

GENEVIÈVE MARTIN

**ÉTUDE MÉCANISTIQUE ET FONCTIONNELLE DE
L'ACQUISITION DES MOLÉCULES HLA-DR ET
CD40L PAR LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE
HUMAINE DE TYPE 1**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en microbiologie-immunologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE MÉDICALE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2007

Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) cause quotidiennement 14 000 nouvelles infections et 8 000 décès (1). Certes, les antirétroviraux actuels aident le système immunitaire des porteurs du VIH à contenir le virus. Néanmoins, ils sont inefficaces pour guérir l'infection vu l'intégration du génome viral dans celui de la personne infectée. Ainsi, la prévention de l'infection demeure, en ce moment, la meilleure arme dont nous disposons contre ce rétrovirus. La connaissance du cycle de réplication du VIH-1 constitue la pierre angulaire de la conception de médicaments et d'outils de prévention. C'est pourquoi nous en étudions des étapes encore peu définies comme le bourgeonnement, et plus particulièrement l'incorporation de molécules d'origine cellulaire dans l'enveloppe virale. Les résultats présentés dans cette thèse montrent que des isolats cliniques du VIH-1 acquièrent les molécules HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD86 et CD40L des cellules qu'ils infectent dans des modèles de culture de cellules reflétant au mieux la réalité du corps humain, telles des cultures *ex vivo* de portions d'amygdales palatines. Par le fait même, nous sommes les premiers à mentionner la présence de CD40L dans l'enveloppe du VIH-1. Également, nos résultats relatifs à l'appropriation des protéines cellulaires HLA-DR et CD40L par ce virus prouvent que celle-ci découle d'un mécanisme indépendant des glycoprotéines de l'enveloppe virale. Nos résultats démontrent aussi que les lymphocytes B d'amygdales palatines sont activés suite à la sollicitation de leur récepteur CD40 par la molécule CD40L insérée dans l'enveloppe du VIH-1. Ainsi, la translocation de NF- κ B au noyau de ces cellules est induite, de même que la sécrétion d'anticorps IgG et d'IL-6 et l'adhésion cellulaire homotypique. La molécule CD40L permet au virus de mieux se lier aux lymphocytes B qui le transmettent par ailleurs aux lymphocytes T CD4+. Enfin, caractériser davantage le mécanisme d'acquisition de molécules de l'hôte par le VIH-1 et son impact sur la pathogenèse associée au virus contribuera peut-être à identifier des molécules pouvant être ciblées par une nouvelle thérapie, voire une immunisation.

Abstract

Ever since mankind faced human immunodeficiency virus (HIV), advances in research have been compromised by many difficulties, some of them being related to the complexity of the virus. Because HIV causes 14 000 new infections and 8 000 deaths daily (1), we must work intensely to fight this pathogen. Although antiretroviral drugs help the immune system of HIV-infected individuals to contain the virus, these drugs are ineffective to cure the infection, considering that the viral genome is integrated within the host genome. Thus, the best way to fight HIV infection at this point is to prevent it. The design of new therapies and prevention tools rely on our knowledge of the replication cycle of HIV. Therefore, we study steps of the viral cycle that are less defined, such as budding, and particularly the incorporation of molecules of cellular origin in the viral envelope. The results we present in this thesis show that host-derived HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD86 and CD40L molecules are acquired by clinical isolates of HIV-1 produced in the most natural culture models, such as pieces of palatine tonsils cultured *ex vivo*. Moreover, we are the first to report the CD40L molecule as being part of HIV-1's envelope. Also, our results indicate that incorporation of host HLA-DR and CD40L is independent of viral envelope glycoproteins. Furthermore, our results show that B lymphocytes from tonsils are activated following the binding of their CD40 receptor by the CD40L molecule inserted in the envelope of HIV-1. The translocation of NF- κ B to the nucleus of cells is then induced, as for the secretion of IgG antibodies, production of IL-6 and homotypic cell-to-cell adhesion. The CD40L protein facilitates binding of virions to B lymphocytes which transfer them to T CD4+ lymphocytes. In the future, further investigation of the mechanism of HIV-1 host molecule incorporation and its impact on HIV-1 pathogenesis may help in the identification of new molecules being able to be targeted by a new therapy or immunization.

Avant-Propos

Tout au long de mes études graduées, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes extraordinaires à qui je tiens à adresser mes plus sincères remerciements. J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Michel J. Tremblay, pour la confiance qu'il m'a témoignée, pour son dynamisme, sa générosité, ainsi que sa grande disponibilité. Je salue les membres de son équipe, actuels et passés, et plus particulièrement les membres du Centre de Recherche en Infectiologie avec lesquels j'ai développé une belle amitié. Merci à tous ceux du Centre Hospitalier de l'Université Laval qui un jour m'ont aidé dans mon travail.

Je remercie aussi le Dr Caroline Gilbert et le Dr Réjean Cantin pour les discussions intellectuelles, ainsi que le Dr Jacques Bernier, le Dr Guy Lemay et le Dr Patrick Provost pour l'évaluation de cette thèse. Je veux également remercier le Dr Adrien R. Beaudoin pour ses conseils et la complicité qui caractérise notre amitié, ainsi que le Dr Emannelle Grundmann pour les informations fournies en primatologie.

J'aimerais souligner l'apport financier que j'ai eu des Instituts de Recherche en Santé du Canada et de la Fédération Canadienne des Femmes Diplômées des Universités.

Merci à ma famille et à mes amis pour leur encouragement. Je remercie tout spécialement David pour son soutien inestimable, ainsi que mes parents Reine et Ghislain pour leur appui et pour être de si beaux modèles de persévérance.

Enfin, voici quelques précisions quant à ma contribution dans la production de chacun des articles contenus dans cette thèse.

Article du chapitre 3 : Martin, G., and Tremblay, M.J. «HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L and CD86 are incorporated to a similar degree into clinical human immunodeficiency virus type 1 variants expanded in natural reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured ex vivo», publié dans *Clinical Immunology* 2004 111(3): 275-85 (Planification et exécution des expériences : 95%, interprétation des résultats et rédaction du manuscrit : 80%).

Article du chapitre 4 : Martin, G., Beauséjour, Y., Thibodeau, J., and Tremblay, M.J. «Envelope glycoproteins are dispensable for insertion of host HLA-DR molecules within nascent human immunodeficiency virus type 1 particles», publié dans *Virology* 2005 335(2): 286-90 (Planification et exécution des expériences : 95%, interprétation des résultats et rédaction du manuscrit : 85%).

Article du chapitre 5 : Martin, G., Roy, J., Barat, C., Ouellet, M., Gilbert, C., and Tremblay, M.J. «Human Immunodeficiency Virus Type 1-Associated CD40 Ligand Transactivates B Lymphocytes and Promotes Infection of CD4⁺ T Cells», publié dans *Journal of Virology* 2007 81(11): 5872-81 (Planification et exécution des expériences : 85%, interprétation des résultats et rédaction du manuscrit : 90%).

