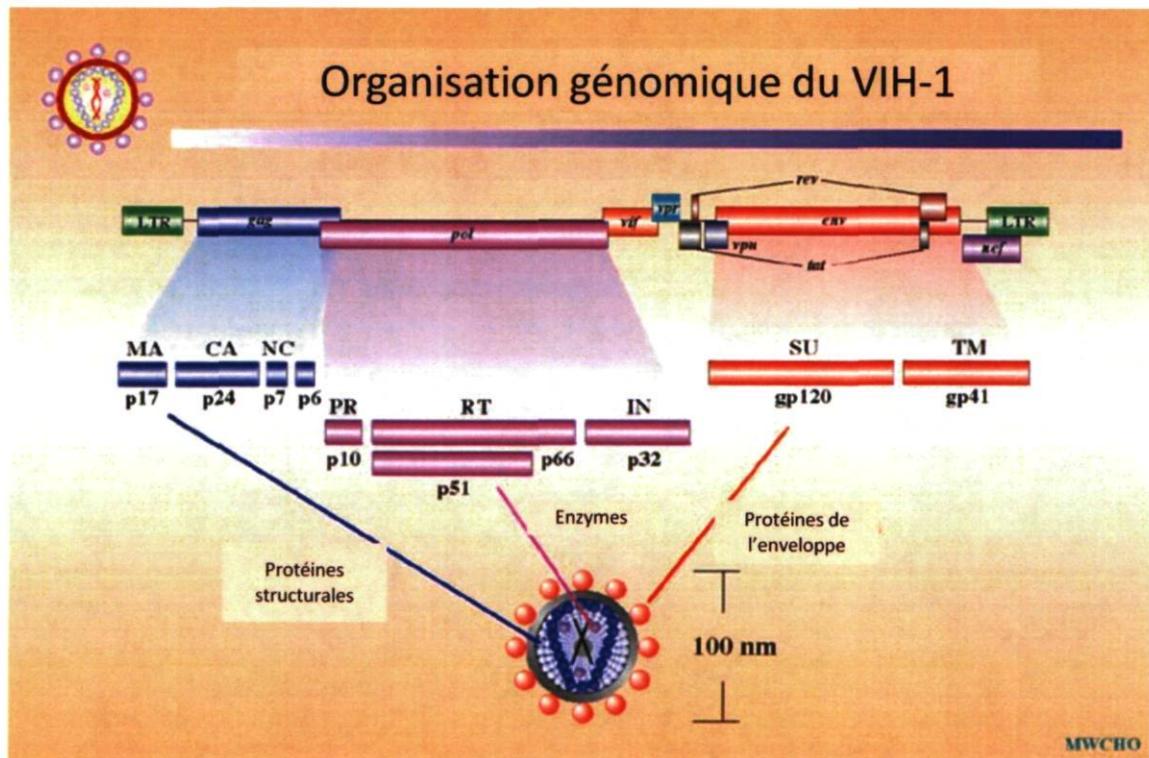


Figure 3. Structure du génome du VIH-1 (18).

Une des caractéristiques du génome de ce rétrovirus est qu'il possède plusieurs protéines supplémentaires codées par différents cadres de lectures, ce qui ajoute à sa complexité. Ces six protéines accessoires apparaissent plus tardivement lors de la réplication du virus et ont des fonctions distinctes présentées dans le tableau 1.

Tableau 1. Fonctions des protéines accessoires du VIH-1.

Protéines accessoires	Fonctions
Tat (<i>transactivator</i>)	Régulateur positif de la transcription (19)
Rev (<i>regulator of viral expression</i>)	Export des transcrits d'ARNm non-épissés hors du noyau (19)
Vpr (<i>viral protein R</i>)	Transport de l'ADN au noyau, augmente la production virale et contrôle le cycle cellulaire par l'arrêt de la phase G ₂ (20-22)
Vpu (<i>Viral protein U</i>)	Augmente la libération des particule virales et réduit l'expression du CD4 (23, 24)
Vif (<i>viral infectivity</i>)	Empêche la désamination de l'ADN viral en liant la protéine cellulaire antirétrovirale APOBEC3G (25, 26)
Nef (<i>negative-regulation factor</i>)	Augmente l'infectivité et réduit l'expression du CD4 ⁺ , CMH-I et CMH-II (27-29)

Le génome viral possède également à chaque extrémité des séquences LTR (de l'anglais *long terminal repeat*). Le LTR est composé de trois régions nommées U5, R et U3. Ces régions contiennent quatre sites fonctionnels, soit la région TAR (de l'anglais *tat-activation-response element*) située en aval du site d'initiation, la région promotrice, la région amplificatrice et la région modulatrice (figure 4). Certains facteurs de transcription cellulaire tels que le NF- κ B (*Nuclear factor of kappa B*) et le NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) ont la capacité de se lier à ces régions (30, 31). Lorsque leur production est requise par la cellule, ces facteurs peuvent alors servir à la réplication virale. La région TAR, quant à elle, permet la liaison de la protéine Tat, un processus essentiel à l'élongation de la transcription (32).

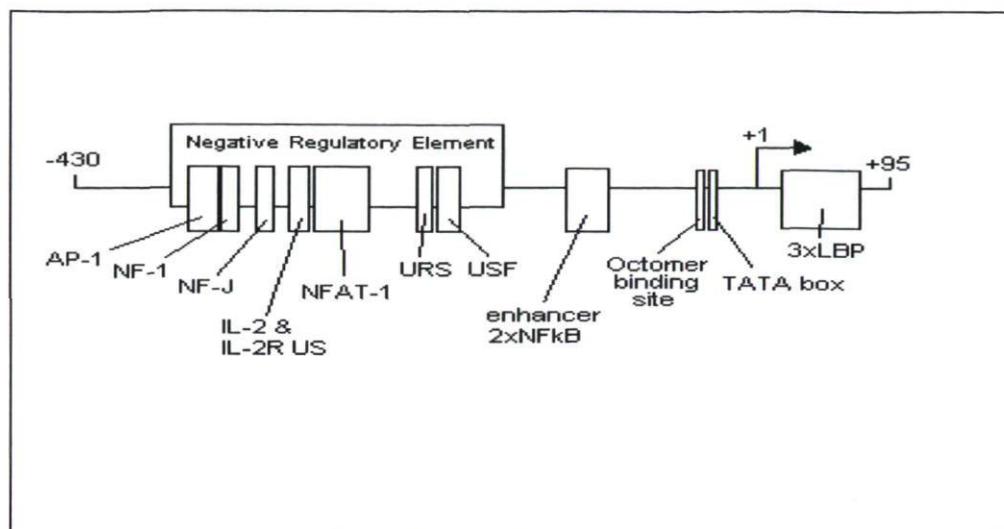


Figure 4. Région LTR du génome du VIH-1 (33).

1.2.4 Le tropisme du VIH-1

1.2.4.1 Récepteur et corécepteurs

Très tôt lors de la découverte du VIH-1, le récepteur CD4 lui fut associé comme récepteur principal (34, 35). Mais peu après cette découverte, il parut évident que le virus utilisait un autre récepteur pour permettre la fusion des membranes. C'est au milieu des années 90 que le CXCR4 et le CCR5, deux récepteurs de chimiokines, furent identifiés comme corécepteurs nécessaires à la fusion du VIH-1 (36). D'autres molécules ont également été identifiées comme corécepteurs, notamment le CCR2b, le CCR3, le CCR8, le CX3CR1 et le CXCL16. Cependant le CXCR4 et le CCR5 sont les plus utilisés par le virus(37-42).

Les récepteurs de chimiokines sont des protéines de surface composées de 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La fonction physiologique de ces récepteurs est de lier leurs chimiokines respectives, et d'ainsi enclencher une cascade de signalisation menant à la migration des cellules aux sites inflammatoires, lieu de sécrétion des cytokines. Le CCR5 a la possibilité de lier 4 ligands différents : RANTES, MIP-1 α , MIP1- β et MCP2 (43, 44). Ces chimiokines attirent les cellules du système immunitaire au site d'infection et permettent leur infiltration dans les tissus (45). Quant au CXCR4, il ne possède qu'un seul ligand, soit le SDF-1. Cette molécule provoque la migration des lymphocytes aux organes

lymphoïdes secondaires (OLS) (46). Toutes ces chimiokines entrent en compétition avec la gp120 pour la liaison des récepteurs et leur présence permet d'inhiber en partie l'infection du VIH-1 (43, 47).

Plusieurs études ont démontré la présence de deux tropismes différentes de virus (43). Les souches de VIH-1 de type R5 infectent les cellules présentant le récepteur CCR5 à leur surface, soit les macrophages, les DC immatures et les LyT CD4⁺ activés. Les souches de type X4 infectent quant à elles les cellules présentant le CXCR4 à leur surface, c'est-à-dire les LyT CD4⁺ naïfs, activés et mémoires. De plus, il existe une souche R5/X4 qui a la propriété d'infecter autant les cellules exprimant le CCR5 que le CXCR4.

1.2.4.2 Évolution des souches virales chez les individus infectés

Le passage du tropisme R5 vers X4 est le résultat de mutations génétiques lors de la transcription de l'ARN du virus en ADN. En effet, les erreurs de transcription effectuées par la transcriptase inverse sont très fréquentes et contribuent à l'apparition de virus X4 (48). Bien qu'elle pourrait théoriquement apparaître à tout moment, la souche X4 apparaît plus tardivement et ce, chez 50% des individus infectés (49, 50). Les causes responsables de cette mutation tardive sont encore inconnues. En général, c'est la souche R5 qui est transmise d'une personne à l'autre et présente lors de la primo-infection et de la majeure partie de la phase chronique (49). Cela pourrait être dû au fait que le CCR5 est présent sur plusieurs types de cellules localisées au site de transmission, notamment les DC immatures qui sont des sentinelles dans les muqueuses et sont parmi les premières cellules à rencontrer le virus (51-53). Puisque les molécules de CXCR4 sont pratiquement absentes des cellules localisées au site de transmission, les virus R5 seraient avantagés au détriment des virus X4. Toutefois, plusieurs données semblent indiquer que c'est la souche X4 qui fait progresser la maladie vers la phase SIDA (54). En effet, les virus X4 ont des effets cytopathogéniques importants sur les cellules, un phénomène qui contribue à diminuer encore plus le niveau sérique de LyT CD4⁺ (54-56).

1.3 Les cellules permissives à l'infection

Le VIH-1 a la capacité d'infecter plusieurs types de cellules du système immunitaire. Bien que le LyT CD4⁺ soit sa cible préférentielle, il peut également infecter les DC et les macrophages (57), ces derniers possédant à la fois le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4. Le virus a toutefois la capacité d'infecter d'autres types cellulaires dépourvus de molécules CD4, notamment, les lymphocytes B (58), les LyT CD8⁺ (59), les astrocytes (60), les cellules épithéliales (61) et les thymocytes (62). Cette section va cependant se limiter aux LyT CD4⁺ et aux DC puisque ces deux types cellulaires sont les acteurs principaux de ce projet.

1.3.1 Les lymphocytes T CD4⁺

Les LyT CD4⁺ sont les principales cibles du VIH-1. En plus de posséder le récepteur CD4, ils possèdent également une forte concentration du corécepteur CXCR4 et, selon leur état d'activation, du CCR5. Les LyT CD4⁺ comptent deux groupes distincts : les LyT CD4⁺ naïfs et mémoires.

Les LyT CD4⁺ naïfs et mémoires se distinguent par l'isoforme du CD45, une tyrosine phosphatase membranaire participant à des événements de signalisation intracellulaire. En effet, les cellules naïves expriment l'isoforme de haut poids moléculaire (CD45RA) alors que les cellules mémoires possèdent l'isoforme de faible poids moléculaire (CD45RO) (63, 64). Les cellules naïves n'ont jamais rencontré d'antigène. Elles sont dans un état quiescent et donc très peu actives (65). C'est la présence des récepteurs CD62L et CCR7 à la surface des cellules quiescentes qui est responsable de leur migration et de leur extravasation jusqu'aux OLS (66). Les cellules naïves vont y être activées à la suite d'un contact avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), notamment les DC. Selon le signal présenté par la CPA et les cytokines présentes dans l'environnement, divers sous-types de LyT CD4⁺ sont induits. Il s'agit des cellules T effectrices Th1, Th2, Th9, Th17 et Th22 et des cellules T régulatrices (Treg). Suivant leur activation, l'expression de certains récepteurs est modifiée. Le CD62L et le CCR7 font place à de fortes concentrations de CCR4, CCR5 et CXCR3. Ces récepteurs permettent aux cellules activées de migrer et de pénétrer dans les tissus enflammés (67). Par un mécanisme encore méconnu, certaines cellules T effectrices sont ensuite transformées en cellules T mémoires exprimant les molécules CCR7, CD62L

et CD45RO. Elles circulent dans le sang et la lymphe jusqu'à leur seconde rencontre avec leur pathogène dans les ganglions (68).

Les cellules naïves sont davantage réfractaires à l'infection par le VIH-1, et ce, malgré la présence du CD4 et du CXCR4 (69, 70). En effet, l'infection exige un état d'activation cellulaire afin que les facteurs de transcription puissent lier le LTR du virus et que les mécanismes de transcription inverse et d'intégration soient efficaces. Ces mécanismes sont toutefois altérés dans les cellules naïves étant donné qu'elles sont quiescentes donc biologiquement peu actives, et qu'elles contiennent également des facteurs de restriction cellulaire (voir section 1.6) pouvant nuire également à l'infection (71, 72).

Les cellules mémoires, malgré un état de quiescence, sont plus susceptibles que les cellules naïves à l'infection par le VIH-1 (72). Contrairement à ces dernières, leur état est légèrement plus actif (73). En effet, elles induisent davantage de facteurs de transcription cellulaire nécessaires à l'accomplissement de certaines étapes du cycle viral. Ce sont d'ailleurs ces cellules qui constituent le principal réservoir viral chez les individus infectés (74-76).

C'est par contre lors de l'infection des LyT CD4⁺ activées que la production de nouveaux virions est la plus grande et particulièrement chez les sous-types Th2, Th17 et l'intermédiaire Th1/Th17 (77). Étonnamment, il a été démontré que les cellules Th17 et Th1Th17 possèdent à la fois le CXCR4 et le CCR5 et sont donc susceptibles aux deux tropismes de VIH-1, alors que les cellules Th2 n'expriment que le CXCR4, ce qui les rend susceptibles uniquement au virus de tropisme X4. Les cellules Th1 sont les premières cellules identifiées comme étant résistantes au virus *in vitro*, bien qu'exprimant à la fois les deux corécepteurs (77). Ce résultat corrèle avec le fait que l'on retrouve une plus grande concentration de Th1 versus Th17 dans le sang des individus infectés (78). Une étude a d'ailleurs suggéré que la résistance des Th1 au virus R5 serait due à un mécanisme empêchant la décapsulation (79). Les raisons de cette résistance doivent cependant être éclaircies.

1.3.2 Les cellules dendritiques

Les DC sont des cellules sentinelles résidant dans les tissus périphériques et les muqueuses. En raison de leur localisation, elles sont parmi les premières à rencontrer un pathogène lors d'une infection. Les DC constituent une population très hétérogène et les différents groupes se distinguent entre eux par leur morphologie, les marqueurs de surface qu'elles expriment et leur fonction. Elles jouent chacune un rôle différent lors de la réponse immune. La majorité des DC se retrouve dans les tissus périphériques à l'état immature. À la suite de leur maturation, elles sont alors localisées au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

Selon leur origine, elles sont classées en trois sous-groupes, dont font partie les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Cependant, seules les mDC et les pDC seront décrites dans ce travail. Ces deux types cellulaires se distinguent entre eux par leurs marqueurs de surface, ainsi que par leur localisation et leur fonction. Les mDC sont localisées dans les tissus périphériques et présentent à leur surface plusieurs marqueurs tels que des récepteurs de chimiokines, les molécules du CMH et bien d'autres (80). Les caractéristiques des mDC immatures et matures seront détaillées à la section 2.7.1. Ces cellules expriment également plusieurs PRR (de l'anglais *Pattern recognition receptor*), notamment de fortes concentrations des TLR (de l'anglais *Toll-like receptors*) 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 8 (81). Grâce à ces récepteurs, les mDC peuvent reconnaître une variété de produits microbiens en plus de l'ARNv double brin et simple brin. Les cellules immatures ont une activité phagocytaire accrue et elles sont caractérisées également par une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 et le TNF α . Leur phénotype change lors de la maturation. Leur fonction principale est alors de migrer aux organes lymphoïdes secondaires afin de présenter l'antigène et d'activer les lymphocytes T naïfs.

Les pDC sont localisées dans le sang et elles sont notamment caractérisées par l'expression du CD123, du CMH-II, du CXCR3 et du CCR7 (80). Contrairement aux mDC, les pDC expriment beaucoup moins de TLR. En effet, celles-ci n'expriment que les TLR6, 7, 8, 9, ce qui leur permet de reconnaître l'ARNv simple brin ainsi que l'ADN bactérien contenant des motifs CpG (81, 82). La signalisation par l'intermédiaire des TLR7, 8 et 9, induit une

forte sécrétion d'interféron de type 1 chez ces cellules (81-83). Les pDC sont donc très importantes lors de la réponse immune et particulièrement lors des infections virales. Selon certaines études, elles ont également la capacité d'apprêter et de présenter des antigènes endogènes afin d'activer les LyT CD4⁺ naïfs (84-86) . Leur potentiel activateur demeure cependant inférieur aux mDC (82).

Les mDC et les pDC sont toutes les deux susceptibles d'être infectées par le VIH-1. En plus de posséder le récepteur CD4, les deux types de DC expriment également les corécepteurs CCR5 et CXCR4. Cependant, leur profil d'expression des corécepteurs diffère entre elles. En effet, les pDC expriment en plus grande quantité les corécepteurs par rapport aux mDC (80, 87). Les mDC immatures sont reconnues pour être plus facilement infectées par le VIH-1 de tropisme R5 (83, 87). En effet, celles-ci expriment plus fortement le CCR5 à leur surface que le CXCR4 (88-90). La maturation induit cependant la diminution du CCR5 et rend donc les cellules moins susceptibles à l'infection par des virus R5 (91, 92). Bien que la maturation induisent également l'augmentation de l'expression du CXCR4 (93, 94), aucune étude n'a actuellement observé un changement quant à la susceptibilité des DC matures à l'infection par le VIH-1 de tropisme X4.

Par contre, les études semblent controversées quant à la susceptibilité des pDC. En effet, alors qu'une étude ne présente aucune différence entre les deux tropismes de virus lors de l'infection des pDC (83), une autre affirme que ces cellules sont davantage susceptibles au tropisme R5 (87). Des recherches supplémentaires seront nécessaires afin de bien définir la susceptibilité de ces cellules aux différents tropismes du VIH-1.

1.4 Le cycle répliatif

Tout microorganisme a pour but ultime sa dissémination à travers l'hôte infecté. Comme tous les virus, la réplication du VIH-1 nécessite son entrée à l'intérieur des cellules permettant au virus d'utiliser la machinerie cellulaire à son avantage. Il s'ensuit une très longue bataille entre les cellules du système immunitaire et le virus. Sa capacité à s'adapter au type cellulaire infecté et à déjouer les défenses du système immunitaire font de lui un

pathogène redoutable (figure 5). Le virus peut infecter la cellule de manière directe, c'est-à-dire par un virus libre liant son récepteur spécifique à la surface de la cellule cible. Il peut aussi infecter de manière indirecte par l'intermédiaire de cellules infectées de manière productive. En effet, le virus peut utiliser le contact physique entre deux cellules lors de la synapse immunologique afin d'être transféré à une autre cellule. Il peut alors y avoir, soit une infection productive de la cellule, c'est-à-dire production de nouveaux virions à la suite de l'intégration du génome viral au génome cellulaire, soit capture et/ou internalisation des virus sans intégration.

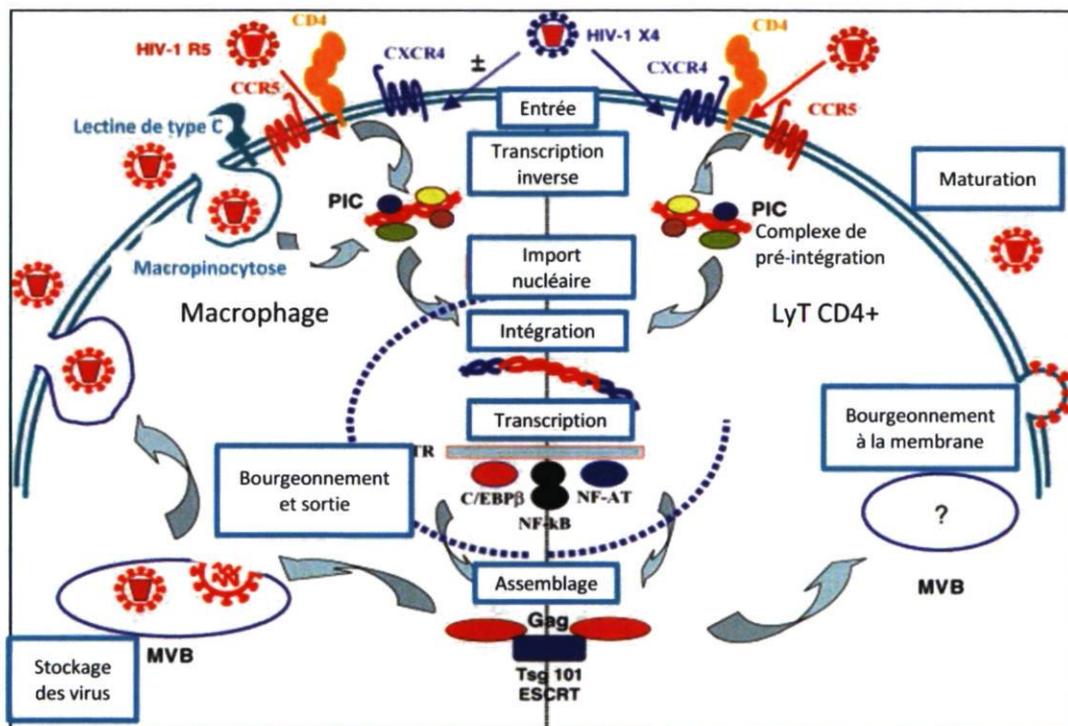


Figure 5. Cycle de réplication du VIH-1 (95).

1.4.1 Le transfert du VIH-1

Le transfert viral d'une cellule infectée vers une cellule non-infectée est connu depuis plusieurs années. Le VIH-1 utilise le contact entre deux cellules afin de favoriser l'efficacité de l'infection. Ce mode de transmission a été décrit non seulement chez le VIH-1 mais aussi chez le HTLV-I (96, 97) et est reconnu comme étant plus efficace et plus rapide que l'infection par un virus libre (98). En effet, le transfert permet de préserver le

virus sous forme infectieuse et de rencontrer plus facilement une cellule permissive à l'infection. De plus, le contact entre les deux cellules engendre un réarrangement et une concentration des protéines de surface au site de contact favorisant ainsi l'attachement et l'infection par les virus. Cela permet également au virus d'échapper aux anticorps neutralisants et aux molécules du complément (97).

1.4.1.1 Le transfert précoce et tardif

Le transfert a été observé entre différents types cellulaires, notamment les DC et les LyT CD4⁺ (99, 100) et entre deux LyT CD4⁺ (101). La figure 6 représente les divers modes de transfert entre la DC et le LyT CD4⁺. Le transfert se produit, soit lors de la présentation antigénique entre la CPA et le LyT CD4⁺ ou soit lorsque deux cellules sont à proximité. Ce phénomène implique un regroupement de diverses protéines membranaires au site de contact entre les cellules.

Le transfert précoce ou en trans se définit comme étant le transfert de virus provenant de vésicules endosomales et/ou captés à la surface cellulaire via différents récepteurs. En effet, le virus peut se lier à des récepteurs de la famille des lectines de type C. Cette famille regroupe deux récepteurs très étudiés dans le contexte du VIH-1, soit le DC-SIGN (de l'anglais *Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) grabbing nonintegrin*) et le DCIR (de l'anglais *Dendritic cell immunoreceptor*). Ces récepteurs, qui se retrouvent à la surface des DC, ont la capacité de lier le virus (102, 103). Ces liaisons n'entraînent pas nécessairement une infection productive de la DC mais elles permettent tout de même la propagation du virus en permettant son transfert à un autre type cellulaire, le LyT CD4⁺. En effet, la DC interagit avec les LyT CD4⁺ lors de la présentation antigénique qui a lieu dans les ganglions lymphatique permettant ainsi au VIH-1 d'avoir un accès facile à des cellules permissives à l'infection. Le transfert précoce peut également provenir du transit des virus à l'intérieur de la cellule infectée via des endosomes. Ce phénomène serait d'ailleurs plus fort chez les DC matures. En effet, de larges vésicules localisées près du noyau et contenant beaucoup de virions ont été observées chez ces dernières. Par contre, les DC immatures en possèdent beaucoup moins et ses vésicules sont localisées davantage en périphérie et elles sont plus sujettes à la dégradation (104). Une

étude plus récente a cependant démontré que ces vésicules seraient en fait de grandes invaginations à l'intérieur desquelles les virus prendraient place pour être ensuite transférés (105).

Le transfert tardif est celui issu d'une infection productive de la cellule. À la suite des événements de fusion et d'intégration, il y a génération de nouveaux virions qui pourront être transférés lors d'un contact avec une autre cellule (106, 107). Le phénomène de synapse virologique est fortement associé à ce type de transfert. Il consiste en un contact intercellulaire favorisant le passage du virus d'une cellule à l'autre. Ce contact implique le recrutement de molécules de surface, notamment les récepteurs et les corécepteurs du VIH-1 ainsi que les molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM, ces dernières servant à stabiliser l'interaction (108). Selon certaines études, la majorité des virus transférés proviennent du transfert précoce. En effet, le transfert issu de particules virales attachées à la surface cellulaire constituerait la plus grande part (91, 109).

1.4.1.2 Autres types de transfert : les nanotubes, les filopodes et les exosomes

Certaines structures cellulaires peuvent être impliquées dans le transfert de particules virales. C'est le cas des nanotubes et des filopodes. Le nanotube est un long tube généré à partir de la membrane plasmique. En plus d'avoir un rôle dans la communication intercellulaire et dans le transfert de molécules (110, 111), les nanotubes permettent également le transfert du VIH-1 (112). Ce type de transfert serait 100 à 1000 fois plus efficace que l'infection par un virus libre (112). Cette structure est présente chez les cellules neuronales et les cellules du système immunitaire, en particulier le LyT CD4+. Elle mesure environ 22 μm mais peut atteindre jusqu'à 100 μm dans certains cas. Le transfert via les nanotubes exige un contact prolongé entre les cellules (4 minutes et plus).

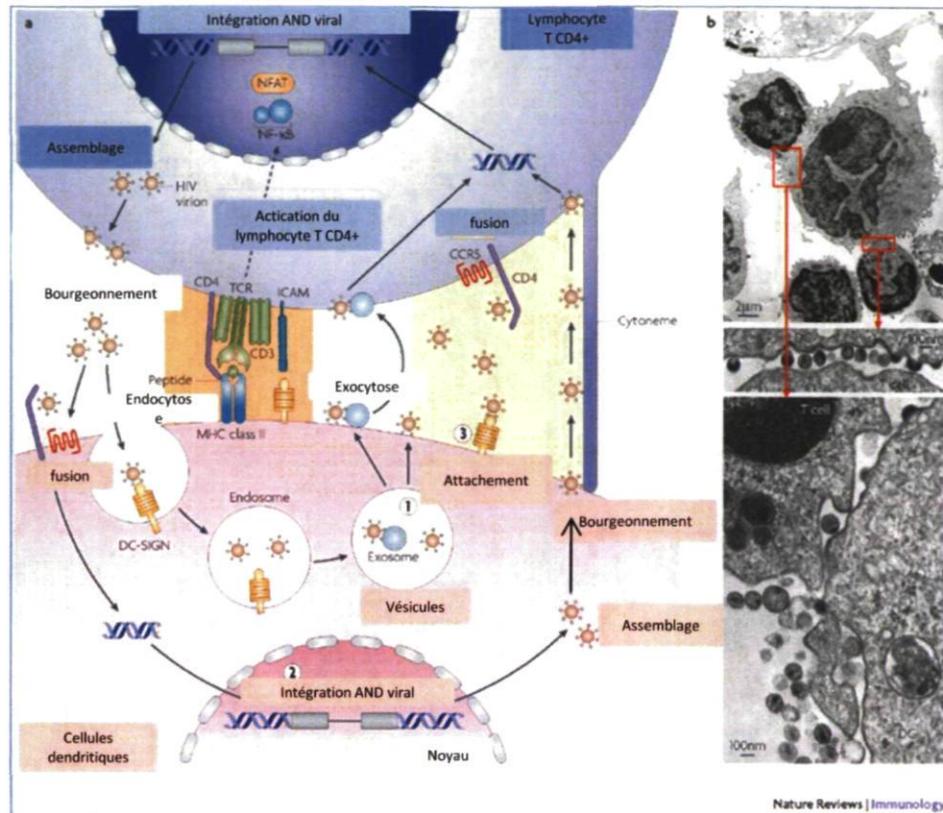


Figure 6. Transfert du VIH-1 de la DC au LyT CD4+ (106).

Les filopodes servent également au transfert efficace du VIH-1 (106, 113). Ils diffèrent des nanotubes par leur largeur et leur longueur. Ils sont en effet moins larges que les nanotubes et sont également plus court (6 μM). Ils sont générés par les cellules non-infectées. Le virus se transfère alors vers la cellule non-infectée en demeurant à la surface des filopodes. Contrairement aux nanotubes, le temps de transfert est beaucoup plus long, soit de 18 minutes et exige donc une interaction plus longue entre les cellules (113).

Finalement, un autre moyen employé par le VIH-1 pour infecter efficacement des cellules est la voie de transit des exosomes. Les exosomes sont de petites vésicules ayant la capacité de transférer les antigènes provenant des cellules infectées, tumorales ou des CPA jusqu'aux DC matures (114, 115). Cela permet d'augmenter le nombre de DC matures porteuses de l'antigène spécifique et d'amplifier l'initiation de la réponse adaptative via le CMH-II ou via le relargage des exosomes ayant transité à l'intérieur de la DC, mécanisme appelé trans-dissémination (116). Les exosomes ainsi libérés ont la capacité d'aller activer

les LyT CD4+ naïfs. Il a été démontré que le VIH-1 peut utiliser le mécanisme de trans-dissémination afin d'aller infecter les LyT CD4+ de manière efficace. En effet, il a été démontré que les exosomes et les particules virales se retrouvaient au même endroit près de la membrane et que leur accumulation dans la cellule se faisait dans les mêmes vésicules (115).

1.4.2 L'attachement et l'entrée

La première étape du cycle viral menant à l'infection productive de la cellule cible est l'attachement. Cette étape est le résultat de l'interaction entre la gp120 et la protéine de surface CD4. Bien que cette dernière soit présente sur plusieurs types de cellules, le LyT CD4+ demeure celui où sa concentration est la plus importante. Lorsque la gp120 entre en contact avec le récepteur CD4, il s'ensuit un mouvement de ses boucles libérant la boucle V3 et permettant ainsi l'interaction de la gp120 avec le corécepteur CCR5 ou CXCR4. Cette interaction provoque un changement de conformation de la gp120 exposant la gp41 à la surface. Le peptide de fusion de la gp41 s'insère dans la membrane plasmique, la rapprochant de l'enveloppe virale et provoquant ainsi la fusion des membranes.

1.4.3 La décapsidation, la rétro-transcription et le transport de l'ADN viral au noyau

1.4.3.1 La décapsidation

Une fois la fusion des membranes complétée, la capsid virale est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'endroit où se produit la décapsidation est plutôt controversé mais des études récentes suggèrent une décapsidation près de la membrane nucléaire et non pas dès l'entrée dans la cellule (117). En effet, il y aurait libération de la capsid dans le cytoplasme et migration de celle-ci jusqu'au noyau via le réseau des microtubules. Le mécanisme menant à la décapsidation est encore mal connu mais plusieurs études ont démontré l'importance d'une molécule de l'hôte lors de ce processus, soit la cyclophiline A. Cette molécule forme une liaison avec les protéines de la capsid afin de stabiliser cette dernière. De nombreuses études ont démontré une perte d'infectivité du virus et un blocage de la transcription inverse lorsque cette liaison est altérée (118).

1.4.3.2 La transcription inverse

La réaction de transcription inverse est catalysée par une enzyme, la TI et commence dès le bourgeonnement des virions. À la suite du relargage, il y a maturation des virons et formation d'un complexe de pré-initiation composé de l'ARN génomique, de la RT, de la NC et de l'ARNt^{Lys3}. Ce dernier élément sert d'amorce lors de la conversion de l'ARN génomique en ADN double brin (119). La transcription inverse débute lorsque les conditions cellulaires sont favorables, c'est-à dire lorsqu'il y a une accumulation de nucléotides dans la cellule dû à l'activation de celle-ci (120, 121). Cette étape est ensuite complétée près du pore nucléaire, à l'intérieur d'une capsid quasi intacte où la TI transforme l'ARN simple brin en ADN double brin (118). La complétion de cette étape requiert la formation d'une petite structure ternaire du génome nommé *central DNA flap*. Le complexe de pré-intégration (PIC) est alors formé.

1.4.3.3 L'import nucléaire

L'import nucléaire est d'une grande importance lors du cycle de réplication puisque c'est cette étape qui permet le passage de l'ADN viral au noyau en absence de division cellulaire. Ce phénomène est également responsable de la susceptibilité à l'infection de certains types cellulaires, tels que les macrophages, les DC et les LyT CD4+ quiescents (122, 123). Le PIC est formé de plusieurs protéines virales (MA, TI, IN, Vpr et flap) et cellulaires (124, 125). Les composantes de ce complexe jouent un rôle très important dans le transfert actif de l'ADN viral jusqu'au noyau. En effet, plusieurs études ont démontré l'importance de la protéine Vpr et de l'INT dans l'import nucléaire mais leur mécanisme d'action demeure méconnu et controversé. Selon les données les plus récentes, il semble que ce soit le flap qui joue le rôle le plus déterminant dans l'import du PIC au noyau (126).

1.4.4 L'intégration et l'expression génique

1.4.4.1 L'intégration

Une fois à l'intérieur du noyau, l'ADN viral s'intègre au génome cellulaire. Cette réaction est catalysée par l'intégrase virale, laquelle a la capacité de cliver l'ADN cellulaire afin d'y insérer le brin viral (127, 128). Ce clivage se fait généralement sur un gène actif bien que la spécificité du clivage soit limitée. En effet, plusieurs études ont démontré que l'endroit où

le génome viral s'intègre est le plus souvent un gène activé suivant l'infection par le VIH-1 (129, 130). Dans certains cas, l'ADN viral demeure dans le noyau sans être intégré. L'ADN peut alors s'y retrouver sous trois formes : circulaire contenant un ou deux LTR, ou encore sous forme linéaire. Ces formes non-intégrées peuvent tout de même mener à une transcription des gènes viraux mais seuls certains transcrits sont traduits, soit Nef, Tat et Rev (131, 132).

1.4.4.2 La transcription et la traduction

Lorsque la cellule est quiescente, la transcription des gènes viraux est maintenue à un niveau basal et ce grâce aux nucléosomes qui bloquent l'accès à l'ADN proviral (133). Lors de l'activation de la cellule, il y a un remodelage du nucléosome permettant ainsi la transcription du génome viral. Cette activation peut se produire lors de la présentation antigénique ou par la présence de facteurs solubles, notamment des agonistes des TLR ou des cytokines, dans le microenvironnement de la cellule.

La régulation de la transcription génique implique plusieurs interactions entre l'ADN viral, les facteurs de transcription cellulaire et la protéine virale Tat. Tout d'abord, les premières interactions sont régulées par des facteurs de transcription cellulaire. Ceux-ci activent la transcription des gènes viraux en liant plusieurs sites consensus présents dans le promoteur du VIH-1, le LTR. Il y a ensuite formation d'une boucle d'ARN en forme d'épingle à cheveu, nommée TAR. La protéine virale Tat s'associe ensuite à cette structure, cette dernière étant requise afin que Tat puisse lier l'ARN. Tat ainsi que plusieurs facteurs cellulaires sont indispensables pour que l'élongation de l'ARN ait lieu. L'accumulation de Tat joue un rôle important dans la transcription et l'élongation du génome viral.

Il y a deux phases à la transcription, soit la phase précoce et la phase tardive. La phase précoce implique une interaction directe entre les facteurs de transcription cellulaire et le LTR alors que la phase tardive débute à la suite de l'accumulation de la protéine virale Tat. La transcription du génome viral entraîne la synthèse de plus de douze transcrits viraux différents. Les transcrits courts sont rapidement transportés hors du noyau et codent pour des protéines de régulation, soit Nef, Rev et Tat. Ces derniers agissent sur le cycle viral afin d'accroître l'efficacité de la réplication. Les transcrits longs demeurent plus longtemps dans le noyau dû à un épissage alternatif qui les stabilise. Ils codent pour les protéines de

structure, les enzymes, les protéines accessoires et l'ARN génomique viral qui sera incorporé dans les virions. Ces transcrits sont exportés du noyau plus tardivement à l'aide de la protéine virale Rev.

1.4.5 L'assemblage, le bourgeonnement et la maturation

L'assemblage débute à la suite de la production des protéines virales. Lors de ce processus, plusieurs protéines virales et cellulaires agissent de concert pour assembler les virions. Le site principal d'assemblage est généralement à la surface interne de la membrane plasmique mais il peut aussi se produire au niveau des membranes endosomales chez les macrophages. L'assemblage débute par une accumulation de la protéine virale Gag à la membrane plasmique. La protéine Gag possède 4 domaines : la matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC) et la p6. Le domaine MA en N-terminal s'associe alors avec les radeaux lipidiques, ce qui ancre la protéine dans la membrane plasmique (134, 135). Le domaine de la nucléocapsid lie les ARN génomiques viraux en interagissant avec le signal d'encapsulation de ces derniers. Le domaine p6 en C-terminal contient une petite séquence peptidique qui permet à la protéine cellulaire ESCRT (de l'anglais *endosomal sorting complex required for transport*) de se lier et de catalyser le bourgeonnement (135, 136). Les enzymes virales sont également recrutées près de la membrane dû aux interactions avec la protéine Gag. De son côté, la protéine Env est synthétisée et clivée en gp120 et gp41. La gp41 s'ancre ensuite dans la membrane plasmique attachée de manière non covalente à la gp120.

Le bourgeonnement se fait dans les radeaux lipidiques cellulaires (137). Différentes molécules telles que des protéines servant à la signalisation ou à l'adhésion cellulaire s'y retrouvent et peuvent être incorporées par les virions (137-139). En plus des molécules de surface, plusieurs molécules cytoplasmiques peuvent se retrouver à l'intérieur des virus (140, 141). Lorsque les nouvelles particules virales bourgeonnent, elles sont dans un état immature. La maturation se finalise par le clivage des différents précurseurs protéiques viraux présents dans la particule virale immature. La protéase virale est responsable de ces clivages. Il y a ensuite génération de diverses protéines virales dont les enzymes. Par la suite, la CA et la MA sont formées pour constituer la particule virale (135, 142, 143).

1.5 La pathogénèse virale

L'infection par le VIH-1 est caractérisée par une déplétion massive des LyT CD4+, cellules essentielles au bon fonctionnement du système immunitaire. Cette perte fait place à différentes manifestations cliniques dont l'apparition d'infections opportunistes. Il peut par contre se passer plusieurs années avant que ces manifestations n'apparaissent, ce qui veut dire que les personnes infectées peuvent transmettre le virus plusieurs années avant de connaître leur état de santé (figure 7).

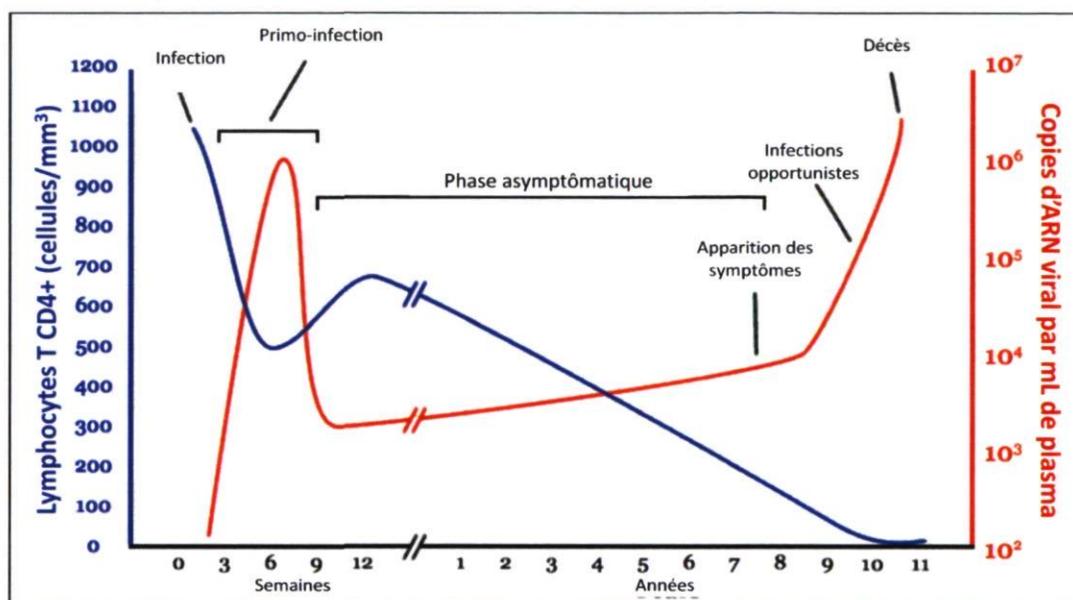


Figure 7. Pathogénèse du VIH-1 (16).

1.5.1 La transmission

Pour que la transmission du virus soit efficace, il faut tout d'abord que la personne infectée présente une charge virale importante dans ses liquides biologiques et que le site d'entrée soit permissif à la transmission. Le sang, le lait maternel, les sécrétions vaginales et le sperme sont les fluides biologiques contenant le plus de particules virales. Ce sont la transmission par le sang via les utilisateurs de drogues intraveineuses et la transmission par contacts sexuels non protégés qui sont en grande partie responsables de la propagation du VIH-1.

La transmission issue des relations sexuelles est généralement facilitée par la présence d'une ITS (infection transmise sexuellement). Ces infections créent des brèches au niveau de l'épithélium des muqueuses sexuelles. Ceci est dû en partie à l'inflammation et au recrutement de cellules immunes, un phénomène qui facilite la pénétration du VIH-1 dans les tissus et qui promouvoit l'infection des cellules permissives. Cependant, même en présence d'une muqueuse intacte, le virus a tout de même la capacité de traverser la barrière épithéliale et ensuite d'infecter les cellules sous-jacentes qui y sont présentes dont les DC. La transcytose est le mécanisme qui permet au virus mais aussi à de petites molécules de passer d'un côté à l'autre de la cellule. Les autres mécanismes permettant au virus de passer de la lumière mucosale jusque dans les sous-muqueuses et les tissus périphériques sont l'infection productive des cellules épithéliales ou le passage à travers de petits interstices entre les cellules épithéliales (106, 144) (figure 8).

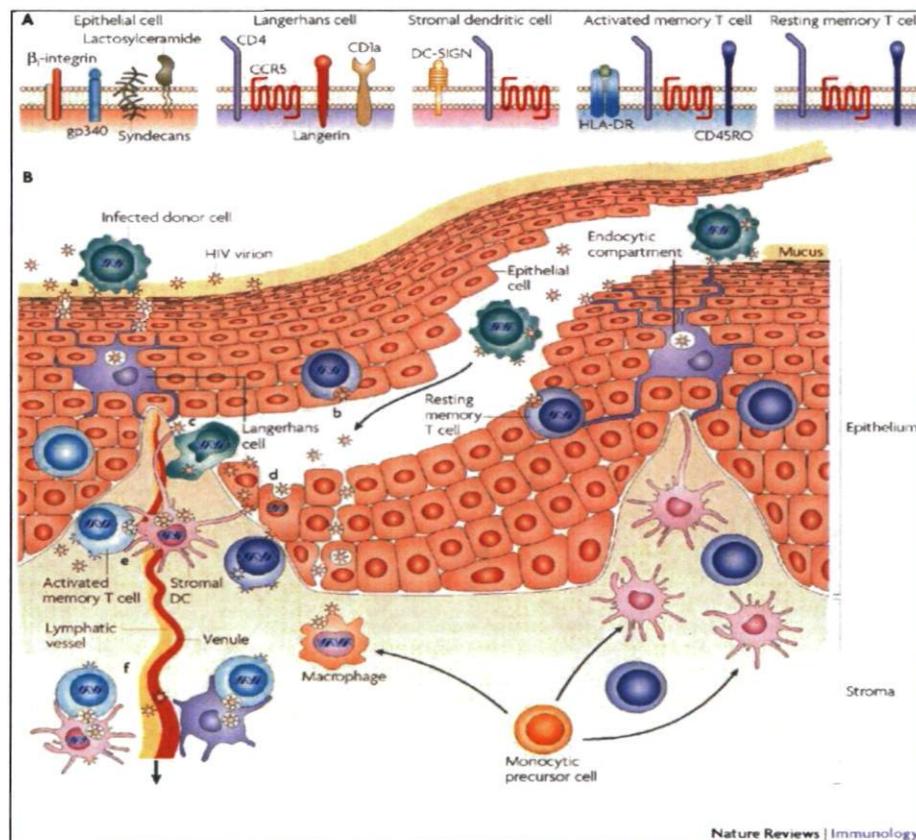


Figure 8. Transcytose du VIH-1 via la muqueuse vaginale (106).

1.5.2 La primo-infection

La primo-infection survient à la suite de la transmission. Elle dure généralement de 3 à 6 semaines et est asymptomatique chez 50% à 70% des personnes infectées (145). Les seuls symptômes répertoriés s'apparentent à ceux d'un rhume ou de la mononucléose infectieuse (146).

L'infection primaire est d'abord caractérisée par une réplication active du virus et par une déplétion massive du nombre de LyT CD4+, cellules les plus susceptibles à l'infection. Le virus infecte tout d'abord les cellules du système immunitaire environnantes au site de transmission. Par la suite, il se retrouve très vite dans les OLS où il a accès à un très grand nombre de cellules permissives à l'infection. Cela prend de 2 à 6 semaines pour que le nombre de virus atteignent son maximum (147). Par ailleurs, le système immunitaire s'active dès le début de l'infection et génère un grand nombre de cellules permissives à l'infection dont les LyT CD4+ et CD8+ spécifique contre le VIH-1. Le système immunitaire contrôle alors partiellement l'infection, ce qui provoque une diminution du nombre de particules virales en circulation.

1.5.3 La phase chronique

La primo-infection est normalement suivie d'une très longue période asymptomatique qui dure en moyenne entre 10 et 15 ans (148). Lors de cette période, il y a une production constante de particules virales mais également une activation constante du système immunitaire afin de contrôler cette production. Cela crée un équilibre entre le système immunitaire et le virus. Cependant, le nombre de particules virales produites à chaque jour augmente lentement mais constamment alors que le nombre de LyT CD4+ décline et perd du terrain graduellement. La quantité de LyT CD4+ est un bon indicateur de la progression de la maladie puisque moins il y en a, plus le virus progresse.

Lors de cette période, une forte activation du système immunitaire est aussi observée, laquelle est reconnue maintenant comme étant un bon indicateur de la progression de l'infection (149). Cette hyperactivation entraîne une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines permettant ainsi le recrutement et l'activation de cellules permissives à l'infection. La translocation microbienne, c'est-à-dire le passage de

microorganismes ou de produits microbiens de la flore commensale dans le sang et les tissus, est l'une des causes possible de cette activation incontrôlée (150). Ce thème sera davantage abordé à la section 2.6.2.

1.5.4 Le stade SIDA

Le mot SIDA est utilisé lorsque le compte de LyT CD4⁺ est de 200 cellules par mm³ de sang. L'immunité est alors à son plus faible. En conséquence, des infections opportunistes et des maladies assez rares mais caractéristiques du stade SIDA font surface telles que la pneumonie à *Pneumocystis carinii*, la tuberculose et le sarcome de Kaposi. Ces infections, absentes chez les individus en santé, sont récurrentes chez les immunosupprimés. Durant cette phase, il y a aussi une destruction des OLS, ce qui contribue à affaiblir davantage le système immunitaire. Les patients n'ayant accès à aucun traitement contre le VIH-1 mourront de ces infections opportunistes.

1.6 La défense de l'hôte face à l'infection virale

Bien que le VIH-1 soit un adversaire redoutable, le système immunitaire est tout de même capable de monter une réponse immune visant à détruire le virus et les cellules infectées. Cette réponse face à l'infection virale se divise en deux catégories : la réponse innée et la réponse acquise.

1.6.1 La réponse innée et les facteurs de restriction cellulaire

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense contre les infections virales et donc contre le VIH-1. Elle prend place dans les muqueuses et permet un premier contrôle de l'infection. La réponse innée permet également d'organiser une réponse spécifique contre les virus. La réponse innée est régulée par plusieurs acteurs importants dont les molécules du complément, les molécules antivirales (INF α/β) et les cellules phagocytaires telles que les DC, les macrophages et les neutrophiles. Ces derniers génèrent des médiateurs solubles importants (cytokines et chimiokines) afin d'inhiber la réplication virale. Certains d'entre eux sont également responsables de la mise en place de la réponse spécifique contre les infections virales. Récemment, deux protéines cellulaires ont été identifiées comme étant importantes dans le cadre d'une réponse innée contre les rétrovirus.

Il s'agit des facteurs de restriction APOBEC3G et TRIM5 α . Les facteurs de restriction sont des molécules empêchant la réplication virale et ce, par divers mécanismes. APOBEC3G (de l'anglais *apoplipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*) fait partie d'une famille d'enzyme ayant la capacité de modifier l'ARN et l'ADN et ce, en désaminant la cytosine en uracile (151, 152). Elle agit lors de la transcription inverse suite à l'infection (153). Cela provoque des mutations dans les gènes viraux mais aussi la dégradation partielle de l'ADN complémentaire dû au recrutement des enzymes dédiées à la réparation de l'ADN (152). Le VIH-1 a par contre développé une stratégie visant à contrer l'action de cette molécule. En effet, la protéine virale Vif se lie à APOBEC3G et induit son ubiquitination, un phénomène menant à sa dégradation par le protéasome (154).

TRIM5 α (de l'anglais *tripartite motif protein 5a*) a également la propriété de bloquer l'infection par le VIH-1. Il agit à différents stades lors du cycle répliatif du virus, soit lors de la transcription virale et lors de l'import nucléaire (155, 156). En effet, TRIM5 α a la capacité de séquestrer la capsid virale provoquant la dégradation de cette dernière via le protéasome. Cela empêche alors la transcription inverse. De plus, il a récemment été démontré qu'en se liant à la capsid, TRIM5 α peut également perturber le transport nucléaire en masquant les motifs de reconnaissance nécessaires à l'import nucléaire du PIC. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes exacts qui restreignent l'infection dans les cellules (152, 155).

1.6.2 La réponse acquise

La réponse acquise est une réponse spécifique contre un pathogène. Elle débute lorsque les CPA entrent en contact avec un pathogène ou un produit microbien, le dégradent et migrent aux OLS où elles présentent l'antigène aux LyT CD4⁺ quiescents, cellules régulatrices de l'immunité acquise. Les LyT CD4⁺ initieront ensuite la réponse humorale et celle à médiation cellulaire (157). À la suite du contact avec la CPA, les LyT CD4⁺ peuvent se différencier en plusieurs sous-types de cellules, soit en T effecteurs de type Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, lesquels orchestrent la réponse humorale et/ou celle à médiation cellulaire, soit en Treg, lesquels atténuent et/ou préviennent la réponse immune.

Les cellules de type Th1 sont induites en réponse aux infections intracellulaires dont les infections virales (157). Elles stimulent l'activité microbicide des cellules infectées afin

qu'elles détruisent le pathogène internalisé. Elles peuvent également activer les LyT CD8+ afin qu'ils détruisent les cellules infectées grâce à leur activité cytotoxique. En effet, le contact entre la cellule infectée et les LyT CD8+ entraîne la dégranulation de ces dernières, ce qui provoque la libération d'enzymes toxiques telles que la perforine et les granzymes (157). Les cellules infectées seront alors détruites. Les cellules Th2 vont davantage activer une réponse humorale en stimulant les lymphocytes B afin qu'ils se différencient en plasmocytes et produisent des anticorps neutralisants spécifiques aux pathogènes (157). Lors d'une infection virale, les anticorps produits lient les virus et participent à l'élimination de ces derniers de trois manières, soit en induisant la lyse par le complément, en capturant le virus et en induisant sa dégradation ou en bloquant les sites d'attachements du virus à sa cellule cible. Finalement, les cellules Th9, Th17 et Th22 sont des sous-types qui n'ont été mis en évidence que récemment (158-160). Les Th17 sont induites en réponse aux pathogènes extracellulaires (bactériens et fongiques) et sont impliquées dans l'activation des neutrophiles. Elles sont majoritairement localisées dans les muqueuses intestinales et y constituent une barrière contre les infections. Contrairement aux Th1 et Th2 qui active l'immunité acquise afin d'éliminer l'infection par le VIH-1, les Th17 sont plutôt une cible de ce virus et ont un rôle à jouer dans la pathogénèse virale. En effet, la progression de cette maladie est associée à une déplétion massive des Th17 dans le tractus gastro-intestinal et à une augmentation de la charge virale (161). L'intégrité de la barrière muco-sale est alors perdue laissant les produits microbiens de la flore commensale traverser les muqueuses (78, 162). Les Th22 et Th9 se retrouvent dans la circulation sanguine et sont recrutés respectivement au niveau de la peau et au niveau des poumons (159, 160). Pour l'instant, aucune étude n'a mis en lumière leur implication lors d'une infection par le VIH-1. Contrairement aux effecteurs mentionnés précédemment, les Treg ne vont pas activer les cellules mais bien supprimer la réponse des cellules T. Leur action est importante car elle permet d'éviter l'apparition de maladies auto-immunes, de maintenir l'homéostasie dans les régions peuplées de microorganismes commensaux, de prévenir les cancers et d'atténuer la réponse inflammatoire une fois l'infection contrôlée (163). L'infection par le VIH-1 est associée à une augmentation des Treg dans les tissus lymphoïdes et à la progression de la maladie tout comme les Th17 (164, 165). Ces cellules diminuent l'activation du système immunitaire afin de freiner la progression virale et de réduire le nombre de cellules

susceptibles à l'infection (166). Toutefois, elles finissent par promouvoir la persistance virale en inhibant la réponse immunitaire, particulièrement celle dirigée contre les virus (165, 167).

Bien que notre système immunitaire soit capable de répondre au VIH-1, il est encore aujourd'hui impossible de l'éradiquer. Les thérapies antirétrovirales actuelles permettent toutefois de contrôler la charge virale chez les individus infectés moyennant des effets secondaires indésirables.

1.7 Les traitements

C'est au milieu des années 80 que les premières drogues firent leur apparition (168, 169). Depuis, plus d'une vingtaine ont été approuvées pour le traitement contre le VIH-1. Sans toutefois guérir les individus infectés, les antirétroviraux empêchent la réplication du virus en inhibant diverses étapes du cycle viral, ce qui améliore ainsi la durée de vie des individus infectés. Ces médicaments occasionnent toutefois de nombreux effets secondaires, ce qui rend la prise de cette médication difficile à respecter par les patients.

1.7.1 Les antirétroviraux et les effets secondaires

Il existe présentement plusieurs drogues antirétrovirales. Selon leur mécanisme d'action, elles ont été classées en 4 catégories : les inhibiteurs de la protéase, les inhibiteurs de la transcriptase inverse nucléotidiques (INTI) et non-nucléotidiques (INNTI) et les inhibiteurs de la fusion. C'est en 1996 que débuta la trithérapie ou HAART (*Highly active antiretroviral therapy*), traitement donné actuellement aux personnes porteuses du VIH-1 (170). Cette thérapie est une combinaison de trois antirétroviraux provenant généralement de 2 catégories différentes. Le traitement le plus utilisé est composé de deux INTI et d'un inhibiteur de protéase ou un INNTI. La combinaison de plusieurs classes d'antirétroviraux a pour but de ralentir l'apparition de la résistance. Étant donné que le virus acquiert inévitablement des mutations, il faut occasionnellement modifier le traitement en conséquence.

Ce traitement entraîne de nombreux effets secondaires. En effet, ces médicaments sont très toxiques et peuvent causer de nombreux désordres métaboliques. Les inhibiteurs de protéase et les inhibiteurs de fusion sont de loin les plus problématiques. La première classe

altère les métabolismes du glucose et des lipides provoquant des complications très graves, notamment le diabète et l'hypercholestérolémie. La deuxième, due à son mode d'administration sous-cutané, induit la formation de nodules douloureux sous la peau, ce qui limite son utilisation à long terme. D'autres effets secondaires sont également observés suite aux traitements, notamment des problèmes d'hyperpigmentation, d'anémie et des problèmes gastro-intestinaux. Devant la toxicité des antirétroviraux ainsi que l'émergence de souches résistantes, il est important de développer de nouvelles classes de médicaments.

Dans les dernières années, de nouveaux médicaments et traitements prometteurs ont fait leur apparition. Les inhibiteurs d'entrée, en particulier l'inhibiteur du CCR5 (ex : le maraviroc et le vicriviroc), sont de nouveaux antirétroviraux utilisés en recherche clinique ces dernières années. Toutefois, une étude en phase clinique démontre déjà l'émergence de résistance à cet inhibiteur (171). L'immunothérapie est une autre avenue de traitement intéressante et prometteuse. Il est bien connu que l'infection par le VIH-1 dérègle la production de cytokines par les LyT CD4+, notamment l'IL-2 qui est responsable de leur prolifération. Cependant, aucune étude n'a pu mener à des résultats concluants, l'utilisation de l'IL-2 n'apportant aucun bénéfice particulier aux individus infectés (172). Une autre avenue intéressante est celle de la vaccination, laquelle est une mesure préventive. Cette tâche demeure toutefois très complexe. Plusieurs difficultés sont rencontrées, notamment la grande diversité de virus pouvant être présents chez une même personne (173).

1.8 Conclusion

Ce chapitre a permis de résumer les aspects biologiques essentiels à la compréhension du VIH-1. Ce pathogène astucieux a su s'adapter aux défenses de notre système immunitaire et a réussi à les contourner. Sa capacité à s'intégrer dans le génome cellulaire et à persister de façon latente dans les cellules fait de ce virus un des plus redoutables et un des plus difficiles à éradiquer. C'est pourquoi il est très important d'étudier et de comprendre les événements liés à l'infection et à l'hyperactivation du système immunitaire. Cela permettra peut-être de développer un nouveau traitement dans le futur.

Chapitre 2. Les récepteurs de l'immunité innée

L'immunité innée est très importante car elle est la première ligne de défense contre les pathogènes. Bien que non spécifique, elle est toutefois capable de contrôler les infections et permet à l'immunité acquise de se mettre en place. Cette première réponse immunitaire est orchestrée entre autres par les macrophages et les DC. Ces cellules ont la capacité de faire une distinction entre les antigènes de l'hôte, les antigènes inoffensifs de la flore commensale et les antigènes provenant de pathogènes. L'immunité innée est souvent caractérisée comme étant non spécifique puisqu'une réponse immunitaire semblable est induite, peu importe le pathogène présent à l'intérieur de l'organisme. Cependant, les molécules microbiennes sont reconnues par les PRR, récepteurs reconnaissant des structures précises exprimées par les microorganismes. Les récepteurs de type Toll, Nod et les lectines de type C sont des récepteurs de l'immunité innée se retrouvant entre autres à la surface des CPA et servant à activer ces dernières de manière à mettre l'immunité en route.

2.1 Les récepteurs de type Toll

Les récepteurs de type Toll ont d'abord été identifiés chez une mouche, la drosophile (174). En effet, une mutation au sein des gènes de ces protéines entraînait une diminution de la survie des mouches à la suite d'une infection fongique mettant ainsi en évidence leur rôle essentiel lors d'une infection (174, 175). Suivant cette découverte, plusieurs études ont démontré l'importance de ces protéines transmembranaires lors de la réponse immunitaire innée chez la drosophile mais aussi chez l'humain. L'homologue humain de ce gène fût nommé *Toll-like receptor* étant donné ses similitudes avec le récepteur Toll de la drosophile tant au niveau de sa structure que de sa fonction biologique (176). Depuis, 11 TLR ont été identifiés chez les mammifères, dont dix sont exprimés chez l'humain (177, 178).