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Avant-Propos.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Chapitre 1. Le virus de l'immunodéficience humaine.....	1
1.1 Épidémiologie de l'infection au VIH.....	1
1.2 Origines du VIH.....	2
1.3 Description du VIH-1.....	4
1.4 Cycle réplicatif du VIH-1.....	6
1.4.1 Attachement, entrée et décapsidation du VIH-1.....	7
1.4.2 Importation au noyau, rétrotranscription et intégration du génome du VIH-1.....	14
1.4.3 Transcription et export nucléaire des ARNm du VIH-1.....	21
1.4.4 Traduction des ARNm du VIH-1.....	24
1.4.5 Assemblage, bourgeonnement et maturation du VIH-1.....	28
1.5 Pathogenèse de l'infection au VIH-1.....	36
1.5.1 Transit du VIH-1 dans le corps humain.....	36
1.5.2 Phases de l'infection au VIH-1.....	42
1.5.3 Phénotype viral au cours de l'infection.....	44
1.5.4 Types cellulaires touchés.....	45
1.5.5 Rôles des molécules d'origine cellulaire en surface du virus dans la pathogenèse au VIH-1.....	51
1.6 Lutte contre l'infection au VIH-1.....	53
1.6.1 Prévention.....	53
1.6.2 Traitement antirétroviral.....	54
Chapitre 2. Molécules d'origine cellulaire à l'étude.....	57
2.1 ICAM-1 et CD86.....	58
2.2 HLA-DR, CD40 et CD40L.....	58
2.2.1 HLA-DR, un isotype du CMH.....	58
2.2.2 La molécule CD40.....	62
2.2.3 La molécule CD40L.....	64
2.2.4 Fonctions biologiques de l'interaction de la molécule CD40L avec le récepteur CD40.....	66
Chapitre 3. Insertion des molécules HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L et CD86 dans l'enveloppe de souches cliniques du VIH-1 s'étant répliquées dans des cellules mononucléées du sang périphérique ou dans des cultures d'amygdales.....	68
3.1 Particularités de certaines méthodes utilisées dans l'étude.....	68
3.2 L'étude.....	69
3.2.1 Résumé de l'article.....	70
3.2.2 Article.....	70
Chapitre 4. Les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 ne sont pas nécessaires à l'insertion de la molécule HLA-DR de l'hôte dans l'enveloppe virale.....	106

4.1 Particularités de certaines méthodes utilisées dans l'étude	106
4.2 L'étude	106
4.2.1 Résumé de l'article	106
4.2.2 Article	107
4.3 Résultat complémentaire.....	124
Chapitre 5. Effets sur les lymphocytes B d'amygdales de l'insertion de la molécule CD40L de l'hôte dans l'enveloppe du VIH-1	125
5.1 Particularités de certaines méthodes utilisées dans l'étude	125
5.2 L'étude	125
5.2.1 Résumé de l'article	126
5.2.2 Article	127
Chapitre 6. Discussion, contributions et avenues futures	168
6.1 Discussion.....	168
6.2 Contributions	176
6.3 Avenues futures	177
Bibliographie	181

*On fait la science avec des faits
comme on fait une maison avec
des pierres : mais une accumulation
de faits n'est pas plus une science
qu'un tas de pierres n'est une maison*

H. Poincaré

Liste des tableaux

Tableau 1. Fonctions biologiques de la liaison du récepteur CD40.

Liste des figures

- Figure 1. Structure morphologique du VIH-1.
- Figure 2. Génome du VIH-1.
- Figure 3. Modèle représentant un complexe formé de la PDI, du CD4 et de la gp120.
- Figure 4. Modèle expliquant le changement de conformation induit par la PDI qui mène à l'activation de la gp41.
- Figure 5. Le processus de rétrotranscription.
- Figure 6. Structure du CPI.
- Figure 7. Structure des précurseurs de l'ADN proviral.
- Figure 8. Étapes précoces (*early*) et tardives (*late*) du cycle de réplication du VIH-1.
- Figure 9. Établissement de l'infection au VIH dans les ganglions lymphatiques suite à l'exposition initiale des cellules des muqueuses au VIH.
- Figure 10. Structure d'une amygdale humaine et composition cellulaire des différents compartiments de l'amygdale.
- Figure 11. Commutation de classe vers IgG1.
- Figure 12. Synapse immunologique entre une CPA et un lymphocyte T CD4+ naïf.
- Figure 13. Transport des molécules du CMH de classe II vers la surface cellulaire.
- Figure 14. Structure des molécules du CMH de classe II.
- Figure 15. Organisation génomique et protéique de CD40 chez l'humain.
- Figure 16. Organisation génomique et protéique de CD40L chez l'humain.
- Figure 17. Événements de signalisation menant à l'activation de la transcription du gène CD40L.
- Figure 18. Amygdales humaines.
- Figure 19. Schéma du protocole d'ultrafiltration par centrifugation et d'immunocapture.
- Figure 20. Présence de HLA-DR dans l'enveloppe des pseudovirions formés par la polyprotéine Pr160^{GagPol} humanisée, elle-même codée par le plasmide hGagPol.
- Figure 21. Schéma du protocole de purification des cellules mononucléées d'amygdales.
- Figure 22. La molécule CD40L (CD154) induit la formation de trimères du récepteur CD40.

Liste des abréviations

ADN	acide dosoxyribonucléique
AID	<i>activation-induced deaminase</i>
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
C	région conservée
CA	capside
CCR	<i>chemokine, CC motif, receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHR	<i>C-terminal heptad repeat</i>
CIITA	<i>class II transactivator</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CPI	complexe de pré-intégration
CRT	complexe de rétrotranscription
CSPG	<i>chondroitin sulfate proteoglycan</i>
C _x	gène de la région constante x des chaînes lourdes des immunoglobulines
CXCR	<i>chemokine, CXC motif, receptor</i>
D	domaine
DC-SIGN	<i>dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin</i>
DDDP	<i>DNA-dependent DNA polymerase</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
Env	<i>envelope glycoproteins</i>
Gag	<i>group-specific antigen</i>
GalCer	galactosyl céramide
gp	glycoprotéine
GPI	glycosylphosphatidylinositol

HEV	<i>high endothelial venule</i>
hGagPol	protéine GagPol humanisée
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HTLV	<i>human T-lymphotropic virus</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
Ii	chaîne invariante du CMH de classe II
IκB	<i>inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B cells</i>
IL	interleukine
IN	intégrase
JAK	<i>Janus-activated kinase</i>
L	ligand
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MA	matrice
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIIC	<i>MHC class II-enriched compartments</i>
NC	nucléocapside
Nef	<i>negative effector</i>
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells</i>
NHR	<i>N-terminal heptad repeat</i>
NK	<i>natural killer</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P</i>	<i>probability value</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>primer binding site</i>
pcDNA	<i>cDNA plasmid</i>
PDI	<i>protein disulfide isomerase</i>

[PI(4,5)P ₂]	phosphatidyl inositol (4,5) biphosphate
PIC	<i>preintegration complex</i>
Pol	<i>polymerase</i>
PPT	<i>polypurine tract</i>
Pr	précurseur
PR	protéase
R	<i>repeated</i>
RANTES	<i>regulated upon activation normally T-expressed, and presumably secreted</i>
RDDP	<i>RNA-dependent DNA polymerase</i>
RE	réticulum endoplasmique
Rev	<i>regulator of viral gene expression</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase H	ribonucléase H
RT	rétrotranscriptase
RTC	<i>retrotranscription complex</i>
sCD40L	<i>soluble CD40 ligand</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SIV _{cpz}	souche <i>chimpanzee</i> du SIV
SIV _{sm}	souche <i>Sooty mangabey</i> du SIV
SP1	<i>specificity protein 1</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SU	surface
S _x	région <i>switch</i> du gène de la région constante x des chaînes lourdes des immunoglobulines
Tat	<i>trans-activator of transcription</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TM	transmembranaire
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
Tsg101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
U3	<i>unique 3' sequence</i>

U5	<i>unique 5' sequence</i>
V	région variable
Vif	<i>virion infectivity factor</i>
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
Vpr	<i>viral protein R</i>
Vpu	<i>viral protein U</i>

Chapitre 1. Le virus de l'immunodéficience humaine

1.1 Épidémiologie de l'infection au VIH

Selon un récent rapport du Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA), le VIH infecte près d'une quarantaine de millions d'enfants, de femmes et d'hommes partout sur la planète (1). La majorité des cas d'infection au VIH se trouvent en Afrique subsaharienne : sur dix enfants de moins de 15 ans porteurs du virus dans le monde, neuf vivent dans cette région, ainsi que les trois quarts de toutes les femmes de 15 ans et plus infectées par cet agent viral (1). Tandis que le nombre de personnes atteintes par le VIH a dernièrement baissé en certains endroits comme au Kenya, au Zimbabwe et dans quelques régions de l'Inde, il continue d'augmenter dans plusieurs pays dont la Chine, l'Indonésie et le Vietnam (1). Aussi, on estimait en 2005 à 58 000 le nombre de personnes vivant avec le VIH au Canada, ce qui représente, par rapport à 2002, une augmentation d'environ 16% (2).