2.1.1 Structure

Les TLR sont des protéines transmembranaires. Leurs régions extracellulaires contiennent un nombre variable de répétitions riches en leucines appelées LRR (de l'anglais *Leucine-Rich Repeat*), régions étant impliquées dans la reconnaissance directe de pathogènes. Les

motifs LRR présentent plusieurs différences d'un TLR à l'autre leur permettant de discriminer les divers ligands pouvant se retrouver dans l'environnement cellulaire. Leur région cytoplasmique présente une très grande homologie avec la région cytoplasmique du récepteur de l'IL-1 (177, 179, 180). En effet, ce dernier contient un domaine TIR (de l'anglais *Toll-IL-1 receptor*), domaine retrouvé également chez les différents TLR (figure 9).

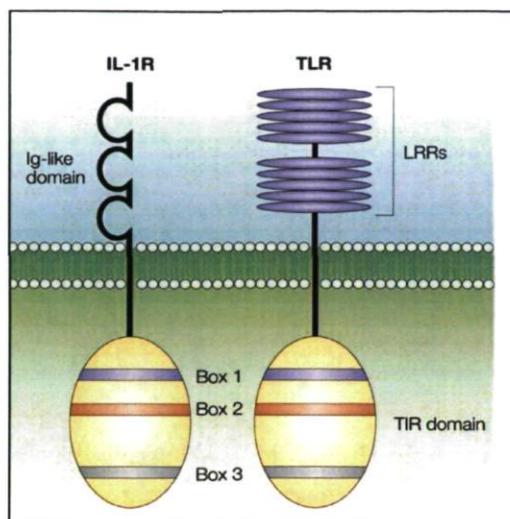


Figure 9. Structure des TLR (177).

2.1.2 Expression et ligands des TLR

Les TLR sont exprimés chez différents types de cellules. Ils sont majoritairement présents chez les cellules du système immunitaire telles que les DC plasmacytoïdes, myéloïdes et de Langerhans, les macrophages, certains sous-types de LyT et les lymphocytes B. Cependant, ils sont également présents chez les cellules épithéliales et les fibroblastes. L'expression des différents TLR et leur expression varient d'un type cellulaire à l'autre. Le niveau d'expression peut également être régulé en réponse à un pathogène ou à des cytokines provenant des cellules environnantes.

Certains TLR se retrouvent à la surface de la membrane plasmique de manière à détecter les pathogènes extracellulaires alors que d'autres sont présents à la surface de compartiments intracellulaires, les endosomes, afin de détecter les pathogènes présents à

l'intérieur de la cellule. Les TLR exprimés à la membrane cellulaire (ex : TLR1, 2, 4, 5 et 6) lient des peptides, des lipopeptides et des sucres alors que les TLR endosomaux lient les acides nucléiques (tableau 2). Les produits microbiens, appelés PAMP (*pathogens associated molecular pattern*), proviennent de divers microorganismes, que ce soit les bactéries, les virus, les parasites, les levures ou les champignons. Les PAMP sont généralement des molécules nécessaires à la survie de ces microorganismes et c'est pourquoi elles ont conservé la même structure au cours de l'évolution.

Tableau 2. Principaux ligands des TLR chez l'humain.

TLR	Ligands
TLR2/1	Triacyl lipopeptides
TLR2/6	Diacyl lipopeptides Acide lipotechoïque
TLR2	Zymosan
TLR3	ARN double brin
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS)
TLR5	Flagelline
TLR7	ARN simple brin Imidazoquinoline
TLR8	ARN simple brin
TLR9	Motifs CpG d'ADN
TLR10	Ligand inconnu

2.1.3 La signalisation issue de l'engagement des TLR

Les cascades de signalisation enclenchées lors de la liaison d'un ligand à son récepteur ainsi que leurs partenaires signalétiques divergent d'un récepteur à l'autre. Elles mènent cependant à une réponse semblable (figure 10). Les TLR peuvent engendrer deux types de réponse selon les domaines composant leur structure. Ils possèdent tous un domaine TIR, molécule se liant à un autre domaine TIR retrouvé sur les molécules adaptatrices recrutées lors de la signalisation. Les TLR peuvent recruter les facteurs MyD88 (de l'anglais *myeloid differentiation factor 88*), TIRAP (de l'anglais *TIR domain-containing adapter protein*), TRIF (de l'anglais *TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β*) et/ou TRAM (de

l'anglais *TRIF-related adapter molecule*). L'usage de ces différentes molécules adaptatrices diffère d'un TLR à l'autre, ce qui explique pourquoi les réponses cellulaires suivant l'exposition au PAMP peuvent parfois diverger (181-184).

L'activation des TLR2/1, TLR2/6 ainsi que le TLR5 enclenche une voie de signalisation impliquant MyD88/TIRAP dans le cas du TLR2/1 et du TLR2/6 et MyD88 dans le cas du TLR5. L'engagement de ces récepteurs mène à l'activation du facteur NF- κ B, qui lui, induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que la pro-IL-1 β , l'IL-6, la pro-IL-18 et le TNF- α (de l'anglais *Tumor necrosis facteur-a*) (183, 184). La stimulation du TLR4 diffère des autres TLR car elle active à la fois les facteurs MyD88/TIRAP et une autre voie de signalisation impliquant le facteur IRF3 (de l'anglais *interferon regulatory factor 3*). Cette voie entraîne la production d'interférons (IFN) de type I (IFN α/β), facteurs importants reconnus pour leur activité antimicrobienne (185, 186).

L'activation du TLR3 engendre le recrutement de TRIF alors que la molécule recrutée est la MyD88 lors de l'activation du TLR7, 8 ou 9. Leur recrutement mène par la suite à l'activation des facteurs NF- κ B et IRF-3/IRF-7 menant à une production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I (184).

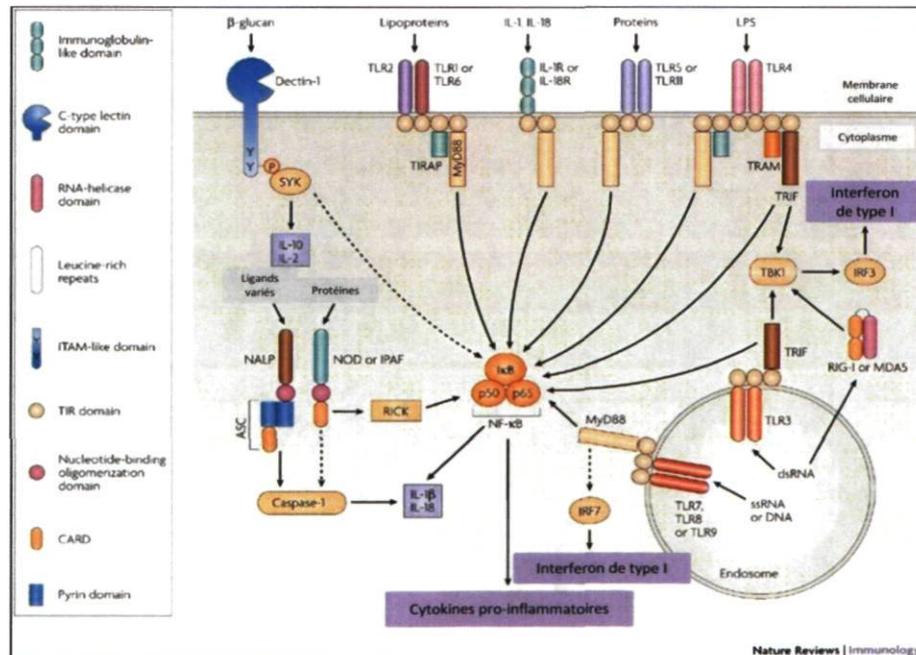


Figure 10. Signalisation via les récepteurs de l'immunité innée (187).

2.2 Les récepteurs de type NOD

La famille des NLR (*NOD-like receptors*), dont font partie les récepteurs NOD1 et NOD2, compte 22 membres chez l'humain (188). Les membres peuvent être divisés en trois sous-familles : CARD, PYR et BIR. Les récepteurs NOD1 et NOD2 furent les premiers découverts. Ils ont d'abord été identifiés comme molécules régulatrices de l'apoptose (189, 190). Leur rôle dans la réponse immunitaire innée fut élucidé par la suite (191, 192).

2.2.1 Structure

Les NLR sont des récepteurs cytoplasmiques qui comptent 3 domaines structuraux (figure 11). La partie C-terminale de la protéine possède des domaines répétés riches en leucine. Ces domaines, tout comme ceux des TLR, sont responsables de la reconnaissance et de la liaison des ligands. La partie centrale appelée NOD (de l'anglais *nucleotide-binding oligomerization domain*) joue davantage un rôle lors de l'oligomérisation du récepteur et lors de la formation de complexes protéiques avec d'autres molécules. Finalement, en N-terminal, le récepteur possède un domaine CARD ou encore des domaines PYD ou BYR (de l'anglais *caspase activation and recruitment domain*). Ces domaines permettent de recruter différentes protéines adaptatrices et d'amorcer diverses réponses selon le complexe protéique généré (183, 193, 194).

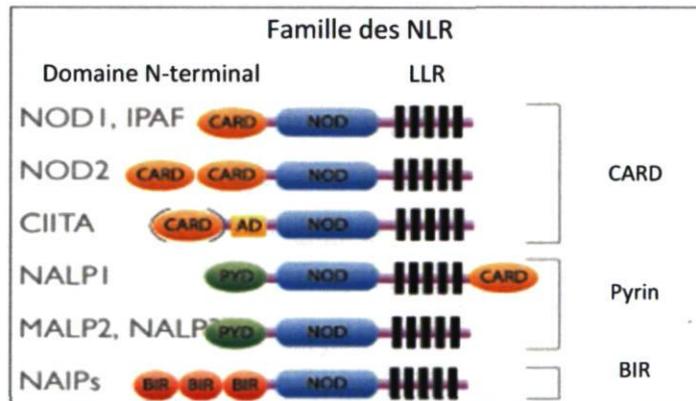


Figure 11. Membres de la famille des NLR (195).

2.2.2 Expression et ligands de NOD1 et NOD2

Chez l'humain, NOD1 et NOD2 se retrouvent dans le cytoplasme de 3 types cellulaires : les DC, les macrophages et les cellules épithéliales (190, 196). Ces récepteurs sont reconnus comme liant des peptides provenant de la dégradation du peptidoglycane, une composante de la paroi des bactéries à gram positif ou négatif. Le peptide iE-DAP (de l'anglais *γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid*) provenant des bactéries gram négatif lie le récepteur NOD1 alors que le peptide MDP (de l'anglais *muramyl dipeptide*) provenant à la fois des bactéries gram positif et négatif lie le récepteur NOD2, faisant de ce dernier un récepteur efficace contre presque toutes les bactéries (197, 198).

Très peu d'études ont été faites sur NOD1 et NOD2 chez les CPA. Cependant, des études chez les cellules épithéliales ont démontré que ces récepteurs étaient régulés à la hausse dans un contexte inflammatoire et que NOD2 pouvait également se réguler à la hausse lui-même. En effet, le gène CARD15, qui code pour la protéine NOD2, contient dans son promoteur un site liant le facteur de transcription NF- κ B. Lors de la liaison de son ligand au récepteur NOD2, il y a activation du facteur de transcription NF- κ B et donc augmentation de l'expression de NOD2 (194, 199).

2.2.3 La signalisation engendrée par l'engagement des récepteurs de type NOD

2.2.3.1 La sous-famille CARD (NOD1/2)

Tout comme les TLR, les récepteurs NOD1 et NOD2 mènent aussi à l'activation de NF- κ B. La liaison du PGN à son récepteur engendre une signalisation impliquant la kinase RIP2 (de l'anglais *receptor-interacting protein 2*). En effet, suivant l'activation de NOD1/2 par leur ligand respectif, il s'ensuit le recrutement de RIP2 ainsi que des molécules cIAP1/2 (200, 201). Ces dernières possèdent une activité ligase qui est responsable de la polyubiquitination de RIP2 (202, 203). Cette action permet alors le recrutement de TAK-1 (de l'anglais *TGF- β -activated kinase 1*) qui active la voie de NF- κ B ainsi que la voie des MAPK via son interaction avec diverses molécules.

2.2.3.2 La sous-famille PYR (NALP) et l'inflammasome

Plusieurs récepteurs des sous-familles PYR et NOD sont reconnus pour être impliqués lors de la formation d'un complexe protéique nommé inflammasome (204). C'est le cas de la

molécule NLRP3, l'inflammasome lié au NLRP3 étant le mieux caractérisé. NLRP3 peut être activé par plusieurs PAMP, DAMP (de l'anglais *danger-associated molecular pattern*), ROS (de l'anglais *reactive oxygen species*) et stress environnementaux (204). Suite à son activation par un ligand, NLRP3 recrute la molécule adaptatrice ASC qui, elle, recrute la caspase-1 afin de l'activer. L'oligomérisation de ces protéines forme l'inflammasome. Ce complexe a pour fonction de cliver les précurseurs de l'IL-1 β et de l'IL-18 afin de rendre ces deux cytokines actives (192, 204). En effet, un contexte inflammatoire induit une forte concentration de ces précurseurs cytokiniques à l'intérieur des cellules. Cependant, leur clivage et leur sécrétion sont contrôlés par l'inflammasome via l'activation de la caspase-1.

2.3 Le récepteur Dectine-1

Identifié comme récepteur pouvant lier un antigène en 2001 par Brown et Gordon (205), le récepteur dectine-1 fait partie de la grande famille des récepteurs lectines de type C (figure 12).

2.3.1 Structure

Les récepteurs de cette famille sont composés d'un ou de plusieurs domaines de reconnaissance CRD (de l'anglais *carbohydrate recognition domain*) représentant respectivement le type II ou le type I (206). Le récepteur dectine-1 est de type II puisqu'il possède un seul domaine CRD extracellulaire, lequel est lié au domaine cytoplasmique ITAM (de l'anglais *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Le domaine CRD est responsable de la reconnaissance d'un ligand alors que le domaine ITAM permet le recrutement de différentes protéines kinases et l'initiation d'une cascade de signalisation à la suite de l'engagement du récepteur (207).

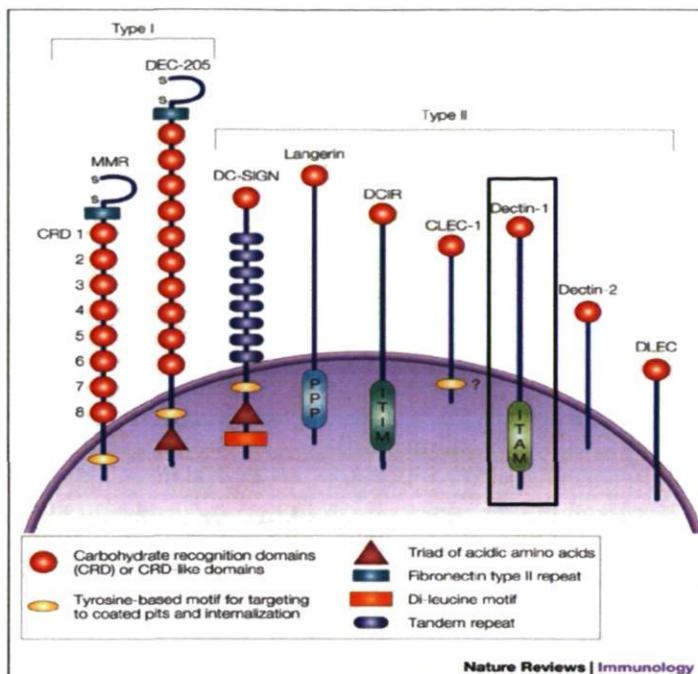


Figure 12. Membre de la famille des récepteurs lectines de type C (206).

2.3.2 Expression et ligand de dectine-1

Le récepteur dectine-1 est exprimé par différents types cellulaires dont les principaux sont les macrophages, les DC et les neutrophiles (208). À l'origine, on croyait que son rôle était d'envoyer un signal de costimulation au LyT CD4+ (209). Il a par la suite été établi que son principal ligand, le β -glucane, était une composante majeure de la paroi des levures et des champignons (207, 210). Cette molécule est également présente chez les plantes et chez certaines bactéries (207). Le β -glucane est un polysaccharide de glucose lié par des liens glycosidiques β -1,3 ou β -1,6. Dectine-1 reconnaît la partie β -1,3 de ce polysaccharide. Plusieurs études ont démontré l'importance de ce récepteur lors d'une infection fongique. En effet, des souris déficientes en récepteurs dectine-1 ont démontré une susceptibilité accrue aux infections fongiques mettant ainsi en évidence l'importance de ce récepteur lors de la réponse innée (183, 211, 212).

2.3.3 La signalisation engendrée par l'engagement de la dectine-1

Lors de l'engagement de la dectine-1, le motif ITAM présent dans sa queue cytoplasmique est phosphorylé par une tyrosine kinase de la famille des Src, ce qui entraîne le recrutement

et la phosphorylation de la protéine Syk (de l'anglais *spleen tyrosine kinase*) et de la protéine adaptatrice CARD9 (de l'anglais *caspase recruitment domain-containing protein 9*) (183, 207). Ces interactions entraînent l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B, lequel est requis afin de transcrire les gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (213) et pour la production de ROS (214). Les ROS étant très toxiques, ils peuvent causer d'importants dommages à la cellule qui les produit menant à son apoptose ou sa nécrose. Cependant, il a récemment été mis en évidence que la production des ROS joue un rôle crucial dans l'activation de l'inflammasome, ce qui lie les ROS à la réponse inflammatoire (215, 216). Finalement, l'activation de la dectine-1 peut également provoquer la phagocytose du ligand par la cellule afin d'éliminer les pathogènes de l'environnement (183).

2.4 Collaboration entre les récepteurs de l'immunité innée

Depuis quelques années, plusieurs études soulignent l'importance de la collaboration entre les différents récepteurs de l'immunité innée. Les pathogènes contiennent plusieurs composés antigéniques qui, eux, sont capables d'activer divers récepteurs simultanément. Plusieurs interactions sont possibles, notamment la collaboration entre différents TLR, entre les TLR et les NLR et entre le TLR-2 et la dectine-1. Celle-ci sera davantage détaillée dans cette section puisque le zymosan est le seul ligand utilisé dans ce projet qui soit capable de stimuler deux récepteurs simultanément.

Certaines combinaisons de TLR agissent en synergie afin d'induire une plus forte réponse inflammatoire. Cette réponse se traduit par une augmentation de la sécrétion de cytokines telles que l'IL-12, l'IL-23, l'IL-10, l'IL-6 et le TNF- α (183). Une telle collaboration a été identifiée chez les TLR suivants : TLR3 ou TLR4 avec TLR7, TLR8 ou TLR9. Le mécanisme régissant cette synergie est toutefois méconnu. Une étude a également démontrée une collaboration entre le TLR4 et le TLR7. Les auteurs ont démontré qu'en plus des cytokines mentionnées précédemment, cette combinaison de récepteurs induit une faible augmentation de la sécrétion de l'IL-1 β (217). Cette dernière est d'abord produite sous une forme inactive. C'est l'activation de l'inflammasome qui induit son clivage et ainsi la rend active. Cette combinaison de TLR pourrait donc activer l'inflammasome mais la compréhension de ce phénomène n'est encore qu'à ses débuts (183).

Quelques études se sont également intéressées à la collaboration entre les TLR et les récepteurs NOD1 et NOD2. Une combinaison des récepteurs NOD2 et du TLR4 induit une plus grande sécrétion de l'IL-6, de l'IL-12 et du TNF- α comparativement à la stimulation d'un seul des récepteurs (218). Une autre équipe a démontré que le NOD-1 agit en synergie avec les TLR2, 4, 5 et 7/8 et que la production de plusieurs cytokines (ex : TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 et GM-CSF) était significativement augmentée (219).

Le TLR2 et le récepteur dectine-1 sont connus tous les deux pour lier le zymosan, préparation de parois de levures composé majoritairement de β -glucane. Des études ont démontré que les deux récepteurs collaboraient et que leur action était synergique (212, 220, 221). L'action du zymosan induit une forte production d'IL-10, d'IL-12 et de TNF- α . En effet, des souris déficientes en dectine-1 produisent moins de TNF- α à la suite du contact avec le zymosan, et ce, malgré la présence du TLR2 (212). Un effet semblable a été démontré pour l'IL-12 (221). Le rôle des deux récepteurs demeure toutefois controversée lorsqu'il est question de l'IL-10. Alors que certaines équipes ont démontré une réduction de la sécrétion de l'IL-10 lorsque les DC sont déficientes en TLR-2 (213, 220), d'autres ont démontré une augmentation de la production d'IL-10 (222). Des différences sont à considérer dans la divergence des résultats publiés jusqu'à maintenant, notamment les divers types de cellules utilisés et les variations quant à la concentration de zymosan choisie.

2.6 Les PAMP et le VIH-1

Lors d'une infection au VIH-1, une forte concentration de produits microbiens peut se retrouver dans les tissus et le sang des individus infectés. Ce phénomène est dû en partie à leur susceptibilité aux co-infections microbiennes mais aussi à la translocation microbienne.

2.6.1 Co-infections microbiennes

Il est bien connu que les infections transmises sexuellement favorisent la transmission du VIH-1 (223). Elles permettent également la dissémination efficace du virus chez les individus séropositifs (224, 225). *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* et *Candida*

albicans sont parmi les pathogènes les plus étudiés dans le contexte de la transmission du VIH-1.

La bactérie à gram négatif *Neisseria gonorrhoeae* (GC) fait partie des pathogènes souvent associés à la transmission du VIH-1. Elle peut augmenter l'infection par le VIH-1 via différents mécanismes. Tout d'abord, il a été démontré que GC augmentait *in vitro* l'infection des DC dérivées de monocytes. En effet, l'infection par GC induit l'activation des DC via le TLR2, les rendant davantage susceptibles à l'infection (226). De plus, une autre étude a démontré que le nombre de LyT CD4⁺ dans les muqueuses endocervicales est beaucoup plus grand chez les femmes infectées par GC, amenant ainsi un plus grand nombre de cellules permissives à l'infection au site de transmission (227). GC a également la capacité d'activer la transcription du LTR du VIH-1, aidant ainsi la réplication virale (228). Plus récemment, une équipe a démontré que les LyT CD4⁺ quiescents sont plus susceptibles à l'infection par le VIH-1 lors de la présence d'une co-infection avec GC. En effet, GC active le TLR2 à la surface des LyT CD4⁺ quiescents, ce qui induit l'expression du CCR5 et du CXCR4 à leur surface. Ils ont aussi démontré que l'activation via le TLR2 augmente l'import nucléaire, étape nécessaire à la production de nouveaux virions (229).

La candidose oropharyngée est l'infection fongique la plus répandue chez les individus infectés par le VIH-1. Selon certaines études, environ 90% des individus séropositifs développeront une candidose au cours de leur maladie (230, 231). Cette infection opportuniste, causée par *Candida albicans*, peut survenir à toutes les étapes de la pathogénèse du VIH-1. Plusieurs études ont démontré une interaction entre le VIH-1 et *Candida albicans*, menant à une augmentation de l'infection des deux microorganismes (232). La candidose permet la transmission plus efficace du VIH-1, alors que l'infection au VIH-1 favorise la candidose en diminuant la réponse immunitaire (233). En effet, cette dernière cause de nombreuses lésions dans les muqueuses buccales, en plus de provoquer leur inflammation. Cela permet au VIH-1 de passer plus facilement la barrière épithéliale en plus d'infecter les cellules du système immunitaire qui y sont recrutées. En plus de réduire l'immunité, le virus peut également interagir directement avec *Candida albicans*. En effet, le VIH-1 peut lier le microorganisme, ce qui mène à une production plus forte des facteurs de virulence par ce dernier, favorisant ainsi la progression de cette maladie (234).

Une autre maladie souvent associée à la transmission du VIH-1 est la chlamydie causée par le microorganisme *Chlamydia trachomatis*. En effet, il a été démontré que les hommes co-infectés possédaient une charge virale 5 fois plus élevée dans leur sperme que les hommes ne présentant aucune ITS (235) augmentant ainsi la probabilité de transmettre le virus.

En plus d'augmenter la transmission et l'infectivité virale, les co-infections libèrent des produits microbiens dans le sang et les tissus des individus séropositifs. Ceci contribue à l'hyperactivation du système immunitaire, tout comme la translocation microbienne, permettant ainsi au VIH-1 d'infecter un plus grand nombre de cellules.

2.6.2 La translocation microbienne

La translocation microbienne est un phénomène qui a récemment été mis en évidence chez les personnes infectées par le VIH-1 (150). Ce phénomène se définit comme étant le passage de produits microbiens dans le sang et les tissus périphériques, et a d'ailleurs été quantifié par Brenchley et ses collaborateurs. En effet, ils ont démontré que les patients séropositifs en phase chronique présentaient une concentration sanguine en LPS significativement plus élevée que les personnes séronégatives (150). Chez les patients en phase chronique, il est fort probable que l'on retrouve divers produits microbiens dans le sang et les tissus bien que seul le LPS ait été identifié et quantifié jusqu'à maintenant. Ces produits microbiens proviennent de la flore commensale de l'individu infecté. Ce passage serait dû en partie à la perturbation de la barrière épithéliale de la muqueuse au niveau du tractus gastro-intestinal.

Cependant le mécanisme responsable de cette perméabilité demeure méconnu (236). Plusieurs hypothèses ont cependant été soulevées. Parmi celles-ci, il y a l'action directe du VIH-1 sur les cellules épithéliales des muqueuses. En effet, le virus induit la production de cytokines pro-inflammatoires affectant ainsi l'intégrité de la barrière épithéliale (236). Une autre cause de cette perméabilité est la déplétion massive des LyT CD4+ dans les muqueuses intestinales provoquant ainsi une perte de l'immunité mucosale. Cette perte provoque la prolifération excessive des microorganismes commensaux (150). La forte présence des PAMP entraîne une maturation et une activation des cellules immunes les

rendant plus susceptibles à l'infection ou plus aptes à capturer et à transférer le VIH-1. Bien que les connaissances concernant la translocation microbienne augmentent, il reste cependant beaucoup de travail à faire afin de déterminer son effet réel sur l'infection et la pathogénèse du VIH-1.

2.7 La maturation des cellules dendritiques et le transfert viral aux lymphocytes T CD4+ quiescents

Bien que les TLR, les NLR et la dectine-1 puissent se retrouver chez plusieurs types de cellules, leur présence chez les DC est primordiale puisque, une fois liés à leur ligand respectif, ils déclenchent une cascade de signalisation qui mettra en marche la maturation de la DC afin qu'elle puisse amorcer l'immunité adaptative.

2.7.1 Maturation de la cellule dendritique

Les DC sont parmi les premières à rencontrer les pathogènes lors d'une infection. Elles sont des sentinelles patrouillant les muqueuses et les tissus. Selon leur stade de maturation, elles accomplissent des fonctions distinctes et diffèrent également par leur localisation, leur morphologie, l'expression de leurs marqueurs de surface et le type de cytokines qu'elles sécrètent. Plusieurs études récentes ont aussi démontré des stades intermédiaires lors de la maturation des DC.

2.7.1.1 Les cellules dendritiques immatures

Les DC immatures myéloïdes sont localisées dans les tissus et les muqueuses. Elles ont pour fonction principale l'endocytose des pathogènes rencontrés afin de les apprêter et de procéder à la présentation antigénique. Elles ont également la capacité de lier des produits microbiens par l'intermédiaire de différents récepteurs afin d'activer l'immunité adaptative tel que mentionné à la section 1.3.2. Elles sont caractérisées par des marqueurs spécifiques. En effet, les DC immatures possèdent, selon l'endroit où elles résident, plusieurs récepteurs de chimiokines à leur surface, tels que le CCR1, le CCR2, le CCR5, le CCR7, le CXCR3 et le CXCR4 (93, 237). DC-SIGN et DCIR sont parmi les récepteurs qui leur sont spécifiques (80, 103). Elles présentent également une faible quantité des CMH de classe I et II, ainsi que des molécules de costimulation CD80 et CD86.

2.7.1.2 Les cellules dendritiques matures

À la suite du contact avec un pathogène, le processus de maturation débute. Celui-ci est caractérisé par un changement d'expression des marqueurs de surface. En effet, certains marqueurs tels que le DC-SIGN, le DCIR et le CCR5 diminuent et font place à de fortes concentrations des molécules de CMH-I et CMH-II, des molécules de costimulation B7,1 et B7,2, du récepteur de chimiokine CCR7, ainsi que des molécules d'adhésion ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3. Il y a également une augmentation du CD83, une molécule spécifique des DC matures (238). Cette molécule jouerait un rôle lors de l'activation des LyT et des lymphocytes B bien que cette hypothèse demeure controversée (239). La maturation complète est atteinte en présence d'une forte concentration de PAMP et/ou DAMP ainsi que de cytokines stimulant les récepteurs à la surface des DC. Ces dernières ont alors la capacité d'induire une réponse immunitaire adaptative en migrant jusqu'aux ganglions lymphatiques et en activant ainsi les LyT CD4⁺ naïfs.

Des études récentes ont toutefois décrit des profils intermédiaires de maturation. Ce stade surviendrait en présence d'une concentration plus faible de PAMP et de cytokines (240-242). Le phénotype semi-mature est obtenu soit en présence d'une faible concentration de ligands du TLR2 ou du TLR4 combinée à de l'IL-6 (DC^{IL-6}), soit en présence de TNF- α (DC^{TNF- α}) dans l'environnement de la DC. Dans chacun des cas, l'expression des cytokines pro-inflammatoires est très faible, ce qui les différencie des DC matures (241). Chez les DC^{TNF- α} , les molécules de costimulation CD80 et CD86, le CCR7 et les molécules de CMH-II sont exprimées en plus forte quantité (243) alors que chez les DC^{IL-6}, seul le CMH-II est élevé (241). Ce phénotype semi-mature aurait un rôle à jouer dans le maintien de l'homéostasie intestinale ainsi que dans le contrôle des maladies auto-immunes. En effet, leur action permet de générer des LyT CD4⁺ anergiques et des Treg.

2.7.2 Transfert du VIH-1 aux LyT CD4⁺

L'origine et la concentration des stimuli, l'état de maturation de la DC ainsi que la souche virale sont parmi les facteurs influençant l'efficacité avec laquelle une mDC capture et transfère le VIH-1 aux LyT CD4⁺. Plusieurs études ont démontré l'effet de certaines stimulations TLR sur le transfert du VIH-1 aux LyT CD4⁺ activés. Ces études ont majoritairement utilisées le VIH-1 de tropisme R5, car il est bien connu que les DC

immatures sont plus susceptibles à une infection productive avec cette souche puisque le niveau de CCR5 à leur surface est plus élevé que celui de CXCR4 (244, 245). Plusieurs études ont également démontré que la maturation de la DC la rend moins susceptible à l'infection, ce qui s'explique en partie par une diminution du CCR5 résultant de la maturation (88, 246).

Tel que mentionné à la section 2.1.3, l'engagement d'un TLR peut engendrer des cascades de signalisation différentes menant à la maturation des DC. Le niveau de maturation de la DC dépend à la fois du stimulus rencontré mais aussi de la durée de l'exposition à ce dernier. La stimulation à court terme de la DC a des effets différents de la stimulation à long terme. Il a été démontré dans notre laboratoire qu'une stimulation de 2 heures avec les ligands du TLR2 ou celui du TLR4 induisent des effets contraires. En effet, l'engagement du TLR2 augmente le transfert du VIH-1 de tropisme R5 aux LyT CD4⁺ activés, et ce, en rendant les DC plus susceptibles à une infection productive. Contrairement au TLR2, la stimulation du TLR4 provoque une diminution de l'infection des DC et du transfert viral. Ce phénomène est dû en grande partie à la production et à la sécrétion de l'IFN de type I qui inhibe l'action du virus et prévient les étapes précoces du cycle viral (247).

La maturation à long terme de la DC induit des changements plus marqués, tant au niveau physiologique qu'au niveau de l'expression des marqueurs et de la quantité de cytokines sécrétées. Bien que la maturation prolongée diminue sa capacité à être infectée, la DC a tout de même la capacité d'augmenter le transfert précoce aux LyT CD4⁺ activés (88, 248-250). Une étude a d'abord démontré l'influence d'une stimulation du TLR4 par le LPS et du TLR3 par le poly I:C sur la transmission du VIH-1 (X4) aux LyT CD4⁺ activés (248). À la suite d'une stimulation de 48 heures avec les stimuli, cette équipe a observé une augmentation significative de la transmission virale.

Une autre équipe s'est par la suite intéressée au transfert précoce et tardif du VIH-1 de tropisme R5 (246). Ils ont démontré qu'une stimulation de 12 heures avec le LPS bloque l'infection productive de la DC. Ils ont découvert que les événements de transcription inverse et l'expression des gènes viraux sont restreints chez les DC matures ayant subi un traitement par le LPS. Cependant, cette stimulation augmentait fortement le transfert précoce aux LyT CD4⁺ de la lignée cellulaire HuT/CCR5.

De plus, une autre équipe s'est intéressée à l'effet de plusieurs stimulations des TLR et des récepteurs NOD1 et NOD2 sur l'infection des DC par le VIH-1 de tropisme R5 (251). Leurs résultats démontrent une inhibition partielle de l'infection des DC suivant une stimulation du TLR2 ou de NOD2 et une inhibition accrue de l'infection à la suite de la stimulation du TLR3. Cet effet serait dû en partie à une diminution de l'expression des récepteurs CCR5 et DC-SIGN provoquée par la maturation. Une autre équipe s'est par contre intéressée à la susceptibilité des DC à l'infection par le virus de tropisme X4 à la suite d'une stimulation du TLR2 par *Neisseria gonorrhoeae*. En effet, suivant une stimulation de 48 heures avec le microorganisme, ils ont démontré que l'infection productive de la DC était augmentée et que c'était dû à une augmentation de la réplication suivant l'entrée du virus (226).

Bien que les LyT CD4+ activés soient infectés préférentiellement par le VIH-1, les LyT CD4+ quiescents sont une cible importante au niveau des OLS. Une équipe s'est d'ailleurs intéressée en 2008 à l'importance des LyT CD4+ quiescents. Ils ont démontré qu'un contact entre les DC et les LyT CD4+ quiescents était crucial pour que la réplication virale soit efficace chez ces derniers (252). En effet, le contact avec la DC permet au LyT CD4+ quiescent d'être activé, ce qui lève les restrictions cellulaires à l'infection virale tout en induisant l'expression du CCR5.

2.5 Conclusion

Plusieurs études ont démontré l'importance de la stimulation des récepteurs de l'immunité innée dans la pathogénèse du VIH-1. Une telle stimulation a la capacité de rendre les DC plus ou moins susceptibles à l'infection et peut également influencer le transfert du virus des DC aux LyT CD4+. Cependant, plusieurs points restent encore à éclaircir puisque les études réalisées se sont très peu intéressées au transfert du VIH-1 aux LyT CD4+ quiescents, lesquels représentent pourtant la population prédominante au niveau des OLS. Ils interagissent alors avec les DC matures afin de reconnaître l'antigène et d'activer une réponse immunitaire spécifique. De plus, ces études semblent ignorer l'importance que peut susciter l'étude du VIH-1 de tropisme X4, puisque ce dernier est présent dans une phase plus tardive de la pathogénèse. C'est donc en considérant ces différents résultats que nous avons décidé d'approfondir certains points sur ce sujet.

Chapitre 3. Hypothèses et objectifs de recherche

Les co-infections microbiennes ainsi que la translocation microbienne sont deux problèmes majeurs associés à la pathogénèse du VIH-1. Cela entraîne l'accumulation de PAMP dans le sang et les tissus. Ce phénomène provoque la maturation des DC, suivie de leur migration en plus grande quantité vers les ganglions lymphatiques. Les DC matures rencontrent alors les LyT CD4⁺ quiescents afin de les activer et de mettre en place une réponse immunitaire spécifique. La maturation des DC est par contre une excellente porte d'entrée pour le VIH-1 puisqu'elle le mène jusqu'aux ganglions où il pourra infecter beaucoup plus de LyT CD4⁺. De plus, la formation de la synapse immunologique entre la DC et le LyT CD4⁺ facilite grandement la dissémination du virus d'une cellule à l'autre.

Lors de l'initiation de ce projet, plusieurs études avaient été faites sur ce sujet, soit le transfert du VIH-1 des DC stimulées par différents PAMP aux LyT CD4⁺ activés. Cependant, ces études portaient principalement sur l'impact que pouvait avoir une stimulation via les TLR2, 3 ou 4 sur le transfert du VIH-1 de tropisme R5.

Étant donné qu'il faut une stimulation de longue durée pour induire une augmentation accrue des marqueurs de maturation de la DC les menant ainsi aux ganglions lymphatiques, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une stimulation prolongée de la DC via une variété de récepteurs, notamment les TLR, le NOD-2 et la dectine-1. Nous avons également voulu étudier le transfert du VIH-1 de tropisme R5 mais aussi X4 puisque la maturation des DC induit l'expression du CXCR4 et qu'il est possible que l'infection et le transfert du VIH-1 soient par la suite amplifiés. Et finalement, nous nous sommes intéressés au transfert du VIH-1 aux LyT CD4⁺ quiescents, cellules retrouvées en abondance dans les OLS. De plus, ce type cellulaire répliquant peu le VIH-1, l'activation engendrée par leur rencontre avec les DC matures pourraient augmenter leur susceptibilité à l'infection.

L'hypothèse à vérifier était la suivante :

- La maturation induite par l'exposition des DC immatures à différents PAMP peut moduler de diverses façons le transfert du VIH-1 (de tropisme R5 et X4) aux LyT CD4+ quiescents

Les objectifs spécifiques étaient les suivants :

- Déterminer si la maturation des DC induite par différents PAMP module le transfert viral précoce et tardif.
- Déterminer si la maturation des DC induite par différents PAMP module l'infection de ces dernières.
- Investiguer si la maturation des DC induite par différents PAMP régule l'expression du CXCR4 et module différemment les transcrits de cytokines différent.

Chapitre 4. Matériels et méthodes

4.1 Culture cellulaire

4.1.1 Culture des lignées cellulaires 293T et TZM-bl

La lignée de cellules 293T (cellules embryonnaires de rein humain) et la lignée cellulaire TZM-bl (cellules HeLa modifiées) ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen, Burlington, ON) auquel a été ajouté de la pénicilline-streptomycine (100U/mL, Invitrogen, Burlington, ON), et du sérum fœtal bovin (FBS) 10% inactivé par la chaleur (Wisent, St-Bruno, QC). Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère 5% de CO₂.

4.1.2 Isolement, différenciation et culture des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4+ quiescents

Les PBMC (de l'anglais *peripheral blood mononuclear cells*), issus du sang périphérique de donneurs anonymes séronégatifs, ont été isolés à partir d'un gradient de FICOLL (*Lymphocyte Separation Medium*, Wisent, St-Bruno, Qc). L'utilisation d'anticorps et de billes magnétiques ont permis par la suite de faire une sélection positive suivi d'une sélection négative de manière à récolter respectivement les monocytes CD14+ et les LyT CD4+ quiescents provenant du même donneur (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC). Les monocytes (1×10^6 c/mL dans 3 mL) et les LyT CD4+ quiescents (2×10^6 c/mL) ont été mis en culture dans un milieu RPMI-1640 (Wisent, St-Bruno, QC) contenant de la pénicilline-streptomycine (100U/mL, Invitrogen, Burlington, ON), de la primocine (100U/mL, Invivogen, San Diego, CA) et du sérum fœtal bovin (FBS, Wisent, St-Bruno, QC) 10% inactivé par la chaleur. Du GM-CSF (de l'anglais *granulocyte macrophage colony stimulating factor*, 1000U/mL, Cangen Biotechnologies, Baltimore, MD) et de IL-4 recombinante humaine (200U/mL, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) ont été ajoutés aux deux jours au milieu des monocytes CD14+ afin de les différencier en DC immatures et ce pour une durée de 6 jours.

4.2 Production virale

4.2.1 Transfection au phosphate de calcium

Les particules virales ont été produites dans les cellules 293T à la suite d'une transfection au phosphate de calcium. Brièvement, les cellules 293T ont été cultivées dans un milieu complet de DMEM à une concentration de 2×10^6 cellules dans un flask de 75 cm^2 et ce pour 24 heures. La solution de transfection contenant 40 ug d'ADN, 62,5 μL de CaCl_2 2M et de l'eau stérile pour un total de 500 μL a été ajouté à 500 μL de HBS 2X (*Hepes Buffer solution*, Lonza, Allendale, NJ) pour un total de 1 mL de solution. Le tout a été déposé goutte à goutte sur les cellules 293T et mis en culture durant 16 heures. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS (de l'anglais *phosphate-buffered saline*) stérile et mises dans un milieu DMEM complet pour 24 heures supplémentaires. Le surnageant contenant les particules virales a été filtré sur une membrane 0,22 μM afin d'éliminer un maximum de débris cellulaire. La production virale a été ensuite aliquotée et conservée à -80°C . Les plasmides pNL4.3wt (253) et pNL4.3balenv (254), contenant le génome virale du VIH-1 sont utilisés afin d'obtenir respectivement des virus de tropisme X4 et R5.

4.2.2 Dosage de la production virale

La production virale a été dosée par ELISA sandwich (de l'anglais *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) contre la protéine de la capsid du virus, la p24. L'anticorps 183-H12-5C (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*, Germantown, MD), spécifique contre la protéine virale p24, a été déposée dans une plaque 96 puits afin d'y adhérer. La plaque a été incubée à 4°C pour 24 heures. Les sites inoccupés au fond de la plaque ont ensuite été bloqués avec une solution PBST-BSA (PBS 1X; Tween-20 0,05% (Fisher, Ottawa, ON); 1% BSA (de l'anglais *Bovine Serum Albumine Fraction V fatty Acid Poor*, MP BIomed, Solon, OH)) afin d'éviter l'interaction de la plaque avec d'autres anticorps du protocole. Après à 3 lavages avec une solution de PBST (PBS 1X et Tween-20 0,05%), différentes concentrations connues de la protéine p24 ont été déposées dans les puits afin de produire une courbe standard. Les échantillons à analyser y ont été également ajoutés et lysés à l'aide d'un tampon à cet effet (PBS 1X; Tween-20 0,02%; Triton X-100 0,5% (Sigma, Oakville, ON); thiomersal 0,004%). La plaque a été incubée sous agitation à température ambiante pour 1 heure. Après les lavages, l'anticorps biotinylé 30-90-25 (*NIH*

AIDS Research and Reference Reagent Program, Germantown, MD) spécifique contre la p24 a été ajouté et le tout a été incubé à température ambiante pour 1 heure. Après 3 lavages, l'enzyme HRP (*horseradish peroxidase*) couplée à la streptavidine (*poly-HRP40-streptavidin* (dilution 1/15000 μ L), Fitzgerald, Concord, MA) a été ajouté durant 30 minutes à température pièce. La plaque a ensuite été lavée et le substrat TMB-S (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine *TMB ELISA substrate*, Fitzgerald, Concord, MA) a été ajouté. La réaction a été arrêtée 2 minutes plus tard avec du H₃PO₄ (0,5M). L'absorbance des puits a été mesurée à une longueur d'onde de 450 nm (longueur d'onde de référence à 690 nm) avec un spectrophotomètre (*Biotech EL 808*) afin de déterminer la concentration de p24 dans les puits.

4.2.3 Test d'infectivité de la production virale

La lignée cellulaire TZM-bl a été utilisée pour cette expérience. Les cellules de cette lignée ont été modifiées pour exprimer à leur surface le récepteur CD4, le CCR5 et le CXCR4. Elles contiennent en plus une copie de la région LTR du génome du VIH-1 associée aux gènes codant pour la luciférase et la β -galactosidase. La région LTR est sous le contrôle de la protéine Tat qui est synthétisée uniquement lors de l'infection. Les cellules (10000 c/puits) ont été mises une heure en présence de 10 ng virus/ 100000 cellules et gardé en culture 48h. Elles ont par la suite été lysées avec un tampon de lyse luciférase (25 mM Tris-base; 2 mM DTT; Triton X-100 1%; glycérol 10 %; pH=7,8). La quantification de l'activité luciférase a été mesurée avec un luminomètre de marque Dynex MLX et une solution de tampon luciférase (20 mM tricine; 1,07 mM (MgCO₃)₄-Mg(OH)₂-5H₂O; 0,1 M EDTA; 220mM Coenzyme A; 4,70 mM D-luciférine; 530 mM ATP; 33,3 mM DTT).

4.3 Maturation des cellules dendritiques

Les DC immatures ont été stimulées avec les ligands présentés au tableau 3 et ce durant 4 heures afin de quantifier les transcrits de cytokines ou durant 72 heures afin de quantifier les marqueurs de surface.

4.3.1 Analyse des transcrits de cytokines

Les iDC (1×10^6 cellules/puits) ont été stimulées ou non durant 4 heures avec les ligands et les concentrations spécifiés au tableau 3.

Tableau 3. Ligands (Invivogen, San Diego, CA) utilisés pour les expériences de maturation, d'infection et de transfert.

Produits	Récepteur	Concentration
Pam3CSK4	TLR 2/1	1 $\mu\text{g/mL}$
LTA	TLR 2/6	5 $\mu\text{g/mL}$
LPS	TLR 4	10 $\eta\text{g/mL}$
Flagelline	TLR 5	5 $\mu\text{g/mL}$
Zymosan	TLR2 et dectine-1	5 $\mu\text{g/mL}$
PGN-SAndi	NOD-2	1 $\mu\text{g/mL}$
Poly I:C	TLR-3	1 $\mu\text{g/mL}$
Depleted-zymosan	Dectine-1	5 $\mu\text{g/mL}$

Les cellules ont été lysées dans du TRIZOL et l'extraction de l'ARN a été faite à partir des directives du protocole d'extraction au phénol-chloroforme (TRIZOL, Invitrogen, Burlington, ON). Par la suite, le kit DNA-turbo free (Ambion, Austin, TX) a été utilisé afin d'éliminer les contaminations d'ADN à l'intérieur des échantillons. Une réaction de transcriptase inverse a été effectuée selon les directives du kit Superscript RT III (Invitrogen, Burlington, ON) avec 1 μg d'ARN par échantillon afin d'obtenir l'ADNc nécessaire à la réaction PCR (*polymerase chain reaction*). Par la suite, une PCR quantitative en temps réel a été effectuée à partir de 1 μL d'ADNc de la première PCR. L'ADNc a été ajouté à 12,5 μL de Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 5 μL d'amorce (2 μM) sens et anti-sens de la cible à analyser (tableau 4) et d'eau DEPC (*diethyl pyrocarbonate*, Ambion, Austin, TX) stérile pour un total de 25 μL de réaction. La quantification a été faite à l'aide du 7500 *real-time PCR* de la compagnie Applied Biosystem. Chaque résultat obtenu a été normalisé sur le PCR du gène 18S issu du même échantillon.

Tableau 4. Séquences d'amorce des cytokines analysées.

Cytokines	Amorce Sens	Amorce Anti-sens
IL-1β	GGA CAA GCT GAG GAA GAT GC	TCG TTA TCC CAT GTG TCG AA
IL-6	GAA AGC AGC AAA GAG GCA CT	TTT CAC CAG GCA AGT CTC CT
IL-10	TTA CCT GGA GGA GGT GAT GC	GGC CTT GCT CTT GTT TTC AC
IL12p35	GAG GCC TGT TTA CCA TTG GA	TAC TAA GGC ACA GGG CCA TC
IL12p40	AAG GAG GCG AGG TTC TAA GC	GCA GGT GAA ACG TCC AGA AT
IL-23p19	TTC TCT GCT CCC TGA TAG CC	GAC TGA GGC TTG GAA TCT GC
TGF-β	GTA CCT GAA CCC GTG TTG CT	GTA TCG CCA GGA ATT GTT GC
IFN-γ	CAG CTC TGC ATC GTT TTG GG	GTT CCA TTA TCC GCT ACA TCT GAA
18S	TAG AGG GAC AAG TGG CGT TC	CGC TAG GCC AGT CAG TGT

4.3.2 Analyse de l'expression du CXCR4 sur les cellules dendritiques

Les iDC (1×10^6 cellules/puits) ont été stimulées ou non 72 heures avec les ligands et les concentrations spécifiés au tableau 3. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS froid et décollées de la plaque en maintenant celle-ci sur la glace. Les récepteurs Fc ont été bloqués avec une solution 10% de FBS durant 15 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été mises en présence soit d'un anticorps marqué spécifique reconnaissant le CXCR4 (R-PE-tagged anti-CXCR4 clone 12G5, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), soit d'un anticorps de même isotype (IGg2a-PE, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) et ce durant 30 minutes à 4°C. Chaque échantillon a été lavé 3 fois pour ensuite être fixé au paraformaldéhyde 2%. Les résultats ont été quantifiés par FACS (Δ PC Epics XL, Beckman, Mississauga, ON) et les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FCS express.

4.4 Infection des cellules dendritiques par le VIH-1

Les iDC ont été mises en culture dans des plaques 96 puits (3×10^4 cellules/puits) et ont été stimulées ou non 24 heures avec les ligands tel que spécifié au tableau 3. Après 2 lavages avec du PBS stérile, une partie des DC pour chacun des produits microbiens ont été traitées avec de l'éfavirenz 100 nM durant 15 minutes de manière à bloquer l'infection productive

du virus. Les virus de type X4 (NL4.3wt) et R5 (NL4.3balenv) ont été ajoutés dans les puits à une concentration de 3 ng de p24 pour 30 000 cellules. Après 3 lavages afin d'éliminer les virus libres présent dans le surnageant, les DC matures ont été mises en culture dans un milieu RPMI complet et incubées à 37°C. Les surnageants ont été récoltés aux jours 3, 6 et 9 et l'infection virale a été mesurée par ELISA p24.

4.5 Transfert du VIH-1 des cellules dendritiques aux LyT CD4+ quiescents

Les iDC ont été mises en culture dans des plaques 96 puits (3×10^4 cellules/puits) et ont été stimulées ou non 24 heures avec les ligands et concentrations spécifiés au tableau 3. Après 2 lavages avec du PBS stérile, une partie des DC traitées avec chaque produit microbien ont été traitées avec de l'éfavirenz 100 nM durant 15 minutes de manière à bloquer l'infection productive du virus. Les virus de type X4 (NL4.3wt) et R5 (NL4.3balenv) ont été ajoutés dans les puits à une concentration de 3 ng de p24 pour 30 000 cellules. Les plaques ont été incubées à 37°C durant 1 heure. Trois lavages ont été effectués afin d'éliminer les virus libres dans le surnageant. Les LyT CD4+ quiescents autologues ont été ensuite ajoutés (1×10^5 cellules/puits) et la coculture a été incubée à 37°C. Le surnageant issu de la coculture a été récolté aux jours 3, 6 et 9. Le transfert viral a été quantifié par la technique d'ELISA p24.

4.6 Quantification de l'ADN viral intégré au génome cellulaire

Les iDCs (1×10^6 cellules) ont été stimulées ou non 24 heures avec les ligands et concentrations spécifiés au tableau 3. Après 2 lavages, les cellules ont été mises en présence des virus X4 et R5 durant 1 heure à 37°C. Après un second lavage, les cellules ont été mises en culture dans un milieu RPMI complet et ce pour 72 heures. Le kit d'extraction DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Mississauga, ON) a été utilisé afin d'obtenir l'ADN génomique. Une combinaison de deux PCR nous a permis de quantifier l'ADN viral intégré (255). Une première PCR a permis d'amplifier 100 ng l'ADN génomique. Les amorces communément utilisées pour ce type de PCR sont l'amorce sens *Alu* (séquence répétée du génome cellulaire) et l'amorce anti-sens M661 (séquence présente dans le génome viral) (256), ce qui permet d'amplifier uniquement l'ADN viral intégré. Par la suite, une PCR quantitative en temps réel nous a permis de quantifier l'ADN intégré. Les amorces

communément utilisées sont l'amorce sens M667 et l'amorce anti-sens AA55. Brièvement, 5 μ L de la première PCR ont été mélangé à 12,5 μ L de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, FosterCity, CA), 2,5 μ L de chaque amorce (2 μ M) et 2,5 μ L de la sonde TaqMan probe HIV-5'-carboxyfluorescein (0,3 μ M) (Biosearch Technologies, Novato, USA) pour un total de 25 μ L de réaction. L'ADN des plasmides NL4.3wt ou NL4.3/balenv a été utilisé afin d'établir la courbe standard, celle-ci allant de 469 à 30 000 copies d'ADN.

4.7 Analyse statistique

Les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel Prism version 3.03 GraphPad Software Inc. Les moyennes ont été comparées en utilisant un test ANOVA monofactoriel suivi d'une comparaison multiple de Dunnett lorsque plus de deux moyennes ont été considérées. Elles ont aussi été comparées en utilisant le test *Student*. Seules les valeurs p inférieurs à 0,05 ont été considérées comme significatives et le calcul d'erreur correspond à l'écart-moyen des valeurs (SEM).

Chapitre 5. Résultats

L'utilisation de cellules primaires dans le but de comprendre des phénomènes biologiques est souvent un atout important en recherche. Par contre, la variabilité entre les donneurs est importante et il n'est pas rare d'observer différentes tendances ce qui complique l'analyse des résultats. Il importe donc d'avoir plusieurs donneurs avant de conclure à une réponse précise. Les résultats présentés dans ce mémoire sont généralement issus de quatre donneurs. D'autres expériences ultérieures devraient bonifier l'étude présentée à ce stade-ci et éventuellement un article devrait être soumis.

Il y a plusieurs faits ou phénomènes dans cette étude que l'on doit garder en tête afin de mieux comprendre les résultats concernant l'habilité des DC à transférer le VIH aux LyT CD4+ quiescents. D'abord, il y a les différents PAMP utilisés pour activer les DC. L'action du Pam3CSK4, une lipoprotéine synthétique, et du LTA, lequel est une préparation d'acide lipoteichoïque hautement purifiée issue de *S. aureus*, se fait respectivement par l'intermédiaire d'une interaction entre le TLR1 et le TLR2 et le TLR6 et TLR2. Le zymosan, une préparation de la paroi cellulaire de *S. cerevisiae*, est non-opsonisé et il est reconnu par le TLR2 ainsi que la dectine-1. Le depleted-zymosan, une préparation de la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* traitée afin d'empêcher son interaction avec le TLR2, se lie uniquement à la dectine-1. Le PGN utilisé, une préparation de peptidoglycane issue de *S. aureus* hautement purifiée et traitée afin d'éliminer les constituants lipidiques nécessaire à son interaction avec le TLR2, active NOD-2. Le LPS employé, une préparation issue de *E. coli* traitée et purifiée afin d'éliminer son interaction avec le TLR2, stimule uniquement le TLR4. Enfin, la flagelline ultrapurifiée, isolée de *S. typhimurium*, se lie au TLR5 alors que le poly I:C, un analogue synthétique de l'ARN double brin, active le TLR3. Tout ces PAMP ont été choisis parce que les mDC expriment des niveaux appréciables de ces récepteurs et parce qu'ils sont reconnus généralement par un seul de ces récepteurs. Bien que la majorité des récepteurs détectant les motifs microbiens active une réponse inflammatoire, il est possible que le niveau d'activation des DC immatures exposées aux différents PAMP varie. L'analyse des facteurs morphologiques, phénotypiques et fonctionnels permettent généralement d'obtenir différents degrés de maturation des DC.

5.1 Analyse de l'effet des stimulations des récepteurs TLR, NOD-2 et dectine-1 sur la maturation des DC : morphologie, marqueurs phénotypiques et expression des transcrits de cytokines

L'aspect morphologique des DC stimulées par les différents PAMP se ressemble beaucoup, c'est-à-dire que les cellules sont allongées et qu'elles adhèrent dans le fond des puits. Le seul stimulus qui donne un aspect vraiment différent est le poly I:C. Les cellules stimulées via le TLR3 demeurent rondes, mais adhèrent tout de même dans le fond des puits. Ces résultats ne sont pas illustrés dans ce mémoire. La modulation des marqueurs de maturation trois jours après l'exposition des DC aux différents PAMP, comme la diminution du DC-SIGN, l'expression du CCR7 et du CD83 de même que l'augmentation des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 corrèle aussi avec les résultats morphologiques, c'est-à-dire que les DC stimulées modulent sensiblement de la même façon l'expression de leurs marqueurs de maturation, du moins ceux énumérés ci-haut (résultats issus de notre laboratoire). Par contre, les données concernant l'expression géniques des gènes codant pour différentes cytokines semblent montrer des différences quand au degré de maturation selon le récepteur stimulé.

Généralement, l'engagement d'un récepteur de l'immunité innée par son ligand entraîne une cascade de signalisation menant notamment à la production de cytokines pro-inflammatoires ou de leur précurseurs inactifs, tels que l'IL-6, le TNF- γ et la pro-IL-1 β . La liaison d'un ligand à son récepteur peut également mener à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou à la production de facteurs solubles nécessaires à la différenciation des LyT CD4⁺ tels que l'IL-12p70, l'IL-23, l'IFN γ et le TGF β . Lors de cette étude, les transcrits codant pour les cytokines suivantes ont été ciblés : la pro-IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12p40 (sous-unité présente à la fois dans l'IL-12p70 et l'IL-23), l'IL-23p19, l'IFN- γ , l'IL-10 et le TGF- β . Malheureusement, les conditions utilisées jusqu'à maintenant pour détecter l'IL-12p35 (deuxième sous-unité présente dans l'IL-12p70) n'ont pas permis de quantifier adéquatement ce transcrit, c'est pourquoi aucune donnée est présentée.

Les résultats illustrés dans ce mémoire ne représentent qu'un seul donneur. Nous en sommes donc à une étape préliminaire. Les transcrits, issus des DC, ont été mesurés à la suite d'une stimulation de 4 heures avec les différents PAMP. Certaines expériences ont été

faites en quantifiant les transcrits après une stimulation de 8 heures ou de 24 heures. Par contre, l'expression s'est révélée très faible c'est pourquoi seul le temps de 4 heures a été conservé. L'objectif primaire de cette expérience était de comparer les différents ligands sélectionnés entre eux et de voir s'ils induisaient bien des profils inflammatoires. Il était également de déterminer si chaque profil pouvait moduler différemment le transfert du VIH-1 des DC aux LyT CD4+ quiescents.

Tout d'abord, les résultats issus du PCR en temps réelle montre que le LPS, la flagelline et le poly I:C, ligands respectifs des TLR4, le TLR5 et le TLR3, semblent induire beaucoup plus de transcrits codant pour la pro-IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12p40, l'IL-23p19 et l'IFN γ que les autres ligands. L'expression des transcrits de la pro-IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12p40 et IFN γ est supérieure à celle des DC immatures (contrôle) avec des augmentations respectives de 169X/141X/286X/208X pour le LPS, de 93X/60X/207X/24X pour la flagelline et de 12X/32X/245X/141X pour le poly I:C. Les augmentations du transcrit codant pour l'IL-23p19 sont moins importantes et sont 46X pour le LPS, 16X pour la flagelline et 5X pour le poly I:C supérieures au contrôle (figure 13).

Bien que l'augmentation soit moins grande pour les autres PAMP, ils semblent tout de même induire des profils intermédiaires comparé aux DC immatures et aux DC traitées par le LPS, la flagelline ou le poly I:C. Le Pam3CSK4 et le LTA, le zymosan et le PGN, stimulant respectivement le TLR2/1, le TLR2/6, le TLR2 et la dectine-1 et NOD2, induisent une plus forte expression des transcrits codant pour la pro-IL-1 β et l'IL-12p40 avec des augmentations respectives de 10X/30X, de 34X/23X, de 28X/69X et de 37X/23X. Peu de variations ont été observés concernant l'induction des transcrits codant pour l'IL-6 et l'IL-23p19. L'augmentation moyenne se situe autour de 5X comparée au contrôle, les DC immatures.