Depuis l'avènement, en 1996, du traitement antirétroviral hautement actif, qui consiste en une association d'au moins trois thérapies antirétrovirales (3), on a pu constater un ralentissement de la progression de l'infection au VIH vers le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et du SIDA vers la mort. Malheureusement, étant donné que cette thérapie améliore la qualité de vie des patients et diminue la transmission du virus des mères infectées à leurs enfants, beaucoup de personnes vivant dans des pays où est accessible un tel traitement croient, à tort, que cet arsenal thérapeutique peut guérir l'infection au VIH. Avoir ce genre de croyance engendre des comportements à risque et on observe ainsi une recrudescence, non seulement des cas d'infection au VIH, mais des infections transmises sexuellement en général, comme rapporté par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (4).

Les campagnes de prévention étant moins favorisées de nos jours, la population connaît peu les modes de transmission du virus, ce qui contribue aussi à l'augmentation du nombre

d'infections. Il faut savoir qu'aujourd'hui, à l'échelle planétaire, le VIH est transmis dans 80% des cas lors d'une relation hétérosexuelle à risque (1) et que les rapports homosexuels non protégés, la voie parentérale et, dans une proportion moindre, la transmission verticale constituent les autres principaux modes de propagation du virus. Fait à noter, le mode de transmission prédominant du VIH peut varier d'une région du monde à une autre et même dans le temps pour un pays donné. Aux États-Unis, par exemple, pendant que la transmission homosexuelle du VIH prédomine depuis le début de l'épidémie, l'usage de drogues intraveineuses constituait le deuxième mode de transmission le plus fréquent jusqu'en 2001-2004 pour être devancé aujourd'hui par la transmission hétérosexuelle (5).

Enfin, rappelons que l'infection au VIH cause une atteinte du système immunitaire qui évolue lentement vers la mort et qui engendre de lourdes conséquences tant sur les plans individuel que social. Pensons notamment au nombre croissant d'orphelins, à la diminution de l'espérance de vie dans plusieurs pays et à l'augmentation des cas d'autres maladies infectieuses comme la tuberculose et le paludisme (1).

1.2 Origines du VIH

Le VIH est l'agent causal du SIDA, l'une des plus importantes maladies infectieuses auxquelles fait face l'humanité, et se présente sous deux formes, le VIH de type 1 et le VIH de type 2 (VIH-1 et VIH-2, respectivement). Le VIH-2 est moins pathogène et moins répandu que le VIH-1 (6), mais surtout, ces virus diffèrent par leur génome (le gène *vpu* est unique au VIH-1, alors que seul le VIH-2 possède le gène *vpx*) et leurs caractéristiques phylogéniques. En effet, le VIH-2 est génétiquement très près du lentivirus appelé virus de l'immunodéficience simienne (*simian immunodeficiency virus* (SIV)). Ainsi, plusieurs isolats de VIH-2 et de SIV_{sm} ont des séquences nucléotidiques pratiquement identiques, ce qui renforce l'hypothèse que le VIH aurait été transmis aux humains par des singes (7), et qu'il s'agirait donc d'une zoonose (révisé dans (8) (9) (10)). De fait, plus de 30 espèces de primates en Afrique subsaharienne sont infectées par l'une ou l'autre des souches de SIV, et habituellement aucune maladie n'afflige l'hôte naturel d'une souche donnée (11). On

pense donc qu'en Afrique de l'Ouest, le SIV se serait adapté au mangabey fuligineux (*Cercocebus torquatus atys*), résultant en la souche SIV_{sm}. Cette souche aurait ensuite été transmise à l'humain au moins six fois au cours de l'humanité (révisé dans (8)), et aurait alors évolué en VIH-2. La séquence de la souche SIV_{cpz} du chimpanzé d'Afrique centrale (*Pan troglodytes troglodytes*) est, quant à elle, la plus proche du VIH-1. Des chimpanzés auraient acquis deux souches de SIV venant d'espèces différentes de singes qui, par recombinaison, auraient formé la souche SIV_{cpz} (12). Cette souche aurait été transmise à des humains à au moins trois occasions dans l'histoire, et elle aurait ainsi évolué en VIH-1 (11). Certaines pratiques anciennes et communes en Afrique - comme la chasse des singes et des chimpanzés, la consommation de leur viande, ainsi que la garde de leurs petits comme animaux de compagnie (13) - pourraient avoir favorisé la transmission de souches de SIV aux humains (9).

La comparaison des séquences de nucléotides d'isolats de VIH-1 a permis de les séparer en trois groupes - chacun étant issu d'une des trois transmissions entre espèces - soit le groupe M (*main*), le groupe O (*outlier*) et le groupe N (*non M-non O*) (14). Au sein de chaque groupe, existent des sous types appelés *clades* (7). Le groupe M comprend les sous types A-D, F-H, J et K (15), ainsi que 14 formes recombinantes circulantes (*circulating recombinant form* (CRF)) (16), dont l'ancien sous type E est maintenant désigné CRF01AE (17). En République démocratique du Congo, la diversité génétique du VIH-1 a été étudiée et il appert que l'Afrique centrale est en fait l'épicentre du VIH-1 du groupe M (14). L'apparition de ce groupe remonterait à 1959 et la transmission entre espèce qui en est responsable se serait produite avant les années 1920-1930 (10). On sait aujourd'hui que les groupes M et N sont issus de populations de chimpanzés du Cameroun isolées géographiquement et on pense que le groupe O viendrait du Gabon (18). Il est plausible que le manque d'hygiène lors des campagnes de vaccination, entre autres contre la poliomyélite, et que les changements socioculturels radicaux qu'a subit l'Afrique pendant le siècle dernier aient contribué à la propagation du VIH et ce, bien longtemps après sa transmission à l'espèce humaine (10).

En juin 1981, débute une nouvelle ère avec la publication de cinq cas d'hommes homosexuels trentenaires atteints de pneumonie à *Pneumocystis*, une affection inusitée pour

de jeunes adultes sans immunosuppression apparente (19). Dès lors, paraissent de nombreux articles portant sur divers aspects d'une affection récemment découverte que l'on nomme SIDA. Il y est question, entre autres choses, de la transmission de cette maladie (20) et du nombre croissant de victimes qu'elle cause (21). Deux années passent, puis Françoise Barré-Sinoussi, du laboratoire de Luc Montagnier, découvre le rétrovirus responsable du SIDA (22). Les groupes de Robert Gallo (23) et Jay Levy (24) isolèrent l'année suivante le même agent infectieux. En 1986, on donne le nom de VIH au pathogène, puis de VIH-1 suite à la découverte, également par le groupe de Montagnier, du VIH-2 (25).

1.3 Description du VIH-1

De morphologie sphérique et mesurant environ 100 nm, les particules matures (virions) de VIH-1 (figure 1) sont enveloppées d'une bicouche lipidique jonchée de spicules formés des glycoprotéines de surface (SU) gp120 et transmembranaire (TM) gp41. Puisque cette bicouche provient de la membrane plasmique de la cellule infectée, on retrouve des molécules d'origine cellulaire, comme certains antigènes de leucocytes humains (*human leukocyte antigen* (HLA)), à la surface virale (voir sections 1.4.5.1.5, 1.4.5.1.5.1 et 1.5.5 pour de plus amples informations). Immédiatement sous l'enveloppe, se trouve la matrice (MA) composée de la protéine p17, et plus en profondeur, la p6 et la capsid (CA) conique constituée de la protéine p24 et qui regroupe les enzymes rétrotranscriptase (RT), intégrase (IN) et protéase (PR), ainsi que le génome. Le VIH-1 est ainsi classé dans la famille *Retroviridae* de par son activité rétrotranscriptase et fait partie du genre *lentivirinae*, en référence à l'évolution lente des pathologies qu'il cause. Récemment, le Comité International de Taxonomie des Virus a regroupé les genres de la famille *Retroviridae* en rétrovirus dits simples (alpharétrovirus, betarétrovirus et gammarétrovirus) et en rétrovirus dits complexes (deltarétrovirus, epsilon-rétrovirus, lentivirus et spumavirus). Le génome du VIH-1 est constitué de deux molécules d'ARN monocaténaire à polarité positive associées à la protéine p7 de la nucléocapside (NC), formant ainsi un complexe ribonucléoprotéique.