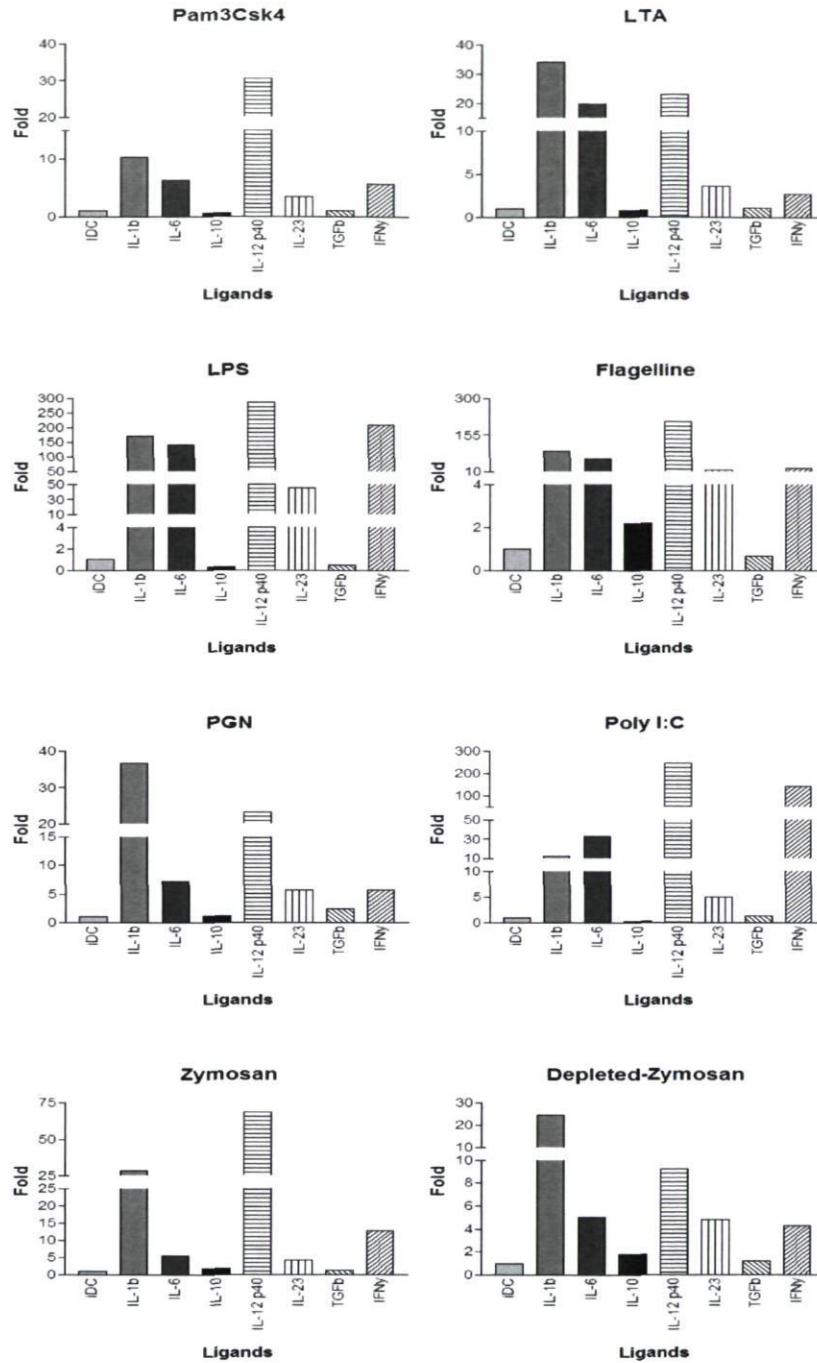


Figure 13. Expression des transcrits de cytokines induits par les différents PAMP.

Les DC immatures (1×10^6 cellules/puits) ont été stimulées ou non 4 heures avec les ligands et concentrations spécifiés au tableau 3. Les cellules ont été lysées dans du TRIZOL pour procéder à l'extraction de l'ARN. Par la suite, un traitement à la DNase permit d'éliminer les contaminations d'ADN à l'intérieur des échantillons. Une réaction de transcription inverse a été effectuée suivi d'une PCR quantitative en temps réel. Chaque résultat obtenu a été normalisé sur le PCR du gène 18S du même échantillon. Chaque graphique représente les résultats obtenus pour 1 donneur.

Le depleted-zymosan, qui lie la dectine-1, est le ligand qui induit l'expression de transcrits la moins importante. Bien que l'expression du transcrit codant pour la pro-IL-1 β soit comparable aux ligands du TLR2 et de NOD2, soit de 24X, les résultats démontrent une augmentation plus faible pour les autres cytokines, soit en moyenne 5X pour l'IL-6 et l'IL-23p19, de 9X pour l'IL-12p40 et 4X pour l'IFN γ (figure 13). Finalement, dans tous les cas, l'induction de cytokines anti-inflammatoires, soit l'IL-10 et le TGF- β , est très faible. En effet, il est bien connu que les PAMP induisent une activité inflammatoire à la suite du contact avec les DC (81, 241, 257).

5.2 Analyse de l'effet des stimulations des récepteurs TLR, NOD-2 et dectine-1 sur le transfert du VIH-1

Le transfert du VIH de tropisme R5 aux LyT CD4⁺ activés via les DC immatures ou encore maturées par une exposition au LPS, au Pam3CSK4 ou au poly I:C, est un phénomène bien caractérisé dans la littérature. Il y a par contre très peu de données quant à l'habilité des DC maturées par différents PAMP à transférer les virus de tropisme X4 et/ou R5 aux LyT CD4⁺ quiescents, lesquels se retrouvent en abondance dans les OLS. Par ailleurs, puisque nos résultats précédents montrent que le profil de maturation varie à la suite de l'exposition aux différents PAMP, nous avons voulu investiguer si l'intensité de maturation avait un lien avec la capacité des DC à capturer et à transférer le VIH-1 aux LyT CD4⁺ quiescents et à rendre ces derniers susceptibles à l'infection virale.

5.2.1 Cinétique de transfert du virus de tropisme X4

En général, une infection productive se traduit par une augmentation de la réplication et de la quantité de virus dans le surnageant des cellules infectées au cours du temps. La cinétique d'infection diffère selon la susceptibilité des cellules à la réplication virale. Ainsi, le pic d'infection des LyT CD4⁺ activés se situe généralement autour du jour 6 alors que celui des LyT quiescentes est plus tardif soit aux jours 9 ou 12. Évidemment, la cinétique peut varier si au cours du temps les cellules sont activées et expriment les facteurs nécessaires à l'infection.

L'habileté des DC maturées ou non par les différents ligands à transférer le VIH-1 de tropisme X4 aux LyT CD4⁺ quiescents a tout d'abord été investigué. La cinétique de transfert **d'un des donneurs**, représentatif des autres, est présentée à la figure 14. Ces panneaux **représentent à la fois le transfert tardif et précoce** puisqu'aucun inhibiteur de la réplication virale n'a été ajouté aux DC (lignes rouge et noire). Nous avons d'abord observé que le ligand du TLR2/1, le Pam3CSK4, et le ligand du TLR2 et de la dectine-1, le zymosan, présentaient des cinétiques semblables. En effet, la quantité de p24 est beaucoup plus élevée lorsque les DC ont été préalablement stimulées avec les agonistes (ligne rouge) par rapport aux DC non traitées, notre contrôle (ligne noire). Tous les donneurs répondent de la même façon pour ce qui est de ces stimuli. Par contre, les résultats issus des DC stimulées par le LTA (TLR2/6), le LPS (TLR4) et le PGN (NOD2) présentent quant à eux des profils divergents entre les différents donneurs. Deux des quatre donneurs présentent une cinétique significativement plus élevée que les DC immatures (figure 14) alors que les deux autres ont une quantité de p24 avoisinant celle de notre contrôle. L'utilisation de PAMP fraîchement décongelés ou conservés à 4°C semble expliquer la divergence observé dans nos résultats. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer l'effet réel de ces PAMP en utilisant des produits fraîchement décongelés.

Bien que les résultats illustrés à la figure 14 concernant le depleted-zymosan (dectine-1) montrent une forte diminution du transfert après à la stimulation, les trois autres donneurs réalisés ont montré peu de différence sur le transfert. Puisque la ligne correspondant à l'ajout de l'efv, une drogue antirétrovirale, suit parfaitement la courbe des données sans efv, il est probable qu'il y ait eu une erreur lors de l'expérience présenté à la figure 14. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer l'effet réel de ce ligand sur le transfert.

Finalement, alors que la flagelline (TLR5) ne semble pas moduler le transfert, et ce pour tous les donneurs, le poly I:C (TLR3) diminue la capacité des DC à transférer le VIH-1 de tropisme X4 aux LyT CD4⁺ quiescents. En effet, la quantité de p24 dans le surnageant de la coculture diminue tout au long de la cinétique qui s'étant jusqu'au jour 9. La troisième courbe illustrée sur les panneaux représente les DC préalablement stimulées avec les ligands et ayant reçu un traitement à l'éfavirenz (EFV) (ligne bleue). Cette drogue

antirétrovirale est un analogue non-nucléosidique de la TI qui inhibe cette étape du cycle viral et ainsi empêche l'intégration du génome viral au génome cellulaire. L'ajout de cette drogue prévient l'infection productive de la DC et inhibe le transfert tardif. Le transfert observé est alors issu d'un attachement en surface ou d'un transit intracellulaire du virus communément appelé transfert précoce. Une quatrième courbe, représentant les DC non-stimulées traitées à l'EFV, aurait pu être ajoutée. Puisque les données étaient similaires aux DC stimulées traitées à l'EFV, la courbe a été retirée de chaque graphique afin d'en faciliter la lecture. Nous avons pu observer que dans la plupart des cas, à l'exception de poly I:C, il y avait une forte diminution de la p24 en présence d'EFV peu importe le ligand utilisé pour activer les DC. Pour le depleted-zymosan, le donneur représenté à la figure 14 ne correspond peut-être pas à la tendance réelle. Si on considère les trois autres donneurs, l'ajout d'EFV réduit de la même façon que les autres ligands le transfert du VIH aux LyT CD4+ quiescents.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que le transfert tardif du VIH-1 de tropisme X4 est plus important après stimulations par le Pam3CSK4, le LTA, le LPS, la flagelline, le zymosan, le depleted-zymosan et le PGN. Ce résultat va à l'encontre de certains articles publiés à ce sujet dans la littérature concernant la capacité des DC matures à transférer de façon tardive le VIH (91, 248). Cependant certaines différences lors des expériences pourraient expliquer cette divergence et elles seront exposées à la section 6.2. L'analyse du jour 3 et du jour 6 post-infection sera faite à la section 5.1.3 et 5.1.4.

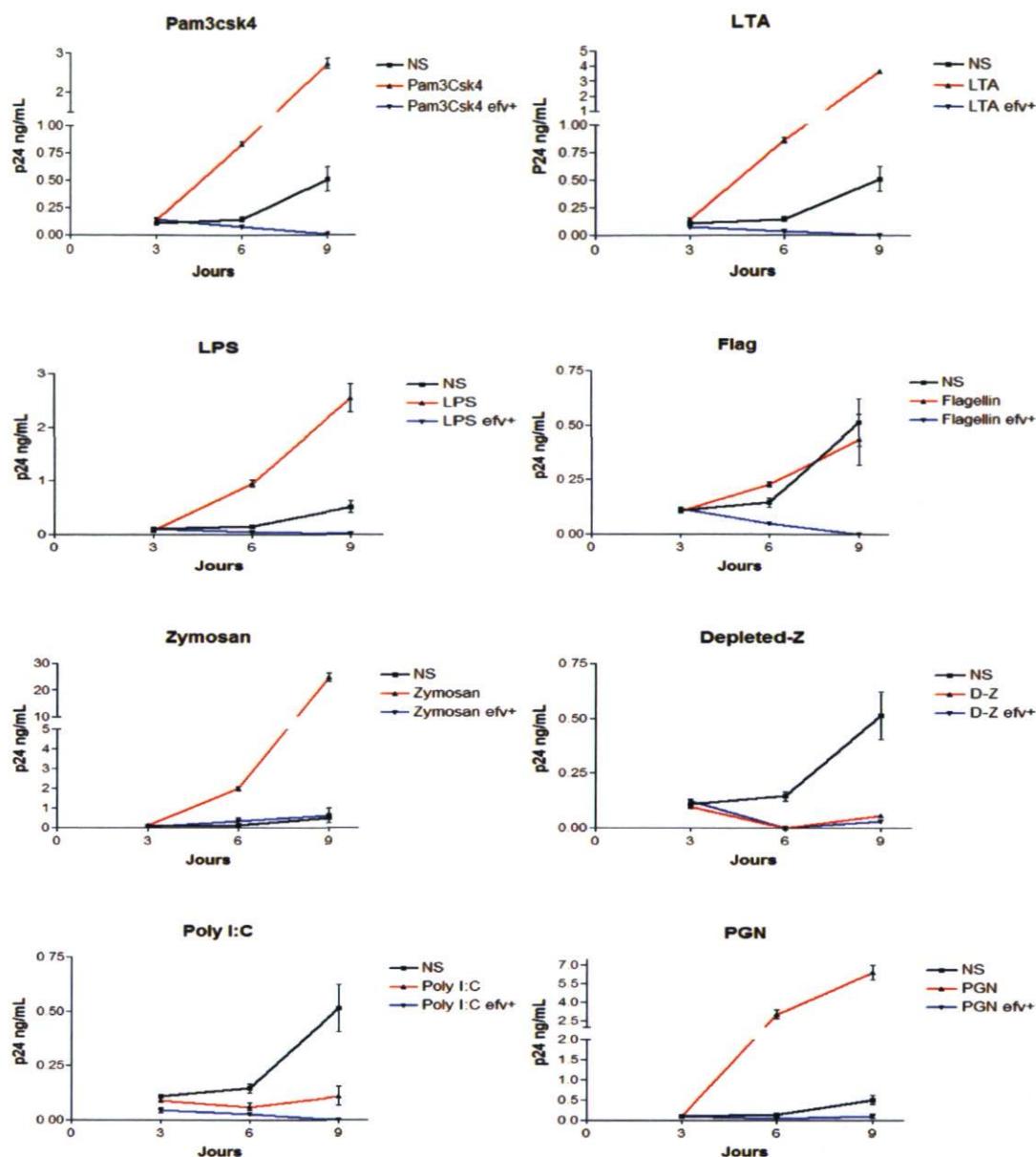


Figure 14. Cinétique du transfert du VIH-1 de tropisme X4.

Les DC immatures ont été mises en culture dans des plaques 96 puits (3×10^4 cellules/puits) et ont été stimulées ou non 24 heures avec différents ligands. Après 2 lavages, une partie DC maturées par chaque produit microbien a été traitée avec de l'éfavirenz 100 nM durant 15 minutes de manière à bloquer l'infection productive du virus. Les virus de type X4 (NL4.3wt) ont été ajoutés dans les puits à une concentration de 3 ng de p24 pour 30 000 cellules. Les plaques ont été incubées à 37°C durant 1 heure. Trois lavages ont été effectués. Les LyT CD4+ quiescents autologues ont été ajoutés (1×10^5 cellules/puits). Le surnageant des cellules a été récolté aux jours 3, 6 et 9 post-coculture. Le transfert viral a été quantifié par la technique d'ELISA p24. Les graphiques sont la cinétique d'un seul donneur représentatif de 3 ou 4 expériences indépendantes.

5.2.2 Cinétique de transfert du VIH-1 de tropisme R5

Nous avons par la suite étudié le transfert du VIH-1 de tropisme R5. Les cinétiques chez le virus de tropisme R5 divergent par rapport à ceux du tropisme X4. Aucune augmentation du transfert n'est observée lorsque les DC ont été traitées avec le LTA, le LPS, la flagelline, le depleted-zymosan et le poly I:C, et ce pour la majorité des donneurs (ligne rouge). Au contraire, nous observons soit des concentrations de p24 semblables à celles des DC immatures ou une diminution de celle-ci. Cette diminution est particulièrement marquée en présence de poly I:C. Le Pam3CSK4, le zymosan et le PGN se démarquent des agonistes en induisant une augmentation de la p24 au jour 6. Cette différence n'est par contre significative que pour le zymosan. Le traitement des DC à l'EFV (ligne orange) démontre que le transfert tardif est plus important que le transfert précoce et particulièrement au jour 6 (figure 15). Le poly I:C fait exception. Il n'y a pas de différence significative en présence ou en absence d'EFV ce qui nous indique, comme le virus de tropisme X4, que le transfert tardif est bloqué à la suite de cette stimulation et que ce qu'on observe lors de la cinétique résulte uniquement du transfert précoce. L'analyse de chaque jour de récolte sera faite à la section 5.2.3 et 5.2.4.

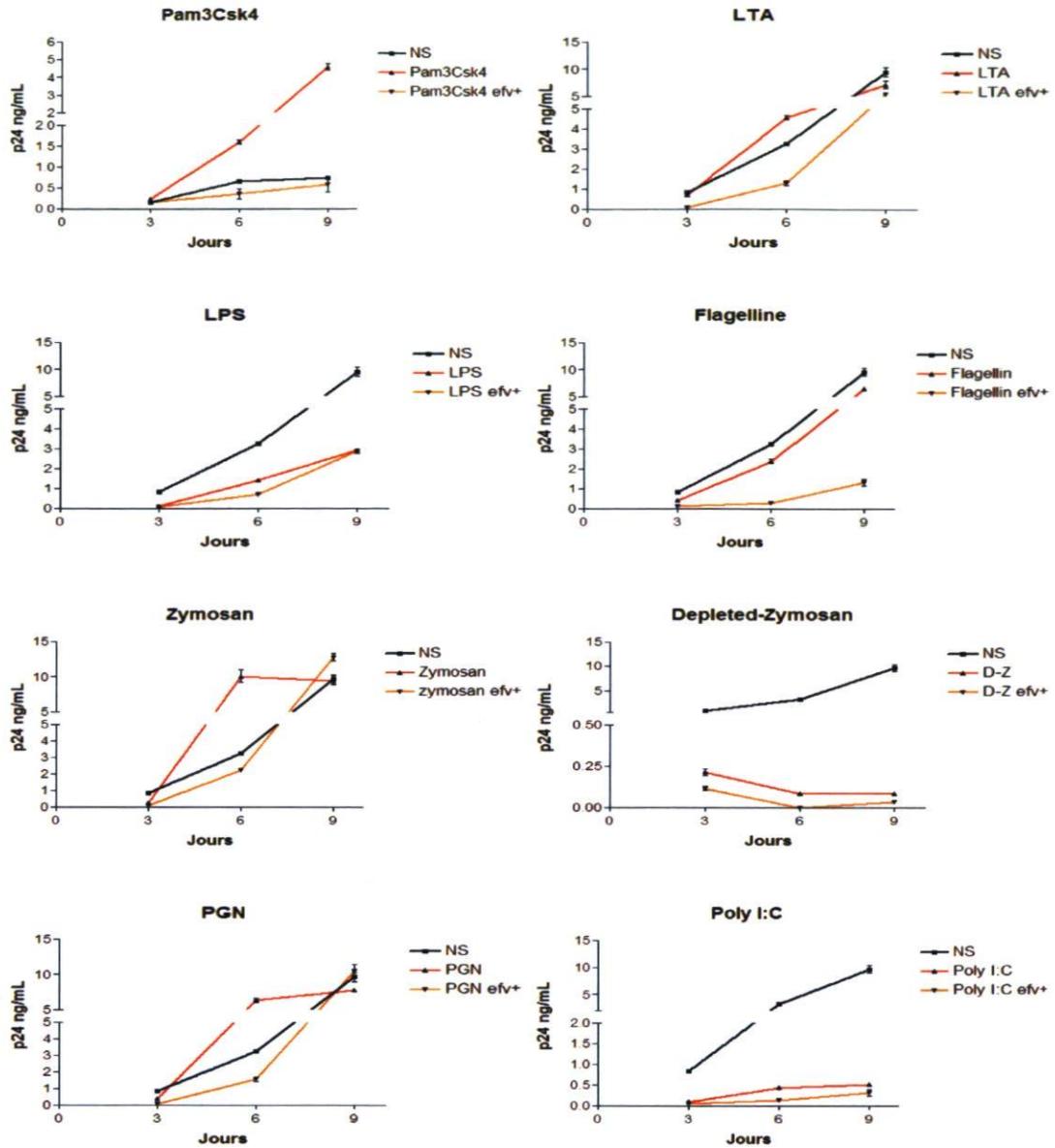


Figure 15. Cinétique du transfert du VIH-1 de tropisme R5.

Les DC immatures ont été mises en culture dans des plaques 96 puits (3×10^4 cellules/puits) et ont été stimulées ou non 24 heures avec différents ligands. Après à 2 lavages, une partie DC maturées par chaque produit microbien a été traitée avec de l'éfavirenz 100 nM durant 15 minutes de manière à bloquer l'infection productive du virus. Les virus de type R5 (NL4.3 balenv) ont été ajoutés dans les puits à une concentration de 3 ng de p24 pour 30 000 cellules. Les plaques ont été incubées à 37°C durant 1 heure. Trois lavages ont été effectués. Les LyT CD4+ quiescents autologues ont été ajoutés (1×10^5 cellules/puits). Le surnageant des cellules a été récolté aux jours 3, 6 et 9 post-coculture. Le transfert viral a été quantifié par la technique d'ELISA p24. Les graphiques sont la cinétique d'un seul donneur représentatif de 3 ou 4 expériences indépendantes.

5.2.3 Analyse du transfert au jour 3 post-coculture : transfert précoce

En général, les données dans la littérature concernant le transfert précoce s'obtiennent aux jours 2 ou 3 en présence ou non d'une drogue antirétrovirale. Par contre, le transfert se fait avec des lymphocytes T CD4⁺ activés, donc aussitôt que le virus est transféré, le cycle viral peut s'enclencher. Il peut en être autrement en présence de cellules quiescentes où différents facteurs ralentissent ou préviennent la poursuite du cycle viral.

Le transfert précoce a été analysé aux jours 2 et 3 post-coculture. Puisque les résultats étaient similaires, seules les données du jour 3 sont présentées à la figure 16. Nous n'avons observé **aucune différence significative** entre les différents stimuli que ce soit pour le VIH-1 de tropisme X4 ou R5 (respectivement A et C). Puisque le cycle viral pour une infection productive est d'environ 48 heures, il a fallu s'assurer que la quantité de p24 mesurée au jour 3 était bien du transfert précoce. Pour ce faire, les DC ont été traitées à l'EFV à la suite de leur traitement par les ligands et avant l'introduction du virus (panneaux B et D). On observe que la concentration en p24 est semblable avec ou en absence d'EFV. Par contre, les données pour le virus X4 semblent montrer une légère augmentation, quoique non significative, pour le LPS, la flagelline, le zymosan, le PGN et le poly I :C.

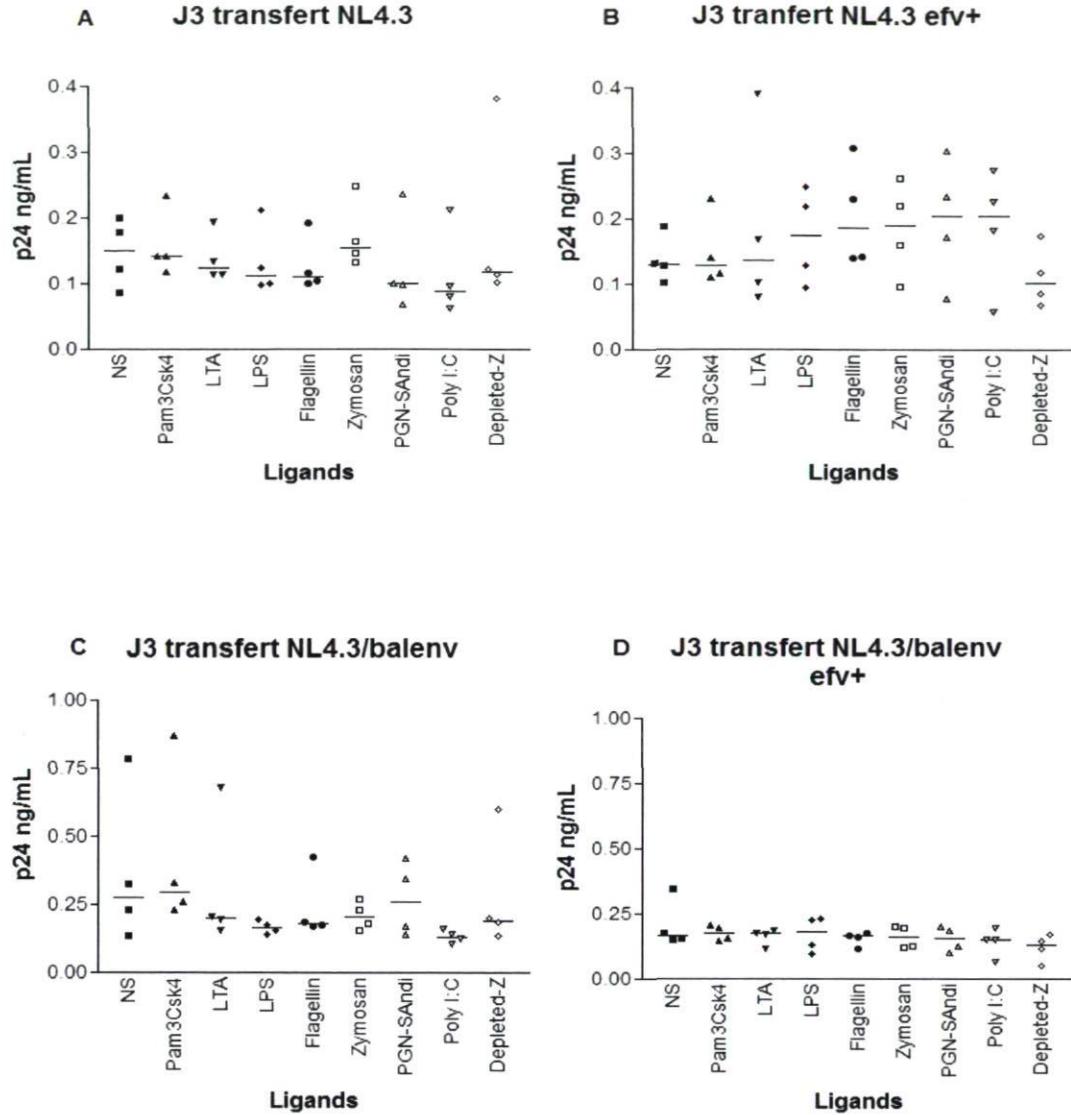


Figure 16. Transfert du VIH-1 de tropisme X4 et R5 au jour 3.

Les DC immatures ont été mises en culture dans des plaques 96 puits (3×10^4 cellules/puits) et ont été stimulées ou non 24 heures avec différents ligands. Après à 2 lavages, une partie DC maturées par chaque produit microbien a été traitées avec de l'éfavirenz 100 nM durant 15 minutes de manière à bloquer l'infection productive du virus (**B et D**). Les virus de type X4 (NL4.3wt) (**A et B**) ou R5 (NL4.3/balenv) (**C et D**) ont été ajoutés dans les puits à une concentration de 3 ng de p24 pour 30 000 cellules. Les plaques ont été incubées à 37°C durant 1 heure. Trois lavages ont été effectués. Les LyT CD4+ quiescents autologues ont été ajoutés (1×10^5 cellules/puits). Le surnageant des cellules a été récolté au jour 3 post-coculture. Le transfert viral a été quantifié par ELISA p24. Les résultats des graphiques représentent la moyenne des quintuplicata de 4 donneurs indépendants. La barre représente la médiane de chaque condition.

5.2.4 Analyse du transfert au jour 6 post-coculture : transfert précoce et transfert tardif

5.2.4.1 Tropisme X4

Nous avons voulu étudier l'effet des différents stimuli sur le transfert tardif du VIH-1 de tropisme X4. Très peu d'étude rapporte la capacité des DC matures à transférer le virus de tropisme X4. Il a été démontré que les DC immatures sont réfractaires à l'infection par des virus X4 puisqu'elles n'expriment pas de CXCR4 à leur surface. Par contre, la maturation entraîne généralement l'expression de ce corécepteur, un phénomène qui pourrait en partie lever la restriction lors des étapes précoces du cycle viral. Les résultats des cinétiques présentés à la figure 14 nous ont démontré que la présence de l'EFV diminuait la production de p24 donc l'infection productive dans les DC. Cela nous a mené à la conclusion que le transfert tardif était plus important que le transfert précoce. Le jour 6 et le jour 9 ont été analysés plus en détails pour les 4 donneurs. Comme le jour 6 est souvent celui analysé dans la littérature, celui-ci est présenté à la figure 17 (A et B). Les résultats du jour 9 suivent la même tendance mais la quantité de p24 dans le surnageant est plus élevée. Le Pam3CSK4 et le zymosan ont une concentration de p24 significativement plus élevée que les DC non-stimulées (figure 17 A). Le taux de transfert au jour 6 est en moyenne 14X plus élevé pour le Pam3CSK4 et 21X plus élevé pour le zymosan. Ces résultats nous indiquent une augmentation du transfert tardif qui est confirmé par la présence de l'EFV. En effet, la figure 17 B démontre bien la diminution de p24 après l'action de la drogue antirétrovirale confirmant l'infection productive. Bien que le LTA lie le TLR2, il ne montre pas une augmentation aussi forte du transfert et ce pour 2 des 4 donneurs. C'est également le cas pour le LPS et le PGN. Ils présentent 2 donneurs avec des augmentations significatives versus 2 donneurs semblables au contrôle. Le taux respectif de transfert est en moyenne 4X et 11X plus élevé par rapport au contrôle. Des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer quelle tendance est la bonne. Par ailleurs, en combinant tous les donneurs, nous constatons que la flagelline et le depleted-zymosan ne semblent pas affecter le transfert tardif. Par contre, le poly I:C diminue le transfert du VIH-1 de tropisme X4 de manière significative. Le transfert y est 2X moins élevé que le contrôle. La graphique 17B confirme que le transfert est fortement diminué en présence

d'EFV à l'exception du poly I:C où la quantité de p24 demeure sensiblement la même qu'en absence de drogue.

5.2.4.2 Tropisme R5

Nos résultats démontrent que le transfert tardif est augmenté après une stimulation du TLR2 et de la dectine-1 par le zymosan (figure 17 C). En effet, le taux de transfert y est 4X plus élevé. L'augmentation du transfert tardif est confirmée après aux traitements des DC matures à l'EFV (figure 17 D). Par contre, cette figure démontre que le transfert précoce est significativement augmenté au jour 6 pour le zymosan et pour le Pam3CSK4. En effet, ces deux ligands présentent respectivement des quantités de p24 14X et 9X plus élevé que le contrôle. Les autres ligands, le LTA, le LPS, le PGN et le depleted-zymosan présentent des valeurs avoisinant celles des DC non-stimulées (figure 17 C). Par contre, on observe un effet contraire pour le poly I:C car ce dernier diminue la quantité de p24 de 7X par rapport au contrôle.

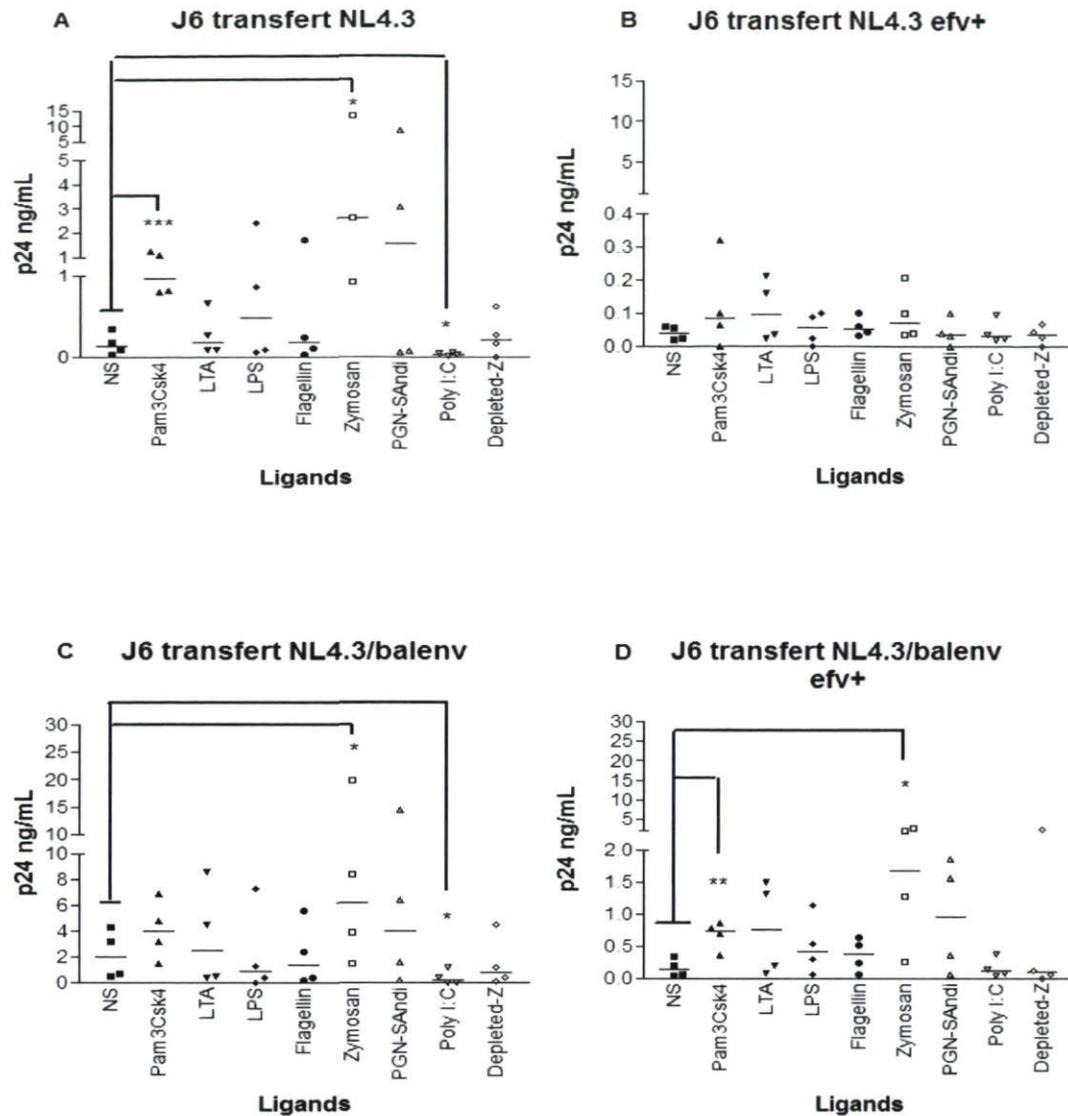


Figure 17. Transfert du VIH-1 de tropisme X4 et R5 au jour 6.

Les DC immatures ont été mises en culture dans des plaques 96 puits (3×10^4 cellules/puits) et ont été stimulées ou non 24 heures avec différents ligands. Après 2 lavages, une partie DCs maturées par chaque produit microbien a été traitée avec de l'éfavirenz 100 nM durant 15 minutes de manière à bloquer l'infection productive du virus. Les virus de type X4 (NL4.3wt) (A et B) ou R5 (NL4.3/balenv) (C et D) ont été ajoutés dans les puits à une concentration de 3 ng de p24 pour 30 000 cellules. Les plaques ont été incubées à 37°C durant 1 heure. Trois lavages ont été effectués. Les LyT CD4+ quiescents autologues ont été ajoutés (1×10^5 cellules/puits). Le surnageant des cellules a été récolté aux jours 6-9 post-culture. Le transfert viral a été quantifié par ELISA p24. Les résultats des graphiques représentent la moyenne des quintuplicata de 4 donneurs indépendants (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$). La barre représente la médiane de chaque condition.

5.3 Analyse de l'effet des stimulations des récepteurs TLR, NOD-2 et dectine-1 sur la modulation de l'expression du CXCR4.

À la suite des résultats de transfert obtenus, nous avons voulu savoir pourquoi le transfert tardif du virus de tropisme X4 de la DC était augmenté suite aux stimulations. L'hypothèse était que la maturation de DC pourrait peut-être réguler à la hausse l'expression du CXCR4, récepteur de chimiokines et corécepteur servant à l'entrée du VIH-1. Il s'est avéré que notre hypothèse allait dans la bonne direction. À la suite de la maturation des DC par le Pam3CSK4, le LPS, la flagelline, le zymosan et le PGN, il y a une augmentation significative des cellules exprimant le CXCR4, soit respectivement de 5X, 7X, 4X, 9X, 4X (figure 18). Le poly I:C et le depleted-zymosan induisent quant à eux une légère augmentation, non significative due à l'écart entre les différentes expériences. Contrairement aux autres ligands, le LTA est le seul dont le pourcentage est similaire par rapport à notre référence, soit les DC non-stimulées (NS).

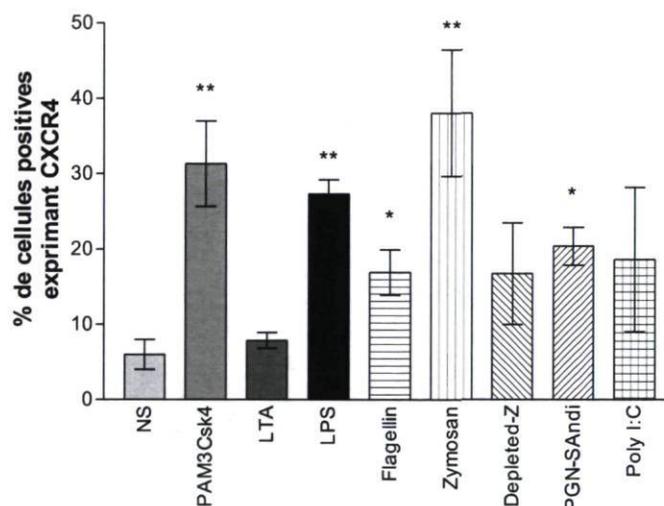


Figure 18. Pourcentage de cellules positives exprimant le CXCR4 à la surface des DC.

Les DC immatures (1×10^6 cellules/puits) ont été stimulées ou non 72 heures avec les ligands et concentrations spécifiés au tableau 3. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS froid et décollées de la plaque en maintenant celle-ci sur glace. Les récepteurs Fc ont été bloqués avec une solution 10% de FBS durant 15 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été mises en présence soit d'un anticorps marqué spécifique contre le CXCR4 (R-PE-tagged anti-CXCR4 (clone 12G5), BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) ou soit d'un anticorps de même isotype et ce durant 30 minutes à 4°C. Chaque échantillon a été lavé 3 fois pour ensuite être fixé avec de la paraformaldéhyde 2%. Ce graphique représente la moyenne de 3 donneurs indépendants (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$).

5.4 Analyse de l'effet des stimulations des récepteurs TLR, NOD-2 et dectine-1 sur l'infection des cellules dendritiques

Afin de valider que l'infection productive par le VIH-1 de tropisme X4 était possible, des essais d'infection sur 4 donneurs ont été réalisés. L'expérience a également été faite avec le VIH-1 de tropisme R5 en guise de contrôle. En effet, il est décrit dans la littérature que la DC immature présente une forte concentration de CCR5 à sa surface et que ce dernier diminue lors de la maturation de la DC (51, 258). À la suite de la maturation, l'infection devrait diminuer et c'est le résultat que nous avons obtenu (figure 19 B). Cette diminution fut particulièrement marquée pour le LPS et le poly I:C. Le taux d'infection diminue respectivement de 10X et de 6X.

Le jour 6 post-infection démontre un niveau de p24 très bas pour le virus X4 (figure 17 A). Aucune variation significative n'a été observée entre les différents stimuli. La cinétique dans le temps de chaque ligand démontre également que la quantité de p24 diminue de façon constante alors qu'il est augmenté très fortement du côté du virus R5. La cinétique du zymosan est montrée en exemple à la figure 19 (C et D). En effet, nous observons une grande variation entre les niveaux de p24 du virus R5 par rapport au virus X4. Les essais d'infection ne nous permettent pas de conclure à une infection productive avec le virus X4. En effet, la quantité de p24 ne fait que diminuer dans le temps alors qu'en présence d'une infection productive elle devrait augmenter, comme ce qui est observé pour le virus R5.

Des PCR d'intégration ont été réalisées. L'objectif était d'y quantifier l'ADN viral intégré au génome cellulaire afin de confirmer l'infection productive de la DC par les virus X4. Ces PCR n'ont pas été concluants puisque l'ADN viral intégré à la suite de l'infection par le virus de tropisme X4 n'a pas pu être détecté.

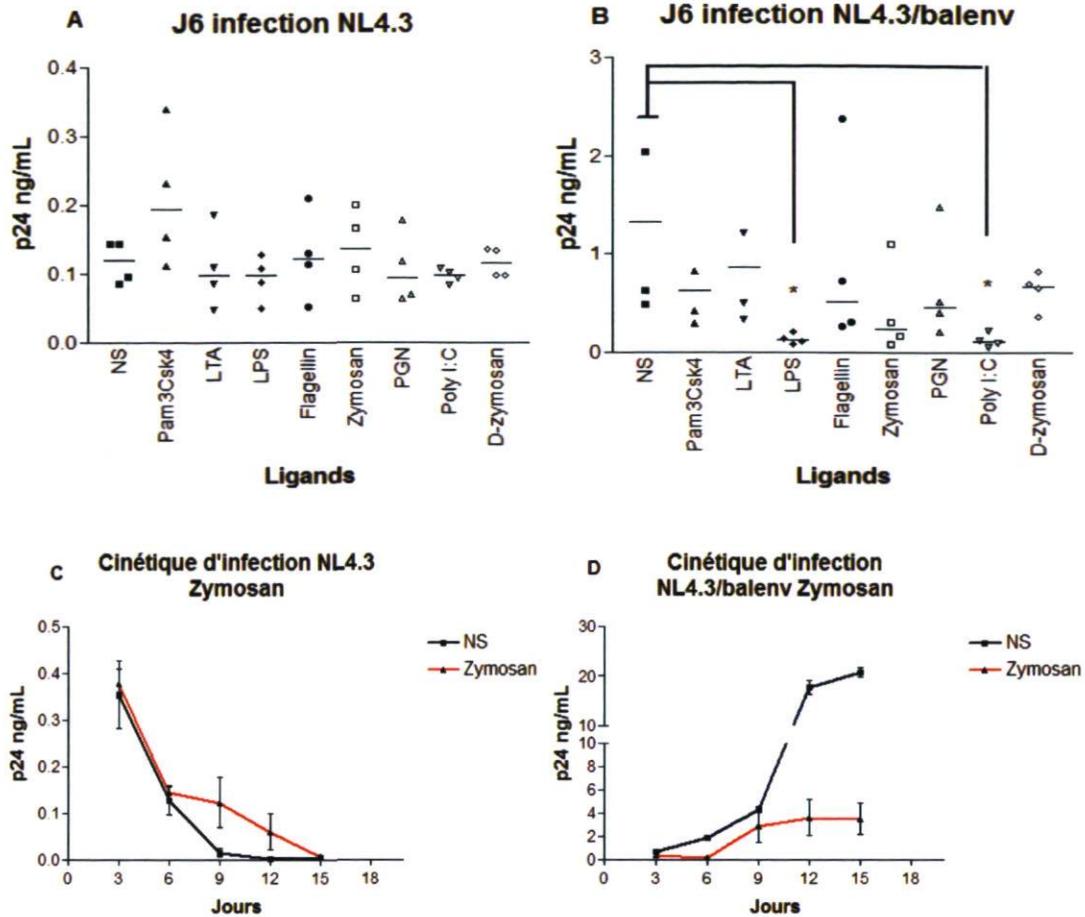


Figure 19. Infection des cellules dendritiques.

Les DC immatures ont été mises en culture dans des plaques 96 puits (3×10^4 cellules/puits) et ont été stimulées ou non 24 heures avec les ligands et concentrations spécifiés au tableau 3. Après 2 lavages avec du PBS stérile, les virus de type X4 (NL4.3wt) (A et C) et R5 (NL4.3balenv) (B et D) ont été ajoutés dans les puits à une concentration de 3 ng de p24 pour 30 000 cellules. Après 3 lavages afin d'éliminer les virus libres présent dans le surnageant, les DC matures ont été mises en culture dans un milieu RPMI complet et incubées à 37°C. Les surnageants ont été récoltés aux jours 3-6-9-12-15 et l'infection virale a été mesurée par ELISA p24. Les graphiques en A et B indiquent le niveau de p24 au jour 6 et représentent 4 donneurs indépendants (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$). La barre représente la médiane de chaque condition. Les panneaux C et D sont représentatifs de 4 donneurs indépendants.

Chapitre 6. Discussion et conclusion

La présence de produits microbiens dans le sang et les tissus des personnes infectées par le VIH-1 est très importante car ces derniers influencent la pathogénèse virale. Ces produits sont issus de la translocation microbienne ou de co-infections microbiennes. En effet, les personnes atteintes du VIH-1 sont plus susceptibles aux autres infections telles que la tuberculose, la pneumonie ou les diverses ITS (infections transmises sexuellement). Il a été suggéré que la présence des PAMP en circulation hyperactive le système immunitaire ce qui génère une grande quantité de LyT CD4⁺ activés, les cellules préférentiellement infectées par le VIH-1 (259). Ils provoquent aussi une inflammation très grande via une sécrétion de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires (150, 260). De plus, il a été démontré, dans les dernières années, qu'ils pouvaient également influencer la susceptibilité des DC (88, 246, 251) à l'infection et au transfert subséquent du VIH-1 aux LyT CD4⁺ (247-249).

6.1 Les PAMP induisent différents profils de cytokines

Bien que les transcrits de cytokines issus des DC soient sensiblement les mêmes d'un ligand à l'autre, il y a toutefois quelques différences. Tout d'abord, la flagelline, le LPS et le poly I:C induisent beaucoup plus de transcrits que les autres agonistes à l'exception de l'IL-10 et du TGF- β . La forte quantité de transcrits indiquent que ces ligands sont probablement plus immunogéniques que les autres. La maturation de la DC est probablement plus forte donc il est possible que les LyT CD4⁺ soient davantage activés à la suite du contact avec les DC stimulées par ces ligands. Il a d'ailleurs été démontré que les DC qui étaient maturées par la flagelline et le LPS induisaient plus fortement la prolifération des LyT CD4⁺ (261). Leur état d'activation pourrait les rendre plus susceptibles à l'infection ou encore réfractaire dans le cas où certaines stimulations pourraient engendrer l'expression de facteurs antiviraux. À la suite du traitement des DC par le Pam3CSK4, le LTA, le PGN et le zymosan, un effet semblable est observé bien qu'il soit moins important que pour les ligands mentionnés précédemment. Une réponse inflammatoire est toutefois induite à la suite de la stimulation des DC par les ligands sélectionnés ce qui nous indique que les stimuli ont pour effet de causer la maturation des DC.

L'engagement du récepteur dectine-1 par le depleted-zymosan est le stimulus induisant le moins de transcrits à l'exception de l'IL-1 β . Cela corrèle toutefois avec la littérature affirmant que la stimulation de ce récepteur est plus faible que celle du TLR2 et de la dectine-1 par le zymosan. En effet, ce dernier lie à la fois ces deux récepteurs ce qui crée une synergie, notamment au niveau de la production de cytokines (208, 212, 220, 221). Nos résultats nous le confirment puisque le zymosan induit davantage de transcrits que le depleted-zymosan et le Pam3CSK4. Il est possible que la concentration de cytokines induites à la suite de l'engagement du dectine-1 n'active pas autant le LyT CD4+ comparativement à l'engagement du TLR2.

6.2 Effet des différents PAMP sur la capacité des DC à transférer le VIH-1 aux LyT CD4+ quiescents

6.2.1 Le transfert précoce

Peu d'études ont rapporté l'habilité des DC à transférer les virus X4 puisqu'en général la transmission virale, qui se produit au niveau des muqueuses, implique davantage les virus de type R5. Par contre, au cours de la pathogenèse, les virus de type X4 font leur apparition et ils sont en général concentrés dans les OLS. Sachant que l'exposition des DC immatures à divers PAMP entraîne leur maturation et leur migration aux OLS, nous avons voulu savoir, dans un premier temps, si leur capacité à capturer et transférer les virus X4 aux lymphocytes T CD4+ quiescents était modulée selon leur profil de maturation. Les résultats présentés à la figure 16 et 17 ne montrent aucune différence significative après stimulations par les PAMP sur le transfert précoce des virus de tropisme X4. Les résultats des expériences avec EFV (figure 16-17 B et D) nous ont permis de constater que la quantité de p24 présente dans le surnageant de la coculture était sensiblement similaire pour chaque ligand au jour 3 mais aussi au jour 6. Or, si on regarde les résultats au jour 9 en présence d'EFV, une certaine tendance se dessine et on observe pour certains ligands, une réplication plus importante à la suite de la coculture. Parmi ces ligands, on retrouve le Pam3CSK4, le LTA, le zymosan et le PGN (résultats non présentés). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces données. D'abord, il est possible que la levée des restrictions à l'infection des cellules quiescentes demande du temps et dépende du type et de l'intensité des stimuli

reçus. Peut-être que seule quelques cellules T sont assez bien activées pour permettre la réplication virale et que ça prend du temps avant de détecter de la p24 dans le surnageant de la coculture. Il est possible aussi que la p24 détectée soit issue de quelques DC qui auraient été infectées même en présence d'EFV et que la p24 détectée soit celle issue de la réinfection de ces DC. Par contre, cette hypothèse est peu probable. Afin de confirmer cette hypothèse, nous pourrions reproduire le transfert des DC (traitées à l'EFV) aux LyT CD4+ quiescents mais en irradiant ou en fixant ces derniers à la paraformaldéhyde afin d'éviter leur infection. Si la p24, mesurée dans la coculture, n'apparaît pas dans le temps, il sera possible d'affirmer que les virus détectés dans notre expérience initiale sont bien issus des LyT CD4+ qui ont été activés par les DC et que les virus proviennent du transfert précoce et non de l'infection productive de la DC.

De la même façon que pour les virus X4, le transfert précoce au jour 3 des virus R5 ne montre aucune différence entre les DC immatures et les DC matures. Étonnamment, nos résultats démontrent que le LPS n'a pas d'effet sur le transfert précoce du VIH-1 de tropisme R5 ce qui va à l'encontre de ce qui est connu dans la littérature. En effet, certaines études ont démontré qu'une stimulation des DC par le LPS augmente le transfert du VIH-1 (246, 248, 262). Ils ont cependant utilisé des LyT CD4+ activés dans leurs expériences. Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de transfert précoce au jour 3 est l'état quiescent des LyT CD4+ dans notre modèle de transfert. Comme il a été mentionné précédemment, les LyT CD4+ quiescents sont peu susceptibles à l'infection, d'une part parce que le virus a besoin d'une cellule biologiquement active pour se répliquer et d'autre part à cause des restrictions cellulaires. Les cellules quiescentes ont donc besoin d'être activées afin d'être plus facilement infectées. L'infection est alors décalée dans le temps par rapport à des modèles de transfert utilisant les LyT CD4+ activés. Les études, utilisant ces derniers, mesurent le transfert précoce au jour 2 post-coculture. Il serait possible que les LyT CD4+ quiescents utilisés dans nos expériences ne soient pas suffisamment activés pour permettre le transfert des virus et leur réplication au jour 3. Par ailleurs, sachant que les LyT CD4+ quiescents n'expriment pas le CCR5, alors il est évident que les virus R5 transférés ne peuvent pas pénétrer par fusion au moment du contact cellule-cellule. Dans le but de valider notre hypothèse comme quoi l'utilisation de LyT CD4+ quiescents prévient l'augmentation du transfert précoce issus des DC maturées au LPS, une expérience

comparant le transfert entre les LyT CD4⁺ quiescents et activés à la suite d'une stimulation des DC par le LPS a été réalisée. Il s'est avéré que le transfert précoce était plus élevé en présence des LyT activés, confirmant ainsi les données de la littérature. Ainsi, même si la DC maturée a une plus grande capacité à faire du transfert précoce, la cellule réceptrice doit être permissive à l'infection au moment du contact cellule-cellule. En absence des facteurs nécessaires à la fusion et à la poursuite du cycle viral, l'intégrité des virus doit être altérée ce qui doit prévenir l'infection productive. Il est aussi possible que les LyT CD4⁺ quiescents ne forment pas de filopodes à leur surface, c'est-à-dire des extensions riches en actine contenant à leur extrémité les molécules nécessaires à l'attachement et à la fusion virale. Il a été démontré que ces protrusions permettent de "pêcher" les virus localisés dans les invaginations présentes à la surface des DC maturées (263). Peut être que les cellules activées génèrent plus rapidement ce genre de structures après leur rencontre avec des DC maturées et que le phénomène est plus lent pour les cellules quiescentes, expliquant pourquoi le transfert précoce n'est pas modulé dans nos essais. Des expériences en microscopie électronique seront nécessaires afin de valider cette hypothèse.

Par contre, nos données montrent qu'au jour 6 et au jour 9, certains stimuli ont un effet sur le transfert précoce des virus R5, notamment le Pam3CSK4, le LTA, le zymosan et le PGN. Dû à la variabilité entre les donneurs, seuls le Pam3CSK4 et le zymosan donnent des résultats significatifs. Des expériences supplémentaires effectuées avec des PAMP fraîchement décongelés devraient permettre de déterminer la tendance réelle. Tout comme au jour 3, le LPS ne semble pas augmenter non plus le transfert précoce aux LyT CD4⁺ quiescents aux jours 6 et 9. Deux hypothèses pourraient être émises à la suite de ces résultats. Tout d'abord, la maturation suite à l'engagement du TLR2/1 et de NOD2 provoquerait possiblement une activation plus rapide des LyT CD4⁺ quiescentes dû à l'importante production de cytokines pro-inflammatoires. Leur présence pourrait moduler à la hausse l'expression du CCR5 nécessaire à l'infection. Les LyT CD4⁺ expriment très peu de CCR5 à l'état quiescent. L'activation des LyT CD4⁺ suite à leur contact avec la CPA et avec les cytokines pro-inflammatoires présentes dans le milieu induisent son expression. Or, les résultats quantifiant les transcrits de cytokines démontrent que ce sont le LPS, la flagelline ainsi que le poly I:C qui induisent le plus grand nombre de transcrit comparativement au Pam3CSK4 et au zymosan. Ces ligands devraient donc induire

l'activation des LyT CD4+ la plus importante et ainsi rendre plus efficacement les cellules permissives à l'infection, ce qui n'est pas le cas ici. Il faut toutefois considérer que les transcrits ont été quantifiés après une stimulation de 4 heures par les ligands. Le transfert a été mesuré au jour 6 suivant l'infection et l'ajout des LyT CD4+. Bien qu'il y ait beaucoup de transcrit, il est fort probable que la production de cytokines ne soit pas continue et que la concentration de ces dernières varient durant ces 6 jours. De plus, l'expérience quantifiant les transcrits de cytokines ne tient compte que de la stimulation par un ligand alors que le modèle de transfert implique divers acteurs, notamment le VIH-1 et les LyT CD4+ quiescents. Cela pourrait activer davantage la production de cytokines pro-inflammatoires et subséquemment l'activation des LyT CD4+, les rendant susceptible à l'infection en augmentant l'expression du CCR5 et en levant les restrictions cellulaires. Une analyse par FACS de l'expression du CCR5 permettrait de vérifier son niveau sur les LyT dans le temps et de le comparer à la suite de la maturation des DC par différents stimuli. Il est aussi possible que les DC très matures sécrètent des facteurs anti-viraux qui préviennent l'infection des lymphocytes T même si c'est derniers deviennent permissifs à l'infection. Des expériences supplémentaires visant à caractériser ces facteurs seraient pertinents. Par exemple, le milieu conditionné de DC stimulés par les différents PAMP pourrait être mis en présence du virus et de LyT CD4+ quiescents et/ou activés afin de vérifier la présence de facteurs modulant la réplication virale.

Il est aussi possible que la maturation engendrée par la signalisation du TLR2/1 et NOD2 mène à une capture plus grande du virus de tropisme R5. Cela constitue la deuxième hypothèse. Une étude a déjà démontré qu'une stimulation d'une heure avec le Pam3CSK4 pouvait augmenter le transfert précoce par les DC de Langerhans et ce, en augmentant leur capacité à capturer le virus à leur surface (264). Aucune étude n'a par contre été faite suite à une stimulation de 24 heures avec des DC dérivées de monocytes. Il est aussi possible que ces stimulations modifient l'expression des récepteurs de surface nécessaire à la capture virale sur les DC. Des résultats issus de notre laboratoire démontrent que la maturation des DC par les différents PAMP utilisés est corrélée avec une forte diminution du DC-SIGN. D'autre part, les mêmes observations avaient déjà été faites par d'autres avec des DC stimulés au LPS et ce pour le DC-SIGN et le DCIR (102, 262,103). Bien que le transfert précoce dépende largement de la liaison du virus avec le DC-SIGN et le DCIR exprimé à la

surface des DC, il a récemment été démontré que le VIH-1 peut être capté indépendamment de ces récepteurs. Parmi ces récepteurs, il y a les tétraspanines CD81 ou CD63 (263). Les DC matures expriment fortement ces deux protéines (263). Par conséquent, il est possible que l'exposition aux divers PAMP augmente l'expression de ces molécules ce qui contrecarre la diminution du DC-SIGN et du DCIR. Les virus se lient ainsi par l'intermédiaire des tétraspanines, pénètrent dans la DC pour être ensuite relargés et transférés aux LyT CD4+ lors d'un contact entre les deux cellules. Une récente étude a d'ailleurs démontré une colocalisation entre les particules virales et le récepteur CD81 associé aux radeaux lipidiques dans les DC matures (264).

Il serait donc intéressant d'analyser si le niveau de CD81 et de CD63 est suffisamment augmenté au jour 6 pour induire une augmentation du transfert observé dans certaines conditions. Tout comme le virus X4, des expériences de microscopie électronique nous permettrait de voir si les particules virales sont davantage liées à la surface ou internalisées dans le DC matures. Il est plausible que les différentes DC matures activent à divers degrés les LyT CD4+ et modulent leur habileté à générer des filopodes et donc le transfert précoce du VIH-1. Par contre, cette hypothèse n'explique pas pourquoi les virus de type X4 ne réagissent pas de la même façon dans le temps. Il faudra poursuivre les recherches afin de comprendre les raisons de cette divergence entre les deux types de tropisme.

6.2.2 Le transfert tardif et l'infection

Certaines études ont démontré que le phénomène de fusion nécessaire à l'entrée pour une infection productive était fortement diminué lorsque les DC étaient matures (88, 91). Ce phénomène était observé pour les deux tropismes de VIH-1. Puisque les DC matures perdent en générale l'expression du CCR5, un marqueur localisant les cellules dans les muqueuses, et qu'elles acquièrent le CXCR4 pour migrer aux OLS, nous avons posé comme hypothèse que l'infection des DC par des virus X4 devrait être augmentée à la suite de leur maturation par les divers stimuli, alors que celle des virus R5 devrait être diminuée. L'infection des DC est généralement une répllication à bas bruit comparée à celle des LyT CD4+. Par contre, l'infection des DC immatures par des virus R5 a bien été caractérisée par plusieurs équipes, dont la nôtre. Le transfert tardif est une façon de mesurer l'infection des DC puisque les virus issus de l'infection des DC sont relargués au site de contact entre les

deux cellules (DC-LyT CD4+) pour ensuite être répliqués dans les lymphocytes T CD4+ où la production virale est de beaucoup amplifiée.

Nos résultats montrent dans un premier temps que le transfert tardif des virus X4 est augmenté de façon significative par le Pam3CSK4 et le zymosan qui ont en commun la stimulation du TLR2. Les augmentations issues des DC maturées par le LPS et le PGN restent à être confirmées en utilisant des produits fraîchement décongelés. Tous ces ligands induisent très fortement l'expression du CXCR4 à la surface des DC comparativement aux DC immatures. Ceci pourrait influencer l'infection productive de la DC en augmentant le phénomène de fusion. De plus, l'expression du CXCR4 pourrait être davantage augmentée comparativement à ce que nous avons quantifié. En effet, une double stimulation par le VIH-1 et le ligand sélectionné pourrait induire une expression encore plus importante sur les DC car le virus est lui aussi reconnu par différents récepteurs de l'immunité innée. Il est également possible que la maturation influence favorablement les événements de rétro-transcription. En effet, une étude a déjà démontré que, à la suite d'une stimulation du TLR2, les événements précoces et tardifs de la transcription inverse étaient significativement augmentés (247). Une autre étude a également démontré l'augmentation de la réplication du virus à la suite de la stimulation du TLR2 (226). Un PCR quantifiant les événements de transcription inverse dans les DC serait nécessaire afin de valider cette hypothèse.