En plus de l'ARN viral d'environ 9 kb, on retrouve dans les particules virales de VIH-1 de l'ARN de transfert (ARNt), ribosomique (ARNr) et messenger (ARNm) d'origine cellulaire. Le génome du VIH, flanqué en ses deux extrémités par deux longues répétitions terminales (*long terminal repeat* (LTR)) comportant les régions U3 (*unique 3' sequence*), R (*repeated*) et U5 (*unique 5' sequence*), comprend les gènes *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) et *env* (*envelope glycoproteins*) (figure 2). Ces derniers sont des gènes communs aux rétrovirus. De plus, au même titre que les autres rétrovirus complexes, le VIH-1 exprime une variété d'autres gènes, en l'occurrence *tat* (*trans-activator of transcription*) et *rev* (*regulator of viral gene expression*) codant pour des protéines de régulation, ainsi que *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr* (*viral protein R*), *vpu* (*viral protein U*) et *nef* (*negative effector*) codant pour des protéines dites accessoires.

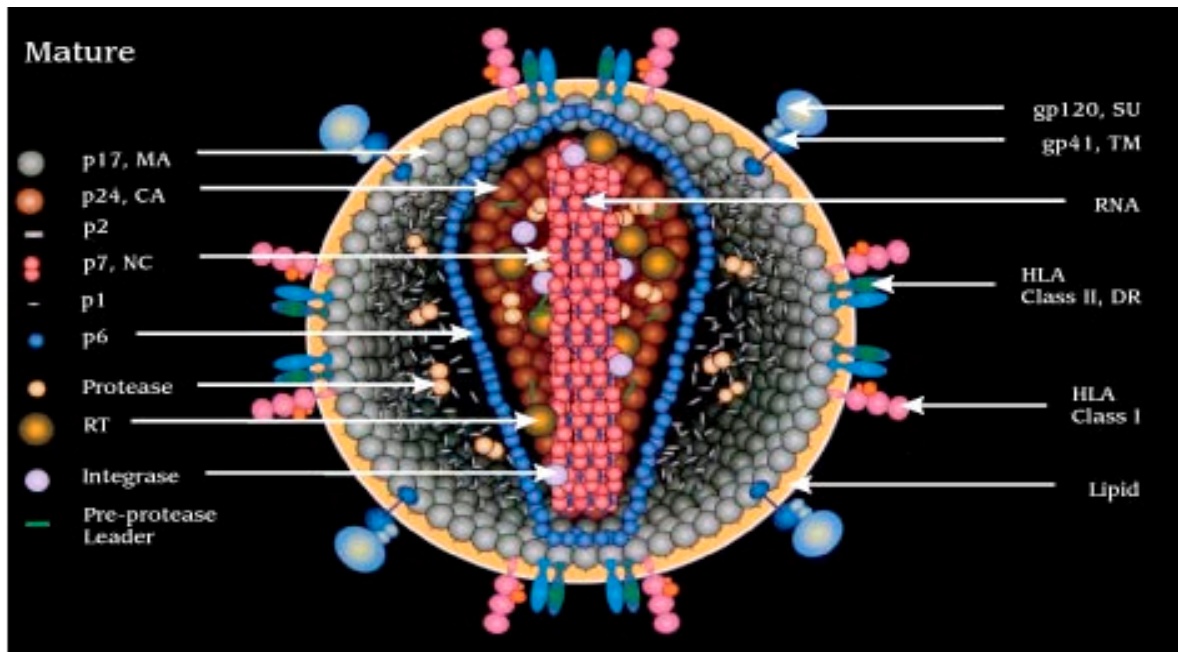


Figure 1. Structure morphologique du VIH-1 (adapté de (26)).

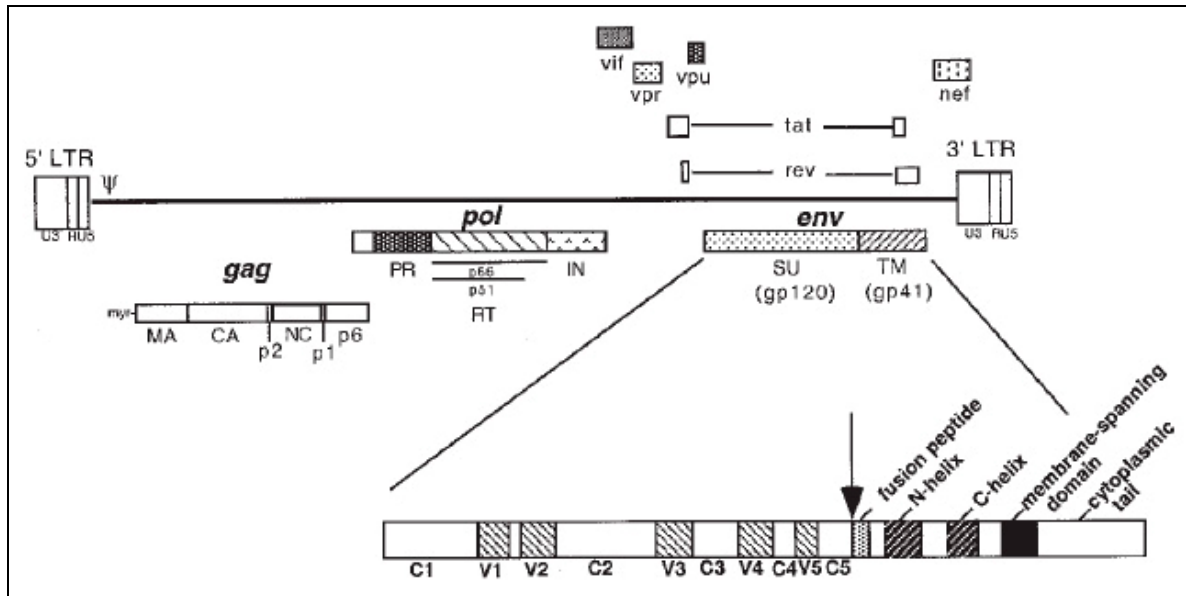


Figure 2. Génome du VIH-1. Le symbole ψ indique la position de la séquence Psi, soit le signal d'encapsidation de l'ARN. Le site de myristylation en position N-terminale de MA est noté « myr ». La représentation linéaire du produit du gène *env* est agrandie afin de montrer la disposition des principales régions conservées (C1-C5) et variables (V1-V5) de la gp120, ainsi que la disposition du peptide de fusion (*fusion peptide*), des hélices NHR (*N-helix*) et CHR (*C-helix*), du domaine transmembranaire (*membrane-spanning domain*) et de la queue cytoplasmique (*cytoplasmic tail*) de la gp41 (27).

1.4 Cycle réplcatif du VIH-1

Un virus étant un parasite obligatoire, il dépend de la machinerie cellulaire de son hôte pour se répliquer. Ainsi, sont ciblées par tous les isolats cliniques du VIH-1 décrits à ce jour, les cellules exprimant la molécule CD4 (28) et l'un ou l'autre des récepteurs de chimiokines (*chemokines*, de la contraction de *chemotactic* avec *cytokines*) nommés CXCR4 et CCR5 ou les deux (29). L'enchaînement des étapes caractéristiques du cycle de réplcation du VIH est décrit dans la présente section et illustré par la figure 8.

1.4.1 Attachement, entrée et décapsidation du VIH-1

1.4.1.1 Éléments responsables de l'attachement

1.4.1.1.1 CD4, le récepteur

Membre de la superfamille des immunoglobulines, la molécule CD4 est composée de quatre domaines extracellulaires (D1 à D4) et est principalement exprimée sur les lymphocytes T auxiliaires, mais aussi sur les macrophages et les cellules dendritiques. La glycoprotéine de surface du VIH-1 (gp120), possède par ailleurs une affinité pour la molécule CD4, qui a ainsi été désignée le récepteur primaire de ce virus (30) (31) (32).

Autrement, dans le contexte d'une présentation antigénique à des lymphocytes T CD4+, les déterminants du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH de classe II) des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) se lient au récepteur des cellules T (*T cell receptor* (TCR)) et la molécule CD4 augmente alors l'avidité de cette interaction en se liant à son tour au CMH de classe II (révisé dans (33)). Cela engendre la liaison de la tyrosine kinase p56^{lck}, associée au domaine cytoplasmique du CD4, avec les domaines cytoplasmiques du TCR et donc l'activation du lymphocyte T (34).

1.4.1.1.2 Autres ligands cellulaires du VIH-1

Une panoplie de récepteurs cellulaires autres que le CD4 et les récepteurs de chimiokines lient la gp120 du VIH. Parmi eux se trouvent la protéine de surface DC-SIGN (*dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*) (35), le glycolipide galactosylcéramide (GalCer) (voir section 1.5.1.2.1) et son dérivé sulfaté, le sulfatide (36) (37), ainsi que les glycosaminoglycanes sulfate d'héparan (38) et sulfate de chondroïtine (*chondroitin sulfate proteoglycans* (CSPG)) (39) (voir section 1.5.4.3).

Cependant, il est important de spécifier que de telles liaisons du VIH à la surface des cellules, c'est-à-dire sans l'aide de l'enveloppe virale et/ou du récepteur, mènent généralement à l'endocytose des particules virales, ce qui représente un cul-de-sac au regard de l'infection (40) (41). En effet, les particules entrant par endocytose étant dégradées par le protéasome, il n'y a pas d'infection soutenue de la cellule (42). Comme la liaison de la gp120 à DC-SIGN, par exemple, n'induit pas de changement de conformation de la glycoprotéine virale, la particule virale ainsi adsorbée est plutôt internalisée sans qu'une fusion des membranes, et donc une infection productive, ne survienne (43). Selon toute vraisemblance, une interaction directe et hâtive avec le récepteur CD4 représente le processus d'infection le plus efficace (29).

D'autre part, l'adsorption du VIH à la surface de cellules se produit également grâce aux interactions spécifiques entre des molécules d'origine cellulaire que ce virus incorpore dans son enveloppe et d'autres molécules à la surface des cellules ciblées. Ce phénomène s'applique particulièrement à l'intégrine ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) et à la molécule HLA-DR puisqu'elles augmentent l'attachement du VIH à la cellule qui exprime leur ligand, soit LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) et CD4, respectivement (44) (45).

1.4.1.1.3 CXCR4 et CCR5, les co-récepteurs

L'idée que le VIH-1 nécessite un ou des co-récepteur(s) pour entrer dans la cellule qu'il cible vient du fait que la simple expression de CD4 ne peut expliquer son affinité pour un type cellulaire donné (i.e., son tropisme) (révisé dans (46)). Les principaux co-récepteurs du VIH s'avèrent être les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR5 (révisé dans (28)), faisant partie de la superfamille de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G. CCR5 est exprimé par les lymphocytes T CD4+ dits mémoires qui sont aussi fortement positifs pour le CD45RO+, un phénotype conforme à leur activation antérieure (47). Des deux co-récepteurs, les lymphocytes T CD4+ naïfs, donc non activés, expriment surtout le CXCR4 (48). Quant aux macrophages, cellules phagocytaires qui

expriment les deux co-récepteurs, ils semblent être plus efficacement infectés par des virions utilisant le récepteur CCR5 que le CXCR4 (49).

Polypeptides au pouvoir chimioattractant, les chimiokines exercent leur rôle tantôt dans l'inflammation ou le recrutement cellulaire, tantôt dans l'angiogenèse ou le développement d'organes lymphatiques (révisé dans (50)). Elles sont classées en quatre groupes (CXC, CX₃C, CC et C) selon la disposition, près de leur région en position N-terminale, des deux premières de quatre cystéines hautement conservées. Les récepteurs de chimiokines ont été nommés selon la classe de chimiokine qu'ils lient. Ainsi, le récepteur CXCR4 lie la chimiokine CXCL12, alors que d'autres chimiokines - en l'occurrence MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 alpha*, CCL3), MIP-1 β (CCL4) et RANTES (*regulated upon activation normally T-expressed, and presumably secreted*, CCL5) - sont liées par le récepteur CCR5. Une particule de VIH-1 qui a plus d'affinité pour se lier au récepteur CXCR4 pour son entrée dans la cellule a un tropisme X4, une autre attirée par le CCR5 a un tropisme R5, alors qu'on dit d'une particule virale qui utilise les deux récepteurs de chimiokines comme co-récepteurs qu'elle a un tropisme R5X4 (51) (52).

Certains auteurs ont rapporté que d'autres récepteurs de chimiokines (tels CCR3 et CCR8) - ainsi que certains récepteurs de diverses natures comme le récepteur inflammatoire CHEMR23 (*chemerin receptor 23*), spécifique à la récemment découverte chemerine - seraient des co-récepteurs du VIH (révisé dans (52)), bien qu'utilisés de façon minoritaire (53).

1.4.1.1.4 Glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1

La surface d'une particule de VIH-1 peut être parsemée d'environ 70 à 80 spicules (54) (55) (56), soit des complexes habituellement formés de trois hétérodimères de gp120 et de gp41 (57) (58). Tandis que la gp41 est ancrée dans l'enveloppe virale par sa portion en position C-terminale, la gp120 n'est attachée au virus que par une liaison non covalente à la gp41. Cette dernière est composée de trois domaines majeurs, soit l'ectodomaine

responsable de la fusion des membranes, la séquence transmembranaire qui sert de point d'ancrage dans l'enveloppe et la queue cytoplasmique (27). Protéine hautement glycosylée, la gp120 est constituée de cinq régions variables (V1 à V5) présentant des ponts disulfures et parsemées de cinq régions relativement conservées (C1 à C5) (59) (60).

1.4.1.2 Déroulement de l'attachement, de l'entrée et de la décapsulation

Mentionnons tout d'abord que la gp120 induit la co-localisation du récepteur CD4 et du co-récepteur CXCR4 (61) et que même le seul engagement du CD4 sur des lymphocytes T humains engendre, au site de contact, l'association de CXCR4 avec les radeaux lipidiques (62). Ces derniers sont des domaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol, sphingolipides et en protéines ancrées par le glycosylphosphatidylinositol (GPI) (63). Les radeaux lipidiques représentent en quelque sorte des refuges stables au sein de la phase liquide généralement désordonnée de la membrane cellulaire et sont connus pour jouer un rôle dans la signalisation, l'endocytose, l'exocytose, ainsi que dans l'infection et le bourgeonnement viraux. Plus particulièrement, l'engagement du CD4 en ces lieux engendre des événements de signalisation par p56^{lck} qui provoquent également le recrutement de cholestérol et de molécules d'adhésion comme LFA-1 (62). Le tout n'est pas sans rappeler la synapse immunologique se formant entre une CPA et un lymphocyte T lors de la présentation antigénique et permettant la transmission de signaux entre les cellules (64) (65) (figure 12). Dans le contexte de l'infection au VIH, le phénomène observé au site de contact d'une cellule cible CD4+ avec une cellule infectée (une cellule dendritique ou un lymphocyte T) exprimant les glycoprotéines de l'enveloppe virale est nommé synapse virologique ou infectieuse (66) (67) (68) et supporte l'hypothèse de transmission du VIH de cellule à cellule (révisé dans (62)).

Lors de l'attachement viral, une poche hydrophobe de la gp120 accueille le résidu phénylalanine-43 du domaine D1 de la molécule CD4 (69) (70) (figure 3). Cette interaction engendre des changements dans la conformation de la gp120 (69) (71) (72), qui provoquent le repositionnement d'épitopes pouvant alors interagir avec les co-récepteurs du VIH-1 (73)

(figure 4). Chaque molécule de gp120 contient un site de liaison au CD4 et le simple engagement d'une glycoprotéine de surface serait par ailleurs suffisant pour induire le changement de conformation des deux autres gp120 d'un complexe donné (74).