Bien que le LTA stimule le TLR2, il n'induit cependant pas le même effet que son analogue synthétique, le Pam3CSK4. En effet, le LTA n'induit pas autant l'expression du CXCR4 et n'affecte pas le transfert tardif. Pourtant, la stimulation au LTA induit la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats sont probablement dus à la concentration de ligands utilisés. Une dose réponse aurait été nécessaire afin d'observer les différents effets du LTA sur l'expression du CXCR4 et le transfert viral. Par contre, la dose utilisée était suffisante pour déclencher la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour valider l'effet du LTA sur le transfert tardif.

Le zymosan est reconnu comme liant à la fois le TLR2 et la dectine-1. Aucune augmentation du transfert tardif n'est toutefois observée à la suite de la stimulation de la dectine-1 par le depleted-zymosan, ligand qui lui est propre. En effet, plusieurs études

portant sur la collaboration entre les deux récepteurs (dectine-1 et TLR2) ont établi que la stimulation du TLR2 était nécessaire afin d'activer une réponse inflammatoire plus importante (183, 221). La réponse suivant l'engagement de dectine-1 est plus faible que celle impliquant les deux récepteurs. Toutefois, cette réponse n'est pas seulement régie par le TLR2 puisque des équipes ont démontré que des macrophage dépourvus de dectine-1 mais présentant le TLR2 à leur surface produisaient moins de cytokines pro-inflammatoires que lorsque les deux récepteurs étaient engagés (211, 212, 221, 268). Aussi, l'expression du CXCR4 étant faiblement augmenté lors de stimulation de la dectine-1, la fusion des virus X4 est probablement moindre ce qui explique également l'absence de transfert tardif. Un autre élément à considérer est la production de ROS induite suite à l'engagement de ce récepteur. Les ROS étant très toxiques pour la cellule, ils pourraient causer des dommages à celle-ci limitant l'infection productive des DC par le virus et donc le transfert tardif.

La flagelline ne semble pas avoir d'effet sur le transfert même si une augmentation du CXCR4 est observée. Elle n'a peut-être pas d'effet sur les événements de rétrotranscription. Deux expériences ont d'ailleurs démontré une absence d'effet sur l'infection des DC (251) et le transfert (247) après une stimulation par la flagelline. Par contre, un élément technique a pu influencer les résultats obtenus. La flagelline était parfois utilisée alors qu'elle était restée quelques jours à 4°C. Le dernier donneur testé présentait une concentration de p24 beaucoup plus forte que notre contrôle comparé aux trois donneurs précédents. Nous pensons que c'est en partie dû à l'utilisation de flagelline fraîche conservée à -20°C. Des expériences supplémentaires permettront de valider cette hypothèse.

Puisque les résultats sur le transfert tardif semblaient montrer que les DC maturées par les différents ligands bactériens et fongiques avaient une plus grande susceptibilité à l'infection par des virus X4, des expériences visant à mesurer directement l'infection de ces cellules ont été réalisées. Étonnamment, la quantité de p24 dans le surnageant des DC seules maturées ou non décroît au cours du temps suggérant qu'il n'y a aucune infection productive dans ces cellules. De plus, les expériences visant à quantifier l'intégration du génome viral dans l'ADN des DC n'ont pas non plus permis de conclure que le VIH de tropisme X4 s'intégrait dans les DC maturées. Pourtant, la stimulation des TLR2, 3, 4, 5 et NOD2 par leur ligand respectif a provoqué une augmentation significative de l'expression

du CXCR4 ce qui aurait pu expliquer l'augmentation du transfert tardif observée avec le VIH-1 de tropisme X4. Cependant, les expériences d'infection avec le virus X4 ont démontré qu'une augmentation du CXCR4 n'était pas suffisante pour induire une infection productive de la DC immature ou mature.

Il faut par contre prendre en considération que notre modèle de transfert tardif comporte plusieurs éléments pouvant influencer sur l'infection de la DC. Tout d'abord, nous avons toujours une double stimulation des récepteurs étudiés (TLR2/1, TLR3, TLR4, TLR5, NOD2 ou dectine-1) puisque, en plus du ligand sélectionné, le VIH-1 vient également stimuler le TLR8. La production de cytokines pro-inflammatoires est alors plus importantes activant les LyT CD4+ qui eux peuvent activer davantage les DC et les rendre plus susceptible à l'infection. Tous ces éléments sont susceptibles d'augmenter davantage l'expression du CXCR4 mais aussi l'expression de molécules d'adhésion permettant au virus d'infecter la DC. Cela pourrait également augmenter les évènements de rétrotranscription à l'intérieur de la cellule ou augmenter l'import nucléaire favorisant ainsi une infection productive. Ces hypothèses devront être validées via la quantification des étapes de transcription inverse et via l'analyse de l'expression du CXCR4 suite à une double stimulation des TLR/NOD2/dectine-1 en présence de LyT CD4+ quiescents et en présence ou en absence de virus. De plus, les expériences de transfert utilisant des LyT CD4+ quiescents fixés avec de la paraformaldéhyde devrait permettre d'éclaircir ce point quant à la nécessité d'avoir des lymphocytes T pour rendre les DC permissives à l'infection virale par des virus X4.

Comme il a été mentionné précédemment, la maturation des DC entraîne généralement la disparition du CCR5, du moins à la suite d'une exposition avec le LPS. Par conséquent, le transfert tardif et l'infection des DC par des virus R5 devrait être grandement diminuée comme ce qu'il a déjà été décrit dans la littérature pour le LPS. Sans trop de surprise, les résultats démontrent qu'à l'exception du zymosan, la maturation par tous les autres ligands sélectionnés n'augmente pas le transfert tardif des virus R5 comparé au DC immatures. Cela pourrait être dû à la diminution de l'expression du CCR5 engendrée par la maturation ainsi qu'à la production de ROS produits dans le cas de la dectine-1, un effet qui devra être éventuellement testé en utilisant par exemple un antagoniste des ROS. Par contre, tout

comme le virus de tropisme X4, le transfert tardif du virus R5 est augmenté à la suite de l'action du zymosan. Bien que la maturation diminue l'expression du CCR5, ceci ne semble pas avoir d'effet sur l'infection productive de la DC puisque le transfert tardif est augmenté. Tel que mentionné précédemment, il est possible que le zymosan augmente les évènements de transcription inverse. Contrairement à ce qui est conservé pour le virus X4, le transfert tardif n'est pas augmenté avec le virus R5 après la stimulation du Pam3CSK4. Il se pourrait que ce dernier induise beaucoup plus fortement la maturation de la DC puisque c'est un agoniste synthétique. La régulation à la baisse de l'expression du CCR5 serait alors plus grande expliquant ainsi le peu de transfert tardif observé. L'étude de l'expression du CCR5 par les DC stimulées sera nécessaire afin d'expliquer ce phénomène.

Le facteur de restriction APOBEC3G peut également être un élément limitant le transfert tardif. Par le passé, il a été démontré que cette protéine était fortement induite dans les mDC après maturation (269), notamment par le Pam3CSK4 (251), et qu'il pouvait inhiber la réplication du VIH-1. Bien que le zymosan stimule le TLR2 comme le Pam3CSK4, il stimule également la dectine-1 (221). L'engagement des deux récepteurs simultanément pourrait possiblement contrecarrer l'effet d'APOBEC3G permettant le transfert tardif. Par contre, l'explication la plus plausible concernant le zymosan est que l'augmentation que l'on voit en transfert tardif est en fait le résultat du transfert précoce qui est plus abondant, particulièrement pour les cellules exposées à ce ligand. Cette interprétation peut se faire en analysant les résultats de l'infection directe des DC maturées par les virus R5. En effet, tous les stimuli sans exception diminuent la permissivité des DC à l'infection virale par les virus R5 (figure 19B). Donc, le transfert tardif devrait être aussi diminué. Par conséquent, le graphique montrant le transfert au jour 6 pour les virus R5 n'est en fait que la combinaison des effets de la diminution de l'infection des DC et l'augmentation du transfert précoce à la suite de différents stimuli. Si on analyse davantage les graphiques du transfert au jour 6 avec et sans EFV, on remarque que les tendances sont identiques à l'exception des DC immatures. En effet, l'EFV bloque l'infections des DC immatures (figure 17 D) alors qu'en absence de la drogue, l'infection est favorable par le virus R5. Les PAMP peuvent également réduire l'infection en absence d'EFV pour les virus R5 et donc le transfert tardif (figure 17 C). L'effet par les PAMP illustré à la figure 17C suit la même tendance que la figure 17D. Par contre pour les DC immatures, lesquelles sont permissives à l'infection, le

graphique sans EFV (figure 17C) montre une plus grande quantité de p24 que celui avec EFV (figure 17C) et c'est pourquoi les augmentations suites à l'exposition des DC aux divers ligands semblent moins prononcées.

6.3 Effet du poly I:C sur la capacité des DC à transférer le VIH-1 aux LyT CD4+ quiescents

Le poly I:C est un ligand dont l'action ressemble à ce qui est enclenché lors d'une infection virale puisque c'est un analogue de l'ARN double brin et qu'il est reconnu par le TLR3. Certaines données dans la littérature ont rapporté sensiblement les mêmes effets que le LPS concernant la capacité des DC matures à transférer le virus de tropisme R5 aux LyT CD4+ activés en présence du poly I:C.

Nos résultats montrent par contre que le poly I:C inhibe fortement le transfert tardif et n'a aucun effet sur le transfert précoce et ce, chez les 2 tropismes de virus. D'autre part, l'infection des virus R5 est fortement inhibé dans les DC matures par le poly I:C. La stimulation de TLR3 induit de façon moindre l'expression du CXCR4 ce qui pourrait expliquer l'absence d'infection productive par le virus X4. Une équipe a d'ailleurs démontré que, à la suite de la maturation des DC par le poly I:C et le TNF- α , la fusion du virus X4 était diminuée et que le processus était plus lent ce qui corrèle avec nos résultats démontrant l'absence de transfert tardif (88). Cependant, nos résultats pourraient paraître en contradiction avec une autre étude (248). Cette dernière affirme que, après une maturation par le poly I:C, il y a une augmentation du transfert précoce. Plusieurs différences au niveau expérimental peuvent expliquer cette divergence de résultats. Tout d'abord, ils utilisent une concentration de ligands 2X supérieure à la nôtre et stimulent les DC plus longtemps, soit durant 48 heures. Ils utilisent également des LyT CD4+ activés, ces derniers étant plus rapidement et facilement infectés. Il est possible que la libération de facteurs solubles antiviraux affectent davantage les LyT CD4+ quiescentes et bloquent l'infection dès l'entrée du virus dans le cytosol.

En fait, il est bien connu qu'une stimulation du TLR3 induit la sécrétion d'interférons de type 1 (α et β), molécules reconnues pour leur activité antivirale. Une étude a déjà démontré son impact sur l'infection productive à la suite d'une stimulation de 2 heures du

TLR4 par le LPS (247). La stimulation du TLR3 étant de 24 heures dans notre expérience, il se peut que l'action de l'IFN bloque l'infection des DC empêchant le transfert tardif. Par contre, puisque nous n'observons pas d'effet sur le transfert précoce alors il serait étonnant qu'il y ait la libération d'IFN de type 1 au moment de l'ajout des lymphocytes T CD4+. Probablement que l'effet majeur se passe au niveau de la DC. D'autre part, même si le LPS induit la voie de l'interféron via le TLR4, nous n'observons pas le même effet que le poly I:C, du moins pour 2 donneurs sur quatre dans le cas du virus X4. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le poly I:C est internalisé et stimule le TLR3 à l'intérieur d'endosomes alors que le LPS stimule le TLR4 en surface. Lors des expériences, 2 lavages au PBS ont été effectués afin d'enlever les ligands dans le milieu. Le LPS présent dans le surnageant fut alors éliminé alors que le poly I:C est demeuré dans les endosomes des cellules. Il est donc possible que l'action du poly I:C soit prolongée par rapport au LPS. Une quantification de l'IFN α/β dans le surnageant de la coculture à différents temps serait nécessaire pour valider cette hypothèse. Par ailleurs, d'autres facteurs peuvent expliquer l'effet du poly I:C, notamment la présence d'APOBEC3G. En effet, une autre étude a récemment mis en évidence l'augmentation d'APOBEC3G, facteur de restriction cellulaire, après stimulation du TLR3 chez les cellules de Langherans (270). Des expériences supplémentaires seront toutefois nécessaires afin de quantifier APOBEC3G dans notre système in vitro.

Perspectives

À court terme, nous envisageons de vérifier tout d'abord l'effet divergent des ligands du TLR4, du TLR5 (flagelline) et du NOD-2 (PGN) afin de confirmer leur influence sur le transfert viral. En raison d'un problème technique, nous n'avons pas pu établir de conclusions quant à leur influence sur le transfert. De plus, étant donné que notre modèle de transfert implique une double stimulation du TLR8 par le VIH-1 et d'un autre récepteur de l'immunité innée par le ligand sélectionné, nous désirons quantifier le niveau de CXCR4 ainsi que de CCR5 lors de la double stimulation puisque nous avons seulement quantifié que le niveau induit par les ligands sélectionnées. Il sera également nécessaire de quantifier les étapes de transcription inverse par PCR en temps réel afin de vérifier si la stimulation par les divers ligands a un effet sur la réaction de transcription inverse. De plus, il sera également nécessaire de mesurer le niveau d'activation et de prolifération des LyT CD4+ suite à leur contact avec les différentes DC maturées.

Il faudra aussi répéter l'expérience quantifiant les transcrits de cytokines produits par les DC suivant leur stimulation par les ligands. En effet, trois à quatre expériences seront nécessaires afin d'établir la tendance quant au profil de maturation des DC. Il serait également pertinent de quantifier la pro-IL-18 et l'IL12p35. Il serait de plus intéressant de quantifier les transcrits des facteurs de transcription et les cytokines qui sont spécifiques aux différents sous-types de CD4+ suivant leur contact avec les différentes DC maturées. Pour finir, il sera important de quantifier les cytokines dans les surnageants de chaque condition. La technique du Luminex nous permettra de quantifier plusieurs cytokines à la fois dans un même échantillon.

À la suite de ces expériences, il serait intéressant d'étudier la différenciation des LyT CD4+ induite après leur contact avec les différentes DC maturées et de vérifier si les stimuli pourraient engendrer des sous-types de LyT CD4+ susceptibles à l'infection par le VIH-1. Comme mentionné à la section 1.3.1, une équipe canadienne a déjà démontré une différence de susceptibilité au VIH-1 entre ces différents sous-types de LyT CD4+. Cependant, plusieurs études ont récemment mis en évidence la difficulté de différencier de façon parfaite un sous-type de LyT CD4+ par rapport à un autre chez l'humain (271). La différenciation ne serait pas irréversible et selon un article plus récent, il y aurait également

des intermédiaires de différenciation tel que Th1Th17 sécrétant à la fois de l'IFN- γ et de l'IL-23 (77).

Conclusion

Bien que la recherche sur le VIH-1 ait grandement progressé, beaucoup de travail reste à faire. Afin d'élaborer de nouveaux antiviraux et de découvrir un jour un vaccin, il est important de mieux comprendre la biologie du virus, sa transmission et sa pathogénèse. Ceci passe entre autres par la compréhension de l'effet des coinfections et de la translocation microbienne. Ces derniers causant l'hyperactivation du système immunitaire, il est important d'étudier le rôle des produits microbiens sur la maturation des DC et d'investiguer leurs effets lors de l'infection et du transfert du VIH-1.

Ce projet a démontré l'impact important que peuvent avoir certains produits microbiens, particulièrement ceux engageant la signalisation du TLR2. En effet, ces ligands causent une augmentation du transfert tardif du virus de tropisme X4 en plus d'une augmentation du transfert précoce dans le cas du virus de tropisme R5. Le transfert tardif implique une infection productive de la DC. L'augmentation de l'expression du CXCR4 due à la maturation pourrait expliquer cette infection. Toutefois, très peu d'études se sont intéressées jusqu'à maintenant à l'infection et au transfert du virus X4. À la lumière des résultats présentés, la maturation par certains PAMP pourrait favoriser l'émergence de la souche X4 chez les individus porteurs des virions R5 et X4.

Nous avons également démontré que la stimulation du TLR3 réduit le transfert des deux tropismes de virus, alors que celle du TLR3 et du TLR4 diminue significativement l'infection des DC par le tropisme R5. La signalisation enclenchée par le TLR3 et TLR4 mène à l'activation de la voie de l'interféron de type I. L'INF- α et β sécrétés pourraient inhiber l'infection virale observée.

En conclusion, ces travaux mettent en lumière l'importance de traiter de façon précoce et efficace les co-infections afin de réduire la quantité de PAMP libérés dans le sang et les tissus et ainsi diminuer l'activation du système immunitaire. Le transfert et la dissémination du virus pourraient alors être freinés.

Bibliographie

1. Marx, P. A., C. Apetrei, and E. Drucker. 2004. AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. *J Med Primatol* 33:220-226.
2. Bailes, E., F. Gao, F. Bibollet-Ruche, V. Courgnaud, M. Peeters, P. A. Marx, B. H. Hahn, and P. M. Sharp. 2003. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 300:1713.
3. Corbet, S., M. C. Muller-Trutwin, P. Versmisse, S. Delarue, A. Ayouba, J. Lewis, S. Brunak, P. Martin, F. Brun-Vezinet, F. Simon, F. Barre-Sinoussi, and P. Mauclore. 2000. env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol* 74:529-534.
4. Fomsgaard, A., M. C. Muller-Trutwin, O. Diop, J. Hansen, C. Mathiot, S. Corbet, F. Barre-Sinoussi, and J. S. Allan. 1997. Relation between phylogeny of African green monkey CD4 genes and their respective simian immunodeficiency virus genes. *J Med Primatol* 26:120-128.
5. Chitnis, A., D. Rawls, and J. Moore. 2000. Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:5-8.
6. ONUSIDA. 2008. Le point sur l'épidémie de SIDA, rapport 2008, <http://www.unaids.org/fr/default.asp>.
7. Canada, A. d. l. s. p. d. 2008. Sommaire – Estimations de la Prévalence et de l'Incidence du VIH au Canada, Site consulté le 16 mars 2010, <http://www.phac-aspc.gc.ca/aids-sida/publication/survreport/estimat08-fra.php>
8. Canada, A. d. l. s. p. d. 2009. Le VIH et le sida au Canada-Rapport de surveillance en date du 31 décembre 2008, <http://www.phac-aspc.gc.ca/aids-sida/publication/survreport/2008/dec/pdf/survrepdec08.pdf>, site consulté le 17 mars 2010.
9. Québec, I. n. d. s. p. d. 2010. Surveillance des infections transmissibles sexuellement et par le sang, <http://www.inspq.qc.ca/publications/notice.asp?E=p&NumPublication=1063>, site consulté le 17 mars 2010.
10. Levy, J. A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 57:183-289.
11. Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon. 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326:662-669.
12. Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-346.
13. Holmes, E. C. 2001. On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). *Biol Rev Camb Philos Soc* 76:239-254.
14. Bodelle, P., A. Vallari, R. Coffey, C. P. McArthur, M. Beyeme, S. G. Devare, G. Schochetman, and C. A. Brennan. 2004. Identification and genomic sequence of an

- HIV type 1 group N isolate from Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:902-908.
15. Mauclore, P., I. Loussert-Ajaka, F. Damond, P. Fagot, S. Souquieres, M. Monny Lobe, F. X. Mbopi Keou, F. Barre-Sinoussi, S. Saragosti, F. Brun-Vezinet, and F. Simon. 1997. Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *Aids* 11:445-453.
 16. Wikipédia. 2005. Le virus de l'immunodéficience humaine, site visité le 17 mars 2010.
 17. Starnes, M. C., and Y. C. Cheng. 1989. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated RNase H activity. *J Biol Chem* 264:7073-7077.
 18. Standford, U. d. 2005. Human Immunodeficiency Virus (HIV): A Global Pandemic, site consulté le 17 mars 2010.
 19. Seelamgari, A., A. Maddukuri, R. Berro, C. de la Fuente, K. Kehn, L. Deng, S. Dadgar, M. E. Bottazzi, E. Ghedin, A. Pumfery, and F. Kashanchi. 2004. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* 9:2388-2413.
 20. Andersen, J. L., and V. Planelles. 2005. The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res* 3:43-51.
 21. Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman. 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7311-7315.
 22. Kino, T., A. Gragerov, A. Valentin, M. Tsopanomihalou, G. Ilyina-Gragerova, R. Erwin-Cohen, G. P. Chrousos, and G. N. Pavlakis. 2005. Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. *J Virol* 79:2780-2787.
 23. Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin, and J. M. Orenstein. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 64:621-629.
 24. Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* 66:226-234.
 25. Khan, M. A., S. Kao, E. Miyagi, H. Takeuchi, R. Goila-Gaur, S. Opi, C. L. Gipson, T. G. Parslow, H. Ly, and K. Strebel. 2005. Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J Virol* 79:5870-5874.
 26. Yu, X., Y. Yu, B. Liu, K. Luo, W. Kong, P. Mao, and X. F. Yu. 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302:1056-1060.
 27. Chowers, M. Y., C. A. Spina, T. J. Kwoh, N. J. Fitch, D. D. Richman, and J. C. Guatelli. 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol* 68:2906-2914.
 28. Garcia, J. V., and A. D. Miller. 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 350:508-511.

29. Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J. M. Heard. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2:338-342.
30. Antoni, B. A., A. B. Rabson, A. Kinter, M. Bodkin, and G. Poli. 1994. NF-kappa B-dependent and -independent pathways of HIV activation in a chronically infected T cell line. *Virology* 202:684-694.
31. Van Lint, C., C. A. Amella, S. Emiliani, M. John, T. Jie, and E. Verdin. 1997. Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol* 71:6113-6127.
32. Berkhout, B., R. H. Silverman, and K. T. Jeang. 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59:273-282.
33. Stowell, D. 2006. Protein binding sites in the LTR, <http://www.mclcd.co.uk/hiv/?q=Protein%20binding%20sites%20in%20the%20LTR>, site consulté en mars 2010.
34. Sattentau, Q. J. 1992. CD4 activation of HIV fusion. *Int J Cell Cloning* 10:323-332.
35. Sattentau, Q. J., and J. P. Moore. 1993. The role of CD4 in HIV binding and entry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 342:59-66.
36. Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-666.
37. Alkhatib, G., S. S. Ahuja, D. Light, S. Mummidi, E. A. Berger, and S. K. Ahuja. 1997. CC chemokine receptor 5-mediated signaling and HIV-1 Co-receptor activity share common structural determinants. Critical residues in the third extracellular loop support HIV-1 fusion. *J Biol Chem* 272:19771-19776.
38. Alkhatib, G., E. A. Berger, P. M. Murphy, and J. E. Pease. 1997. Determinants of HIV-1 coreceptor function on CC chemokine receptor 3. Importance of both extracellular and transmembrane/cytoplasmic regions. *J Biol Chem* 272:20420-20426.
39. Bjorndal, A., H. Deng, M. Jansson, J. R. Fiore, C. Colognesi, A. Karlsson, J. Albert, G. Scarlatti, D. R. Littman, and E. M. Fenyo. 1997. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 71:7478-7487.
40. Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85:1149-1158.
41. Rucker, J., B. J. Doranz, A. L. Edinger, D. Long, J. F. Berson, and R. W. Doms. 1997. Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Methods Enzymol* 288:118-133.
42. Rucker, J., A. L. Edinger, M. Sharron, M. Samson, B. Lee, J. F. Berson, Y. Yi, B. Margulies, R. G. Collman, B. J. Doranz, M. Parmentier, and R. W. Doms. 1997. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 71:8999-9007.

43. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270:1811-1815.
44. Blanpain, C., F. Libert, G. Vassart, and M. Parmentier. 2002. CCR5 and HIV infection. *Receptors Channels* 8:19-31.
45. Luster, A. D. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14:129-135.
46. Phillips, R., and A. Ager. 2002. Activation of pertussis toxin-sensitive CXCL12 (SDF-1) receptors mediates transendothelial migration of T lymphocytes across lymph node high endothelial cells. *Eur J Immunol* 32:837-847.
47. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, A. Cara, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1996. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 2:1244-1247.
48. Coffin, J. M. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267:483-489.
49. Scarlatti, G., E. Tresoldi, A. Bjornald, R. Fredriksson, C. Colognesi, H. K. Deng, M. S. Malnati, A. Plebani, A. G. Siccardi, D. R. Littman, E. M. Fenyo, and P. Lusso. 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 3:1259-1265.
50. Mild, M., A. Kvist, J. Esbjornsson, I. Karlsson, E. M. Fenyo, and P. Medstrand. 2009. Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection. *Infect Genet Evol.*
51. Harman, A. N., J. Wilkinson, C. R. Bye, L. Bosnjak, J. L. Stern, M. Nicholle, J. Lai, and A. L. Cunningham. 2006. HIV induces maturation of monocyte-derived dendritic cells and Langerhans cells. *J Immunol* 177:7103-7113.
52. Hu, J., M. B. Gardner, and C. J. Miller. 2000. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol* 74:6087-6095.
53. Lehner, T., L. Hussain, J. Wilson, and M. Chapman. 1991. Mucosal transmission of HIV. *Nature* 353:709.
54. Schuitemaker, H., M. Koot, N. A. Kootstra, M. W. Dercksen, R. E. de Goede, R. P. van Steenwijk, J. M. Lange, J. K. Schattenkerk, F. Miedema, and M. Tersmette. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytoprotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 66:1354-1360.
55. Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391:240.
56. Burger, H., and D. Hoover. 2008. HIV-1 tropism, disease progression, and clinical management. *J Infect Dis* 198:1095-1097.
57. Peters, P. J., J. Bhattacharya, S. Hibbitts, M. T. Dittmar, G. Simmons, J. Bell, P. Simmonds, and P. R. Clapham. 2004. Biological analysis of human immunodeficiency virus type 1 R5 envelopes amplified from brain and lymph node tissues of AIDS patients with neuropathology reveals two distinct tropism phenotypes and identifies envelopes in the brain that confer an enhanced tropism and fusogenicity for macrophages. *J Virol* 78:6915-6926.

58. De Silva, F. S., D. S. Venturini, E. Wagner, P. R. Shank, and S. Sharma. 2001. CD4-independent infection of human B cells with HIV type 1: detection of unintegrated viral DNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1585-1598.
59. Livingstone, W. J., M. Moore, D. Innes, J. E. Bell, and P. Simmonds. 1996. Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. *Lancet* 348:649-654.
60. Liu, Y., H. Liu, B. O. Kim, V. H. Gattone, J. Li, A. Nath, J. Blum, and J. J. He. 2004. CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol* 78:4120-4133.
61. Al-Harhi, L., L. J. Guilbert, J. A. Hoxie, and A. Landay. 2002. Trophoblasts are productively infected by CD4-independent isolate of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:13-17.
62. Kitchen, S. G., C. H. Uittenbogaart, and J. A. Zack. 1997. Mechanism of human immunodeficiency virus type 1 localization in CD4-negative thymocytes: differentiation from a CD4-positive precursor allows productive infection. *J Virol* 71:5713-5722.
63. Akbar, A. N., L. Terry, A. Timms, P. C. Beverley, and G. Janosy. 1988. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 140:2171-2178.
64. Merckenschlager, M., L. Terry, R. Edwards, and P. C. Beverley. 1988. Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur J Immunol* 18:1653-1661.
65. Macallan, D. C., D. Wallace, Y. Zhang, C. De Lara, A. T. Worth, H. Ghattas, G. E. Griffin, P. C. Beverley, and D. F. Tough. 2004. Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *J Exp Med* 200:255-260.
66. Iezzi, G., D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia. 2001. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 193:987-993.
67. Kunkel, E. J., J. Boisvert, K. Murphy, M. A. Vierra, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, H. B. Greenberg, M. R. Hodge, L. Wu, E. C. Butcher, and J. J. Campbell. 2002. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol* 160:347-355.
68. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
69. Cayota, A., F. Vuillier, D. Scott-Algara, and G. Dighiero. 1990. Preferential replication of HIV-1 in memory CD4+ subpopulation. *Lancet* 336:941.
70. Cayota, A., F. Vuillier, D. Scott-Algara, V. Feuillie, and G. Dighiero. 1993. Differential requirements for HIV-1 replication in naive and memory CD4 T cells from asymptomatic HIV-1 seropositive carriers and AIDS patients. *Clin Exp Immunol* 91:241-248.
71. Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387:183-188.