Aussi, nous savons depuis peu qu'une oxidoréductase associée à la surface de la cellule cible, nommée *protein disulfide isomerase* (PDI), joue un rôle critique dans l'entrée du VIH (75) (76) (77) (78) (79) en se liant au domaine D3 du CD4 (figure 3). Comme le montre la figure 4, la PDI réduit les ponts disulfures qui stabilisent la structure de la gp120, ce qui initie le réarrangement structural de cette glycoprotéine, permettant son interaction ci-haut mentionnée avec le co-récepteur. Dans le cas d'une liaison au CCR5, l'interaction a lieu entre la portion en N-terminal du co-récepteur et les régions V3 et C4 de la gp120 (révisé dans (80) (81) (82)), alors que la liaison du CXCR4 à la gp120 n'est pas aussi clairement définie (80).

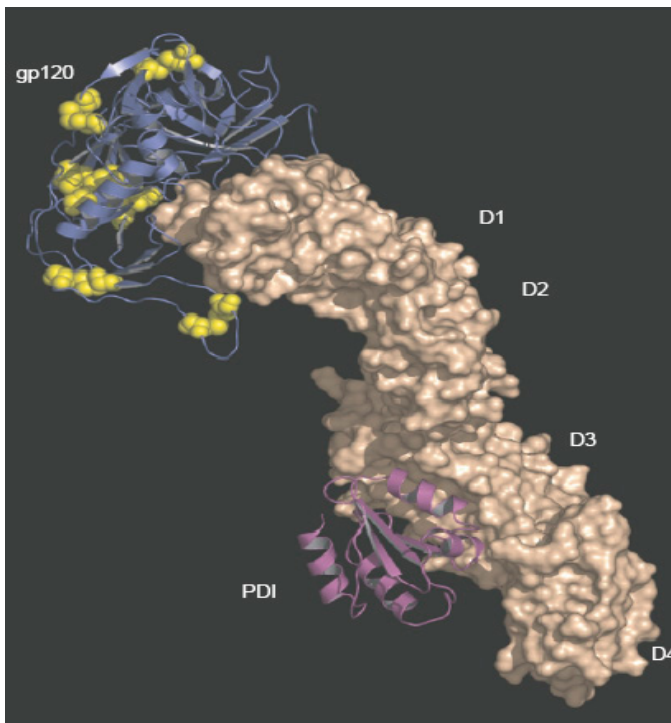


Figure 3. Modèle représentant un complexe formé de la PDI, du CD4 et de la gp120. Les résidus cystéine (jaune) de la gp120 (bleu) sont les substrats potentiels de la PDI (pourpre). Le CD4 (beige) possède, entre ses domaines D2 et D3, une petite région charnière flexible qui pourrait amener la gp120 en contact avec la PDI (83). Révélé par amarrage moléculaire (*molecular docking analysis*) par S.Comeau et S.Vaida, Boston University.

L'association avec le récepteur de chimiokine est perçue comme l'élément déclencheur du réarrangement dans les glycoprotéines qui permet l'interaction entre le peptide de fusion de la gp41 et la membrane cellulaire (84). C'est dire que l'action de la PDI sur la gp120 peut être la base du mécanisme par lequel sont produits les profonds changements de conformation de la gp120 qui activent alors les propriétés fusogéniques de la gp41 (83). En effet, l'inhibition de l'activité de la PDI chez les cellules ciblées par le VIH empêche l'activation de la gp41 (79), l'entrée virale (77) et la fusion des membranes cellulaire et virale (76) (77).

Au cours de son activation, la gp41 déploie, en ses deux extrémités, deux hélices torsadées caractérisées par des répétitions d'heptapeptides (*heptad repeats*) nommées NHR (en N-terminal) et CHR (en C-terminal) et le peptide de fusion formé par une partie de sa portion en N-terminal (83) (85). C'est à ce moment que survient le changement de structure critique de la gp41 qui permet aux deux hélices torsadées d'interagir entre elles (chez un trimère de gp41, ce sont trois CHR qui s'enroulent sur trois NHR) et de former une superhélice. De façon similaire à l'hémagglutinine du virus influenza, la gp41 du VIH utilise cette configuration en superhélice comme d'un ressort pour accoler les membranes virale et cellulaire (86) (84) (87). Finalement, cette superhélice donne naissance à une structure stable en faisceau à six hélices (*six-helix bundle structure*) qui, représentant l'ultime état d'activation de la gp41, sert à la formation d'un pore dans la membrane cellulaire (83).

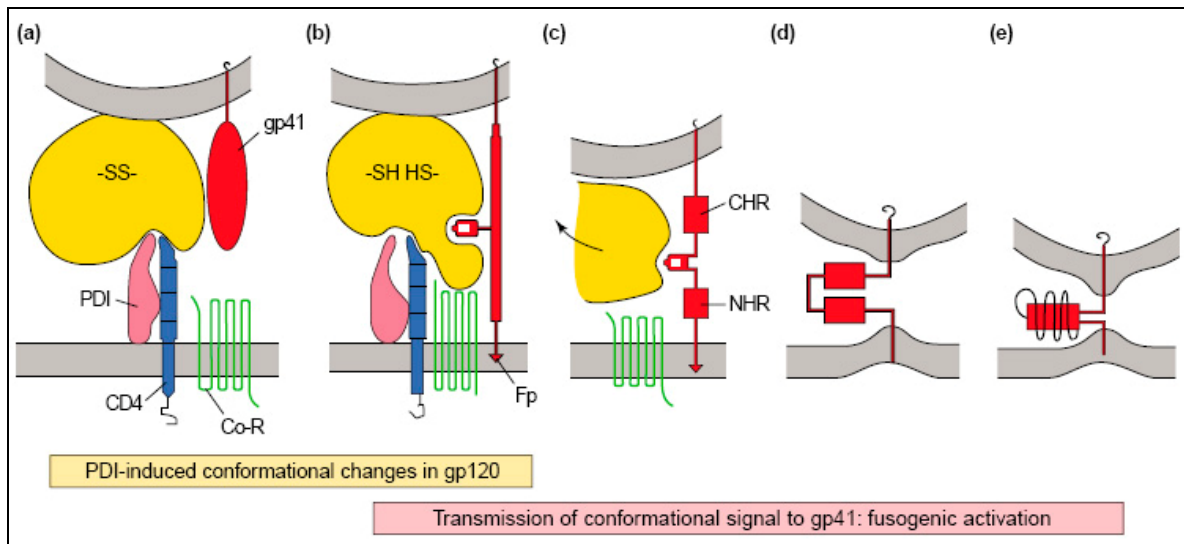


Figure 4. Modèle expliquant le changement de conformation induit par la PDI qui mène à l'activation de la gp41. (a) La PDI lie le domaine D3 du CD4, tandis que le domaine D1 du CD4 lie une région conservée de la gp120. La PDI vient en contact avec la gp120 dans la région du site de liaison CD4-gp120. Les ponts disulfures de la gp120 sont intacts (-SS-) et les deux glycoprotéines de l'enveloppe sont dans leur conformation d'origine. (b) La réduction des ponts disulfures (-SH + HS-) induit des changements de conformation qui augmentent l'interaction de la gp120 avec les co-récepteurs (Co-R) et avec la gp41. Cette interaction génère des changements de conformation majeurs dans la gp41 qui allongent la molécule et forment le peptide de fusion (*fusion peptide* (Fp)) qui s'insère dans la membrane cellulaire. (c,d) L'activation de la gp41 comprend la formation d'hélices NHR et CHR qui se courbent pour prendre une position antiparallèle. La distance entre le virus et la cellule est diminuée et la gp41 devient le seul lien entre eux. (e) L'hélice CHR s'enroule autour de l'hélice NHR, ce qui forme un faisceau à six hélices (dont seulement le tiers est illustré) (83).

Parce que les membranes virale et cellulaire fusionnent, la particule virale qui entre dans la cellule en passant par le pore est dépouillée de sa bicouche lipidique. La structure relâchée dans le cytoplasme est donc le complexe ribonucléoprotéique entouré de la capsid qui s'y désassemble rapidement en une étape critique appelée décapsidation. Celle-ci est favorisée par la présence, dans la particule virale, de Cyclophiline A qui, interférant directement avec les interactions de la CA avec elle-même, facilite leur dissociation (88). La Cyclophiline A est spécifiquement incorporée dans les particules de VIH-1 en formation grâce à une interaction avec CA (89) (90) (91).

1.4.2 Importation au noyau, rétrotranscription et intégration du génome du VIH-1

1.4.2.1 Complexe de rétrotranscription

Suivant la décapsidation, il y a génération d'un complexe de rétrotranscription (CRT) (27) et initiation de la rétrotranscription. Le CRT est formé du génome viral, de l'ARNt^{lys3}, des enzymes RT (une quarantaine de copies par capsid) et IN, ainsi que de MA, NC et Vpr (92). Ce complexe se lie rapidement au cytosquelette (93), le réseau de filaments protéiques s'étendant dans tout le cytoplasme et constitué des microfilaments d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires, dont ceux faits de vimentine (94). Cette association est due à l'interaction de MA phosphorylée avec le réseau d'actine et est requise pour la synthèse efficace de l'ADN viral (95).

1.4.2.2 Transport du complexe de rétrotranscription vers le noyau cellulaire

Survient alors le passage du CRT des microfilaments d'actine aux microtubules par un mécanisme encore mal connu. Le long des microtubules, le complexe utilise la dynéine cytoplasmique qui leur est associée pour être propulsé vers le noyau (96). Également associées au CRT, les protéines accessoires virales Rev et Vif agissent en faveur du virus et respectivement sur la polymérisation du réseau de microtubules (97) et la structure du réseau de vimentine (98) (99). Ces moyens dont dispose le VIH pour faciliter sa migration vers l'intérieur du noyau sont le fruit de son évolution et lui permettent d'avancer dans le cytoplasme et d'échapper aux défenses de l'hôte. À cet égard, Vif agit sur la désaminase CEM15 de l'hôte - nommée ainsi d'après la lignée cellulaire CEM - aussi appelée APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*). En effet, Vif empêche l'incorporation de cette enzyme dans les virions naissants (100) (101) (révisé dans (102)) en induisant sa dégradation par le protéasome (révisé dans (103)). Cette

enzyme au pouvoir antiviral est responsable de l'apparition de mutations dans l'ADN lors de la rétrotranscription du VIH (104) (105) (106).

1.4.2.3 Rétrotranscription

Pendant cette migration du CRT dans le cytoplasme, l'ARN monocaténaire linéaire du VIH-1 est rétrotranscrit, par la RT et en présence d'ARNt^{lys3}, en ADN bicaténaire linéaire destiné à être inséré dans le génome de l'hôte, deux étapes qui sont propres aux rétrovirus. La RT du VIH-1 est un hétérodimère composé des sous-unités p51 et p66 présent à raison de 50 à 100 molécules par virion. Cette holoenzyme possède diverses activités enzymatiques : une première ADN polymérase dirigée par l'ARN (*RNA-dependent DNA polymerase* (RDDP)), une autre ribonucléase H (RNase H) et une dernière ADN polymérase dirigée par l'ADN (*DNA-dependent DNA polymerase* (DDDP)) (révisé dans (107)). Pour sa part, l'ARNt^{lys3} sert d'amorce puisque certains de ses nucléotides lient l'ARN viral justement dans la région de liaison de l'amorce (*primer binding site* (PBS)) (108).

Comme le montre la figure 5, la rétrotranscription proprement dite débute, par activité ADN polymérase dirigée par l'ARN, en 5' du génome viral dans la région U5 pour finir dans la région R, formant ainsi un ADN monocaténaire nommé ADN strong stop brin négatif (*minus-strand strong stop DNA*). La portion ARN de l'hybride ADN/ARN alors généré est, pour sa part, dégradée par activité ribonucléase. L'ADN ainsi libéré s'hybride par la suite en l'extrémité 3' du même ou du second génome d'ARN viral, ce qui constitue le premier transfert de brin (*first jump*). Au moment où l'élongation du brin négatif se poursuit dans une région spécifique près de l'extrémité 3' de l'ARN génomique caractérisée par une séquence PPT (*polypurine tract*), une amorce ARN brin positif unique y est formée par clivage, résultat de l'activité RNase H. La synthèse du brin positif se produit donc, par activité ADN polymérase dirigée par l'ADN, vers la région U5 et ce, en utilisant l'ADN brin négatif tout juste formé. Pendant ce temps, la synthèse du brin négatif se poursuit toujours à partir de la matrice d'ARN brin positif, éventuellement clivé par la

RNase H. Des amorces supplémentaires entrant dans la synthèse du brin positif sont issues des fragments d'ARN ainsi produits. La synthèse de l'ADN brin positif s'arrête après la copie de la portion hybridée de l'ARNt pour générer le PBS de l'ADN brin positif, formant le *plus-strand strong stop*. Les amorces sont ensuite enlevées par clivage par la RNase H, ce qui facilite l'hybridation de ce PBS à son homologue sur le brin négatif d'ADN, laissant place au deuxième transfert de brin (*second jump*). L'élongation des brins se poursuit et la synthèse du second brin engendre un déplacement partiel de l'amorce puisque le brin grandissant déplace la matrice au site d'initiation adjacent au PPT. Ainsi, un troisième brin positif d'une longueur de 99 nucléotides chevauche le centre de l'ADN et forme l'ADN triplex central (*central DNA flap*). Le produit final de la rétrotranscription est donc un ADN linéaire qui possède, à chaque extrémité, un LTR et en son centre, un ADN triplex que l'on peut voir sur la figure 6.