72. Spina, C. A., H. E. Prince, and D. D. Richman. 1997. Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest* 99:1774-1785.
73. Stout, R. D., and J. Suttles. 1992. T cells bearing the CD44hi "memory" phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle. *Cell Immunol* 141:433-443.
74. Hermankova, M., J. D. Siliciano, Y. Zhou, D. Monie, K. Chadwick, J. B. Margolick, T. C. Quinn, and R. F. Siliciano. 2003. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo. *J Virol* 77:7383-7392.
75. Brechley, J. M., B. J. Hill, D. R. Ambrozak, D. A. Price, F. J. Guenaga, J. P. Casazza, J. Kuruppu, J. Yazdani, S. A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup. 2004. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* 78:1160-1168.
76. Pierson, T., T. L. Hoffman, J. Blankson, D. Finzi, K. Chadwick, J. B. Margolick, C. Buck, J. D. Siliciano, R. W. Doms, and R. F. Siliciano. 2000. Characterization of chemokine receptor utilization of viruses in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 74:7824-7833.
77. Gosselin, A., P. Monteiro, N. Chomont, F. Diaz-Griffero, E. A. Said, S. Fonseca, V. Wacleche, M. El-Far, M. R. Boulassel, J. P. Routy, R. P. Sekaly, and P. Ancuta. Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J Immunol* 184:1604-1616.
78. Brechley, J. M., M. Paiardini, K. S. Knox, A. I. Asher, B. Cervasi, T. E. Asher, P. Scheinberg, D. A. Price, C. A. Hage, L. M. Kholi, A. Khoruts, I. Frank, J. Else, T. Schacker, G. Silvestri, and D. C. Douek. 2008. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112:2826-2835.
79. Oswald-Richter, K., S. M. Grill, M. Leelawong, M. Tseng, S. A. Kalams, T. Hulan, D. W. Haas, and D. Unutmaz. 2007. Identification of a CCR5-expressing T cell subset that is resistant to R5-tropic HIV infection. *PLoS Pathog* 3:e58.
80. Penna, G., M. Vulcano, S. Sozzani, and L. Adorini. 2002. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63:1164-1171.
81. de Jong, E. C., H. H. Smits, and M. L. Kapsenberg. 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 26:289-307.
82. Diebold, S. S. 2009. Activation of dendritic cells by toll-like receptors and C-type lectins. *Handb Exp Pharmacol*:3-30.
83. Smed-Sorensen, A., K. Lore, J. Vasudevan, M. K. Louder, J. Andersson, J. R. Mascola, A. L. Spetz, and R. A. Koup. 2005. Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* 79:8861-8869.
84. Kuwana, M., J. Kaburaki, T. M. Wright, Y. Kawakami, and Y. Ikeda. 2001. Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* 31:2547-2557.
85. Fonteneau, J. F., M. Gilliet, M. Larsson, I. Dasilva, C. Munz, Y. J. Liu, and N. Bhardwaj. 2003. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a

- new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 101:3520-3526.
86. Salio, M., M. J. Palmowski, A. Atzberger, I. F. Hermans, and V. Cerundolo. 2004. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med* 199:567-579.
 87. Patterson, S., A. Rae, N. Hockey, J. Gilmour, and F. Gotch. 2001. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* 75:6710-6713.
 88. Cavrois, M., J. Neidleman, J. F. Kreisberg, D. Fenard, C. Callebaut, and W. C. Greene. 2006. Human immunodeficiency virus fusion to dendritic cells declines as cells mature. *J Virol* 80:1992-1999.
 89. Delgado, E., V. Finkel, M. Baggiolini, C. R. Mackay, R. M. Steinman, and A. Granelli-Piperno. 1998. Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several beta-chemokines. *Immunobiology* 198:490-500.
 90. Sozzani, S., W. Luini, A. Borsatti, N. Polentarutti, D. Zhou, L. Piemonti, G. D'Amico, C. A. Power, T. N. Wells, M. Gobbi, P. Allavena, and A. Mantovani. 1997. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 159:1993-2000.
 91. Cavrois, M., J. Neidleman, J. F. Kreisberg, and W. C. Greene. 2007. In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathog* 3:e4.
 92. Yamamoto, T., Y. Tsunetsugu-Yokota, Y. Y. Mitsuki, F. Mizukoshi, T. Tsuchiya, K. Terahara, Y. Inagaki, N. Yamamoto, K. Kobayashi, and J. Inoue. 2009. Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathog* 5:e1000279.
 93. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28:2760-2769.
 94. Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Katura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, and A. Mantovani. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161:1083-1086.
 95. Verani, A., G. Gras, and G. Pancino. 2005. Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol* 42:195-212.
 96. Igakura, T., J. C. Stinchcombe, P. K. Goon, G. P. Taylor, J. N. Weber, G. M. Griffiths, Y. Tanaka, M. Osame, and C. R. Bangham. 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299:1713-1716.
 97. Jolly, C., K. Kashefi, M. Hollinshead, and Q. J. Sattentau. 2004. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* 199:283-293.
 98. Davis, A. J., P. Li, and C. J. Burrell. 1997. Kinetics of viral RNA synthesis following cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 78 (Pt 8):1897-1906.
 99. Tsunetsugu-Yokota, Y., S. Yasuda, A. Sugimoto, T. Yagi, M. Azuma, H. Yagita, K. Akagawa, and T. Takemori. 1997. Efficient virus transmission from dendritic cells

- to CD4⁺ T cells in response to antigen depends on close contact through adhesion molecules. *Virology* 239:259-268.
100. McDonald, D., L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, and T. J. Hope. 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300:1295-1297.
 101. Fais, S., M. R. Capobianchi, I. Abbate, C. Castilletti, M. Gentile, P. Cordiali Fei, F. Ameglio, and F. Dianzani. 1995. Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *Aids* 9:329-335.
 102. Curtis, B. M., S. Scharnowske, and A. J. Watson. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8356-8360.
 103. Lambert, A. A., C. Gilbert, M. Richard, A. D. Beaulieu, and M. J. Tremblay. 2008. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 112:1299-1307.
 104. Frank, I., M. Piatak, Jr., H. Stoessel, N. Romani, D. Bonnyay, J. D. Lifson, and M. Pope. 2002. Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs. *J Virol* 76:2936-2951.
 105. Yu, H. J., M. A. Reuter, and D. McDonald. 2008. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog* 4:e1000134.
 106. Hladik, F., and M. J. McElrath. 2008. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* 8:447-457.
 107. Ganesh, L., K. Leung, K. Lore, R. Levin, A. Panet, O. Schwartz, R. A. Koup, and G. J. Nabel. 2004. Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies. *J Virol* 78:11980-11987.
 108. Jolly, C., I. Mitar, and Q. J. Sattentau. 2007. Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells. *J Virol* 81:13916-13921.
 109. Cavrois, M., J. Neidleman, and W. C. Greene. 2008. The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog* 4:e1000051.
 110. Arkwright, P. D., F. Luchetti, J. Tour, C. Roberts, R. Ayub, A. P. Morales, J. J. Rodriguez, A. Gilmore, B. Canonico, S. Papa, and M. D. Esposito. Fas stimulation of T lymphocytes promotes rapid intercellular exchange of death signals via membrane nanotubes. *Cell Res* 20:72-88.
 111. Belting, M., and A. Wittrup. 2008. Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 183:1187-1191.
 112. Sowinski, S., C. Jolly, O. Berninghausen, M. A. Purbhoo, A. Chauveau, K. Kohler, S. Oddos, P. Eissmann, F. M. Brodsky, C. Hopkins, B. Onfelt, Q. Sattentau, and D. M. Davis. 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 10:211-219.

113. Sherer, N. M., M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, C. Horensavitz, M. Pypaert, and W. Mothes. 2007. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell Biol* 9:310-315.
114. Thery, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena. 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 147:599-610.
115. Izquierdo-Useros, N., M. Naranjo-Gomez, I. Erkizia, M. C. Puertas, F. E. Borrás, J. Blanco, and J. Martínez-Picado. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog* 6:e1000740.
116. Izquierdo-Useros, N., M. Naranjo-Gomez, J. Archer, S. C. Hatch, I. Erkizia, J. Blanco, F. E. Borrás, M. C. Puertas, J. H. Connor, M. T. Fernández-Figueras, L. Moore, B. Clotet, S. Gummuluru, and J. Martínez-Picado. 2009. Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 113:2732-2741.
117. Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, S. Munier, P. Souque, S. Guadagnini, S. Rutherford, M. C. Prevost, T. D. Allen, and P. Charneau. 2007. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J* 26:3025-3037.
118. Briones, M. S., C. W. Dobard, and S. A. Chow. The Role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase in the Uncoating of the Viral Core. *J Virol*.
119. Warrilow, D., L. Meredith, A. Davis, C. Burrell, P. Li, and D. Harrich. 2008. Cell factors stimulate human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in vitro. *J Virol* 82:1425-1437.
120. O'Brien, W. A., A. Namazi, H. Kalhor, S. H. Mao, J. A. Zack, and I. S. Chen. 1994. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in blood mononuclear phagocytes are slowed by limitations of nucleotide precursors. *J Virol* 68:1258-1263.
121. Zack, J. A., S. J. Arrigo, S. R. Weitsman, A. S. Go, A. Haislip, and I. S. Chen. 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61:213-222.
122. Gallay, P., T. Hope, D. Chin, and D. Trono. 1997. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9825-9830.
123. von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, and D. Trono. 1994. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6992-6996.
124. Farnet, C. M., and W. A. Haseltine. 1991. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol* 65:1910-1915.
125. Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71:5382-5390.

126. Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau. 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173-185.
127. Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1989. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2525-2529.
128. Fujiwara, T., and K. Mizuuchi. 1988. Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell* 54:497-504.
129. Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521-529.
130. Wu, X., Y. Li, B. Crise, S. M. Burgess, and D. J. Munroe. 2005. Weak palindromic consensus sequences are a common feature found at the integration target sites of many retroviruses. *J Virol* 79:5211-5214.
131. Kelly, J., M. H. Beddall, D. Yu, S. R. Iyer, J. W. Marsh, and Y. Wu. 2008. Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology* 372:300-312.
132. Wu, Y., and J. W. Marsh. 2001. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* 293:1503-1506.
133. Quivy, V., and C. Van Lint. 2002. Diversity of acetylation targets and roles in transcriptional regulation: the human immunodeficiency virus type 1 promoter as a model system. *Biochem Pharmacol* 64:925-934.
134. Ono, A., and E. O. Freed. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13925-13930.
135. Bieniasz, P. D. 2009. The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* 5:550-558.
136. Stuchell, M. D., J. E. Garrus, B. Muller, K. M. Stray, S. Ghaffarian, R. McKinnon, H. G. Krausslich, S. G. Morham, and W. I. Sundquist. 2004. The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem* 279:36059-36071.
137. Waheed, A. A., and E. O. Freed. 2009. Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus Res* 143:162-176.
138. Graham, D. R., E. Chertova, J. M. Hilburn, L. O. Arthur, and J. E. Hildreth. 2003. Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. *J Virol* 77:8237-8248.
139. Liao, Z., D. R. Graham, and J. E. Hildreth. 2003. Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19:675-687.
140. Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, and H. G. Gottlinger. 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372:363-365.
141. Svarovskaia, E. S., H. Xu, J. L. Mbisa, R. Barr, R. J. Gorelick, A. Ono, E. O. Freed, W. S. Hu, and V. K. Pathak. 2004. Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* 279:35822-35828.

142. Adamson, C. S., and E. O. Freed. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Adv Pharmacol* 55:347-387.
143. Ivanchenko, S., W. J. Godinez, M. Lampe, H. G. Krausslich, R. Eils, K. Rohr, C. Brauchle, B. Muller, and D. C. Lamb. 2009. Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog* 5:e1000652.
144. Maher, D., X. Wu, T. Schacker, J. Horbul, and P. Southern. 2005. HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11504-11509.
145. Kahn, J. O., and B. D. Walker. 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339:33-39.
146. Daar, E. S., S. Little, J. Pitt, J. Santangelo, P. Ho, N. Harawa, P. Kerndt, J. V. Glorgi, J. Bai, P. Gaut, D. D. Richman, S. Mandel, and S. Nichols. 2001. Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network. *Ann Intern Med* 134:25-29.
147. Lindback, S., A. C. Karlsson, J. Mittler, A. Blaxhult, M. Carlsson, G. Briheim, A. Sonnerborg, and H. Gaines. 2000. Viral dynamics in primary HIV-1 infection. Karolinska Institutet Primary HIV Infection Study Group. *Aids* 14:2283-2291.
148. Buchbinder, S., and E. Vittinghoff. 1999. HIV-infected long-term nonprogressors: epidemiology, mechanisms of delayed progression, and clinical and research implications. *Microbes Infect* 1:1113-1120.
149. Mellors, J. W., C. R. Rinaldo, Jr., P. Gupta, R. M. White, J. A. Todd, and L. A. Kingsley. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272:1167-1170.
150. Brechley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12:1365-1371.
151. Jarmuz, A., A. Chester, J. Bayliss, J. Gisbourne, I. Dunham, J. Scott, and N. Navaratnam. 2002. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79:285-296.
152. Strebel, K., J. Luban, and K. T. Jeang. 2009. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med* 7:48.
153. Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono. 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424:99-103.
154. Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim. 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9:1404-1407.
155. Wu, X., J. L. Anderson, E. M. Campbell, A. M. Joseph, and T. J. Hope. 2006. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7465-7470.
156. Yap, M. W., M. P. Dodding, and J. P. Stoye. 2006. Trim-cyclophilin A fusion proteins can restrict human immunodeficiency virus type 1 infection at two distinct phases in the viral life cycle. *J Virol* 80:4061-4067.
157. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Garland science, Taylor & Francis Group, New York.

158. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
159. Annunziato, F., and S. Romagnani. 2009. Heterogeneity of human effector CD4⁺ T cells. *Arthritis Res Ther* 11:257.
160. Eyerich, S., K. Eyerich, D. Pennino, T. Carbone, F. Nasorri, S. Pallotta, F. Cianfarani, T. Odorisio, C. Traidl-Hoffmann, H. Behrendt, S. R. Durham, C. B. Schmidt-Weber, and A. Cavani. 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119:3573-3585.
161. Kader, M., X. Wang, M. Piatak, J. Lifson, M. Roederer, R. Veazey, and J. J. Mattapallil. 2009. Alpha4(+)-beta7(hi)CD4(+) memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal Immunol* 2:439-449.
162. Raffatellu, M., R. L. Santos, D. E. Verhoeven, M. D. George, R. P. Wilson, S. E. Winter, I. Godinez, S. Sankaran, T. A. Paixao, M. A. Gordon, J. K. Kolls, S. Dandekar, and A. J. Baumler. 2008. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med* 14:421-428.
163. Zhu, J., and W. E. Paul. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112:1557-1569.
164. Estes, J. D., Q. Li, M. R. Reynolds, S. Wietgrefe, L. Duan, T. Schacker, L. J. Picker, D. I. Watkins, J. D. Lifson, C. Reilly, J. Carlis, and A. T. Haase. 2006. Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 193:703-712.
165. Nilsson, J., A. Boasso, P. A. Velilla, R. Zhang, M. Vaccari, G. Franchini, G. M. Shearer, J. Andersson, and C. Chougnet. 2006. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 108:3808-3817.
166. Kinter, A. L., M. Hennessey, A. Bell, S. Kern, Y. Lin, M. Daucher, M. Planta, M. McGlaughlin, R. Jackson, S. F. Ziegler, and A. S. Fauci. 2004. CD25(+)-CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 200:331-343.
167. Aandahl, E. M., J. Michaelsson, W. J. Moretto, F. M. Hecht, and D. F. Nixon. 2004. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 78:2454-2459.
168. Mitsuya, H., K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, and S. Broder. 1985. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7096-7100.
169. Fischl, M. A., D. D. Richman, M. H. Grieco, M. S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. E. Groopman, D. Mildvan, R. T. Schooley, and et al. 1987. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS

- and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 317:185-191.
170. Williams, A. B. 1997. New horizons: antiretroviral therapy in 1997. *J Assoc Nurses AIDS Care* 8:26-38.
 171. Ogert, R. A., Y. Hou, L. Ba, L. Wojcik, P. Qiu, N. Murgolo, J. Duca, L. M. Dunkle, R. Ralston, and J. A. Howe. Clinical resistance to vicriviroc through adaptive V3 loop mutations in HIV-1 subtype D gp120 that alter interactions with the N-terminus and ECL2 of CCR5. *Virology* 400:145-155.
 172. Pett, S. L., A. D. Kelleher, and S. Emery. Role of interleukin-2 in patients with HIV infection. *Drugs* 70:1115-1130.
 173. Walker, B. D., and D. R. Burton. 2008. Toward an AIDS vaccine. *Science* 320:760-764.
 174. Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
 175. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
 176. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
 177. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
 178. Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell, and S. Ghosh. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-1526.
 179. Bowie, A., and L. A. O'Neill. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67:508-514.
 180. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
 181. Kawai, T., and S. Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825.
 182. Seya, T., K. Funami, M. Taniguchi, and M. Matsumoto. 2005. Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. *J Endotoxin Res* 11:369-374.
 183. Underhill, D. M. 2007. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunol Rev* 219:75-87.
 184. Kawai, T., and S. Akira. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
 185. Doyle, S., S. Vaidya, R. O'Connell, H. Dadgostar, P. Dempsey, T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. Haberland, R. Modlin, and G. Cheng. 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17:251-263.
 186. Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Muhlrad, S. Sato, K. Hoshino, and S. Akira. 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167:5887-5894.

187. Trinchieri, G., and A. Sher. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.
188. Ting, J. P., and B. K. Davis. 2005. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* 23:387-414.
189. Inohara, N., T. Koseki, L. del Peso, Y. Hu, C. Yee, S. Chen, R. Carrio, J. Merino, D. Liu, J. Ni, and G. Nunez. 1999. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 274:14560-14567.
190. Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka, and G. Nunez. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276:4812-4818.
191. Hayden, M. S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18:2195-2224.
192. Martinon, F., and J. Tschopp. 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* 26:447-454.
193. Monie, T. P., C. E. Bryant, and N. J. Gay. 2009. Activating immunity: lessons from the TLRs and NLRs. *Trends Biochem Sci* 34:553-561.
194. Strober, W., P. J. Murray, A. Kitani, and T. Watanabe. 2006. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6:9-20.
195. Invivogen. 2010. Nod-Like Receptors, site consulté le 3 mai 2010.
196. Gutierrez, O., C. Pipaon, N. Inohara, A. Fontalba, Y. Ogura, F. Prosper, G. Nunez, and J. L. Fernandez-Luna. 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 277:41701-41705.
197. Chamailard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez, and N. Inohara. 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4:702-707.
198. Pauleau, A. L., and P. J. Murray. 2003. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol* 23:7531-7539.
199. Rosenstiel, P., M. Fantini, K. Brautigam, T. Kuhbacher, G. H. Waetzig, D. Seegert, and S. Schreiber. 2003. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124:1001-1009.
200. Bertrand, M. J., K. Doiron, K. Labbe, R. G. Korneluk, P. A. Barker, and M. Saleh. 2009. Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity* 30:789-801.
201. Inohara, N., T. Koseki, J. Lin, L. del Peso, P. C. Lucas, F. F. Chen, Y. Ogura, and G. Nunez. 2000. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 275:27823-27831.
202. Hasegawa, M., Y. Fujimoto, P. C. Lucas, H. Nakano, K. Fukase, G. Nunez, and N. Inohara. 2008. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo J* 27:373-383.
203. Reardon, C., and T. W. Mak. 2009. cIAP proteins: keystones in NOD receptor signal transduction. *Immunity* 30:755-756.
204. Schroder, K., and J. Tschopp. The inflammasomes. *Cell* 140:821-832.

205. Brown, G. D., and S. Gordon. 2001. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413:36-37.
206. Figdor, C. G., Y. van Kooyk, and G. J. Adema. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2:77-84.
207. Tsoni, S. V., and G. D. Brown. 2008. beta-Glucans and dectin-1. *Ann N Y Acad Sci* 1143:45-60.
208. Taylor, P. R., G. D. Brown, D. M. Reid, J. A. Willment, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, and S. Y. Wong. 2002. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169:3876-3882.
209. Ariizumi, K., G. L. Shen, S. Shikano, S. Xu, R. Ritter, 3rd, T. Kumamoto, D. Edelbaum, A. Morita, P. R. Bergstresser, and A. Takashima. 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* 275:20157-20167.
210. Brown, G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 6:33-43.
211. Saijo, S., N. Fujikado, T. Furuta, S. H. Chung, H. Kotaki, K. Seki, K. Sudo, S. Akira, Y. Adachi, N. Ohno, T. Kinjo, K. Nakamura, K. Kawakami, and Y. Iwakura. 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 8:39-46.
212. Taylor, P. R., S. V. Tsoni, J. A. Willment, K. M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon, and G. D. Brown. 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 8:31-38.
213. Goodridge, H. S., R. M. Simmons, and D. M. Underhill. 2007. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 178:3107-3115.
214. Underhill, D. M., E. Rosnagle, C. A. Lowell, and R. M. Simmons. 2005. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 106:2543-2550.
215. Kankkunen, P., L. Teirila, J. Rintahaka, H. Alenius, H. Wolff, and S. Matikainen. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol* 184:6335-6342.
216. Martinon, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol* 40:616-619.
217. Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6:769-776.
218. Wolfert, M. A., T. F. Murray, G. J. Boons, and J. N. Moore. 2002. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J Biol Chem* 277:39179-39186.
219. van Heel, D. A., S. Ghosh, M. Butler, K. Hunt, B. M. Foxwell, D. Mengin-Lecreulx, and R. J. Playford. 2005. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur J Immunol* 35:2471-2476.
220. Dillon, S., S. Agrawal, K. Banerjee, J. Letterio, T. L. Denning, K. Oswald-Richter, D. J. Kasprovicz, K. Kellar, J. Pare, T. van Dyke, S. Ziegler, D. Unutmaz, and B. Pulendran. 2006. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces

- regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116:916-928.
221. Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 197:1107-1117.
 222. Dennehy, K. M., J. A. Willment, D. L. Williams, and G. D. Brown. 2009. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol* 39:1379-1386.
 223. Cohen, M. S., and W. C. Miller. 1998. Sexually transmitted diseases and human immunodeficiency virus infection: cause, effect, or both? *Int J Infect Dis* 3:1-4.
 224. Corbett, E. L., R. W. Steketee, F. O. ter Kuile, A. S. Latif, A. Kamali, and R. J. Hayes. 2002. HIV-1/AIDS and the control of other infectious diseases in Africa. *Lancet* 359:2177-2187.
 225. Kaul, R., J. Kimani, N. J. Nagelkerke, K. Fonck, E. N. Ngugi, F. Keli, K. S. MacDonald, I. W. Maclean, J. J. Bwayo, M. Temmerman, A. R. Ronald, and S. Moses. 2004. Monthly antibiotic chemoprophylaxis and incidence of sexually transmitted infections and HIV-1 infection in Kenyan sex workers: a randomized controlled trial. *Jama* 291:2555-2562.
 226. Zhang, J., G. Li, A. Bafica, M. Pantelic, P. Zhang, H. Broxmeyer, Y. Liu, L. Wetzler, J. J. He, and T. Chen. 2005. *Neisseria gonorrhoeae* enhances infection of dendritic cells by HIV type 1. *J Immunol* 174:7995-8002.
 227. Levine, W. C., V. Pope, A. Bhoomkar, P. Tambe, J. S. Lewis, A. A. Zaidi, C. E. Farshy, S. Mitchell, and D. F. Talkington. 1998. Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with nonulcerative sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 177:167-174.
 228. Chen, A., I. C. Boulton, J. Pongoski, A. Cochrane, and S. D. Gray-Owen. 2003. Induction of HIV-1 long terminal repeat-mediated transcription by *Neisseria gonorrhoeae*. *Aids* 17:625-628.
 229. Ding, J., A. Rapista, N. Teleshova, G. Mosoyan, G. A. Jarvis, M. E. Klotman, and T. L. Chang. *Neisseria gonorrhoeae* enhances HIV-1 infection of primary resting CD4+ T cells through TLR2 activation. *J Immunol* 184:2814-2824.
 230. Samaranayake, L. P. 1992. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73:171-180.
 231. Samaranayake, L. P., and P. Holmstrup. 1989. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J Oral Pathol Med* 18:554-564.
 232. Challacombe, S. J., and J. R. Naglik. 2006. The effects of HIV infection on oral mucosal immunity. *Adv Dent Res* 19:29-35.
 233. Klein, R. S., C. A. Harris, C. B. Small, B. Moll, M. Lesser, and G. H. Friedland. 1984. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 311:354-358.
 234. Gruber, A., E. Lukasser-Vogl, M. Borg-von Zepelin, M. P. Dierich, and R. Wurzner. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 gp160 and gp41 binding to *Candida albicans* selectively enhances candidal virulence in vitro. *J Infect Dis* 177:1057-1063.
 235. Sadiq, S. T., S. Taylor, A. J. Copas, J. Bennett, S. Kaye, S. M. Drake, S. Kirk, D. Pillay, and I. V. Weller. 2005. The effects of urethritis on seminal plasma HIV-1

- RNA loads in homosexual men not receiving antiretroviral therapy. *Sex Transm Infect* 81:120-123.
236. Nazli, A., O. Chan, W. N. Dobson-Belaire, M. Ouellet, M. J. Tremblay, S. D. Gray-Owen, A. L. Arsenaault, and C. Kaushic. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog* 6:e1000852.
 237. Gerrits, J. H., P. Athanassopoulos, L. M. Vaessen, M. Klepper, W. Weimar, and N. M. van Besouw. 2007. Peripheral blood manipulation significantly affects the result of dendritic cell monitoring. *Transpl Immunol* 17:169-177.
 238. Zhou, L. J., and T. F. Tedder. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154:3821-3835.
 239. Breloer, M., and B. Fleischer. 2008. CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends Immunol* 29:186-194.
 240. Geisel, J., F. Kahl, M. Muller, H. Wagner, C. J. Kirschning, I. B. Autenrieth, and J. S. Frick. 2007. IL-6 and maturation govern TLR2 and TLR4 induced TLR agonist tolerance and cross-tolerance in dendritic cells. *J Immunol* 179:5811-5818.
 241. Frick, J. S., F. Grunebach, and I. B. Autenrieth. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol* 300:19-24.
 242. Frick, J. S., N. Zahir, M. Muller, F. Kahl, O. Bechtold, M. B. Lutz, C. J. Kirschning, J. Reimann, B. Jilge, E. Bohn, and I. B. Autenrieth. 2006. Colitogenic and non-colitogenic commensal bacteria differentially trigger DC maturation and Th cell polarization: an important role for IL-6. *Eur J Immunol* 36:1537-1547.
 243. Lutz, M. B., and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23:445-449.
 244. Coleman, C. M., and L. Wu. 2009. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* 6:51.
 245. Wu, L., and V. N. KewalRamani. 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6:859-868.
 246. Dong, C., A. M. Janas, J. H. Wang, W. J. Olson, and L. Wu. 2007. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *J Virol* 81:11352-11362.
 247. Thibault, S., R. Fromentin, M. R. Tardif, and M. J. Tremblay. 2009. TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells. *Retrovirology* 6:42.
 248. Sanders, R. W., E. C. de Jong, C. E. Baldwin, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg, and B. Berkhout. 2002. Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J Virol* 76:7812-7821.
 249. Wang, J. H., A. M. Janas, W. J. Olson, and L. Wu. 2007. Functionally distinct transmission of human immunodeficiency virus type 1 mediated by immature and mature dendritic cells. *J Virol* 81:8933-8943.
 250. Fahrback, K. M., S. M. Barry, S. Ayehunie, S. Lamore, M. Klausner, and T. J. Hope. 2007. Activated CD34-derived Langerhans cells mediate transinfection with human immunodeficiency virus. *J Virol* 81:6858-6868.

251. Ogawa, Y., T. Kawamura, T. Kimura, M. Ito, A. Blauvelt, and S. Shimada. 2009. Gram-positive bacteria enhance HIV-1 susceptibility in Langerhans cells, but not in dendritic cells, via Toll-like receptor activation. *Blood* 113:5157-5166.
252. Barat, C., C. Gilbert, and M. J. Tremblay. 2009. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in resting CD4⁺ T lymphocytes is induced by coculture with autologous dendritic cells in the absence of foreign antigens. *J Virol* 83:2778-2782.
253. Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59:284-291.
254. Dornadula, G., H. Zhang, S. Shetty, and R. J. Pomerantz. 1999. HIV-1 virions produced from replicating peripheral blood lymphocytes are more infectious than those from nonproliferating macrophages due to higher levels of intravirion reverse transcripts: implications for pathogenesis and transmission. *Virology* 253:10-16.
255. Suzuki, Y., N. Misawa, C. Sato, H. Ebina, T. Masuda, N. Yamamoto, and Y. Koyanagi. 2003. Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1 DNA dynamics by real-time PCR: integration efficiency in stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virus Genes* 27:177-188.
256. Chun, T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, and A. S. Fauci. 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13193-13197.
257. Blanco, P., A. K. Palucka, V. Pascual, and J. Banchereau. 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:41-52.
258. Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, and C. J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480-483.
259. Hazenberg, M. D., J. W. Stuart, S. A. Otto, J. C. Borleffs, C. A. Boucher, R. J. de Boer, F. Miedema, and D. Hamann. 2000. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 95:249-255.
260. Valdez, H., and M. M. Lederman. 1997. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin Rev*:187-228.
261. Benwell, R. K., J. E. Hruska, K. L. Fritsche, and D. R. Lee. Double stranded RNA-relative to other TLR ligand-activated dendritic cells induce extremely polarized human Th1 responses. *Cell Immunol*.
262. Kwon, D. S., G. Gregorio, N. Bitton, W. A. Hendrickson, and D. R. Littman. 2002. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16:135-144.
263. Izquierdo-Useros, N., J. Blanco, I. Erkizia, M. T. Fernandez-Figueras, F. E. Borrás, M. Naranjo-Gomez, M. Bofill, L. Ruiz, B. Clotet, and J. Martinez-Picado. 2007. Maturation of blood-derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type 1 capture and transmission. *J Virol* 81:7559-7570.

264. Garcia, E., M. Pion, A. Pelchen-Matthews, L. Collinson, J. F. Arrighi, G. Blot, F. Leuba, J. M. Escola, N. Demaurex, M. Marsh, and V. Piguet. 2005. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* 6:488-501.
265. Wang, J. H., C. Wells, and L. Wu. 2008. Macropinocytosis and cytoskeleton contribute to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission to CD4+ T cells. *Virology* 381:143-154.
266. Felts, R. L., K. Narayan, J. D. Estes, D. Shi, C. M. Trubey, J. Fu, L. M. Hartnell, G. T. Ruthel, D. K. Schneider, K. Nagashima, J. W. Bess, Jr., S. Bavari, B. C. Lowekamp, D. Bliss, J. D. Lifson, and S. Subramaniam. 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.
267. de Jong, M. A., L. de Witte, M. J. Oudhoff, S. I. Gringhuis, P. Gallay, and T. B. Geijtenbeek. 2008. TNF-alpha and TLR agonists increase susceptibility to HIV-1 transmission by human Langerhans cells ex vivo. *J Clin Invest* 118:3440-3452.
268. Viriyakosol, S., J. Fierer, G. D. Brown, and T. N. Kirkland. 2005. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun* 73:1553-1560.
269. Pion, M., A. Granelli-Piperno, B. Mangeat, R. Stalder, R. Correa, R. M. Steinman, and V. Piguet. 2006. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med* 203:2887-2893.
270. Renn, C. N., D. J. Sanchez, M. T. Ochoa, A. J. Legaspi, C. K. Oh, P. T. Liu, S. R. Krutzik, P. A. Sieling, G. Cheng, and R. L. Modlin. 2006. TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J Immunol* 177:298-305.
271. Zhou, L., M. M. Chong, and D. R. Littman. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30:646-655.