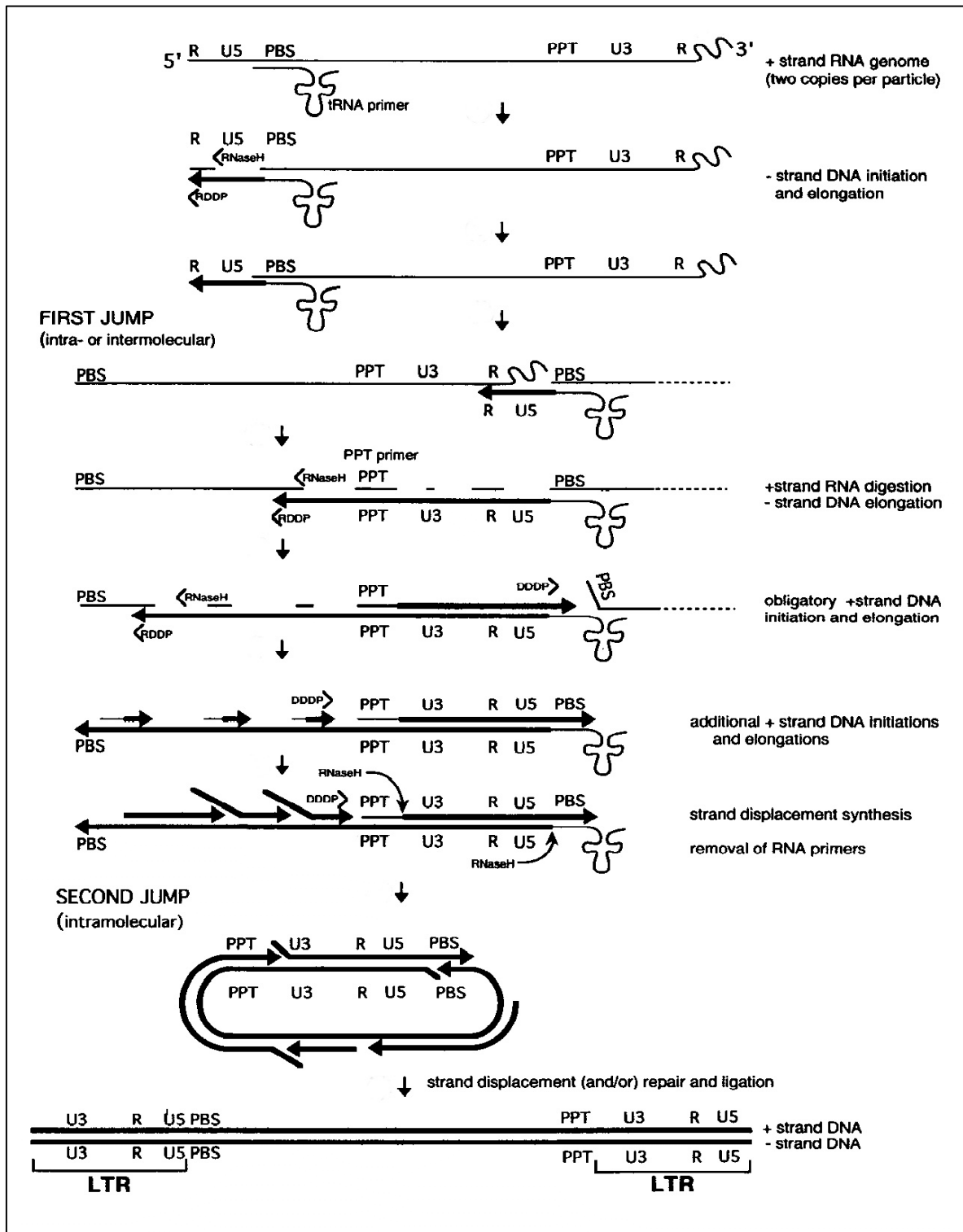


Figure 5. Le processus de rétrotranscription (adapté de (107)).

La rétrotranscription est un processus imprécis qui est à l'origine de la diversité des antigènes du VIH. Cette étape du cycle viral manque tellement d'exactitude, qu'elle génère de nouveaux mutants pour à peu près chaque virion produit chez un individu infecté et ce, pratiquement chaque jour (109). De plus, la présence de deux copies d'ARN dans le génome viral permet un grand nombre d'événements de recombinaison pendant la rétrotranscription (générant donc des ADN viraux contenant l'information génétique venant des deux ARN) (110), ce qui augmente davantage l'hétérogénéité génétique du virus. Ainsi se crée, au sein d'un porteur du VIH, une population virale hétérogène désignée quasi-espèces (111) et qui affiche continuellement de nouveaux variants antigéniques contre lesquels une réponse immune efficace n'a pas le temps de se développer (112).

1.4.2.4 Complexe de pré-intégration

La complétion de la rétrotranscription donne naissance au complexe de pré-intégration (CPI) qui migre vers le noyau lui aussi à l'aide des microtubules (T. Hope, communication personnelle). Outre l'ADN viral arborant l'ADN triplex central, le CPI comprend les protéines MA, RT, IN, Vpr et HMGIY (*high mobility group protein isoforms I and Y*) (113). Bien que la conformation de ces complexes du VIH-1 ne soit pas bien établie, les extrémités de l'ADN linéaire sont connues pour être pontées ensemble, probablement suite à la dimérisation de IN liée au bout des LTR (113) (figure 6). La présence de la protéine HMGIY contribuerait également à protéger les extrémités de l'ADN.

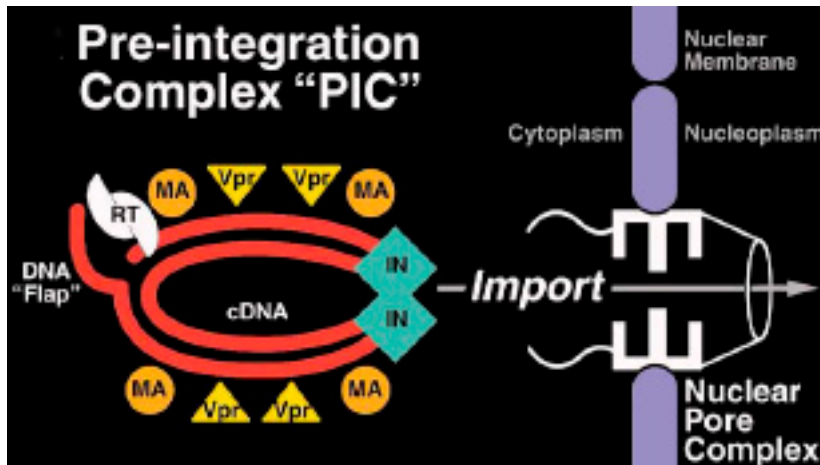


Figure 6. Structure du CPI (adapté de (114)).

Chez la plupart des rétrovirus, les CPI sont incapables de traverser la membrane nucléaire et dépendent alors du cycle cellulaire pour le faire (115) (116). Par contre, les CPI du VIH-1 et des autres lentivirus migrent activement au noyau (117) grâce à l'ADN triplex central et aux protéines nucléophiles IN (118) (119), Vpr (120) et MA (121) qui le composent. Ces protéines permettent ainsi au VIH-1 d'infecter de façon productive des cellules qui se trouvent en dehors de leur période de division, comme des macrophages et des lymphocytes T quiescents (122). En effet, l'ADN triplex central semble requis pour que le CPI adopte une conformation appropriée à l'import nucléaire (123). Quant à IN et MA, leur caractère nucléophile serait attribuable à la présence, dans ces protéines, de signaux de localisation nucléaire (*nuclear localization signal* (NLS)), habituellement reconnus par les hétérodimères de karyophérine α/β (ou importine α/β) dans le cytoplasme (124). Tandis que IN et MA servent de véhicule pour conduire le CPI du VIH-1 au noyau, Vpr, en se liant à la karyophérine α , contrôle l'affinité de cette dernière pour les NLS viraux des deux protéines mentionnées (125). En temps normal, la karyophérine β dirige l'import nucléaire par attachement aux protéines des pores appelées nucléoporines. Pour le VIH-1, c'est Vpr, qui d'une manière similaire à la karyophérine β , assure l'arrimage du CPI au complexe de pores nucléaires (126). Au sein des pores, le complexe traverse la double couche lipidique de la membrane nucléaire en une séquence de liaisons et de relâchements pour éventuellement avoir accès aux chromosomes du génome de l'hôte, où l'ADN viral linéaire pourra être intégré (127) (128) (129), portant alors le nom de provirus. Autrement, l'ADN

non intégré du VIH-1 - présent sous forme linéaire ou circulaire - s'accumule dans le noyau. Sa transcription a lieu grâce à la cycline T1 humaine qui active le promoteur du VIH-1 en présence du facteur de transcription SP1 (*specificity protein 1*) (130) (voir section 1.4.3.1). Ainsi peuvent naître les transcrits multi-épissés, partiellement et non épissés du VIH, dont *tat*, *nef* et *rev* sont dès lors traduits en leur produit respectif (révisé dans (131)).

1.4.2.5 Intégration

La réaction d'intégration, catalysée par IN, est un processus hautement coordonné qui comprend le clivage, par activité endonucléase, de deux nucléotides terminaux localisés en position 3' OH de chaque LTR de l'ADN viral nouvellement synthétisé, suivi de l'insertion de ces brins dans le génome de l'hôte (figure 7). L'étape initiale semble se dérouler dans le CPI en migration dans le cytoplasme (132) (133) où IN demeure liée aux extrémités de l'ADN viral jusqu'à la rencontre d'une molécule d'ADN cellulaire. La deuxième étape (clivage et ligature concertés) fait suite à l'entrée dans le noyau. En effet, les groupements hydroxyl en position 3' de l'ADN viral issus de la première étape attaquent les liaisons phosphodiester préalablement clivées en des endroits ciblés dans l'ADN de la cellule (134) (135). Un intermédiaire comportant des brèches est ainsi formé et ces dernières sont réparées, possiblement par des enzymes cellulaires (107). Dès lors, le provirus, avec ses LTR, devient un nouvel élément génétique dans la cellule et est transmis aux cellules filles lors de la division cellulaire. La plupart des cellules infectées arborent plus d'un provirus parce que le génome viral du VIH-1 peut s'intégrer en plusieurs locations chromosomiques différentes, le plus souvent en des régions riches en gènes activement transcrits (136).

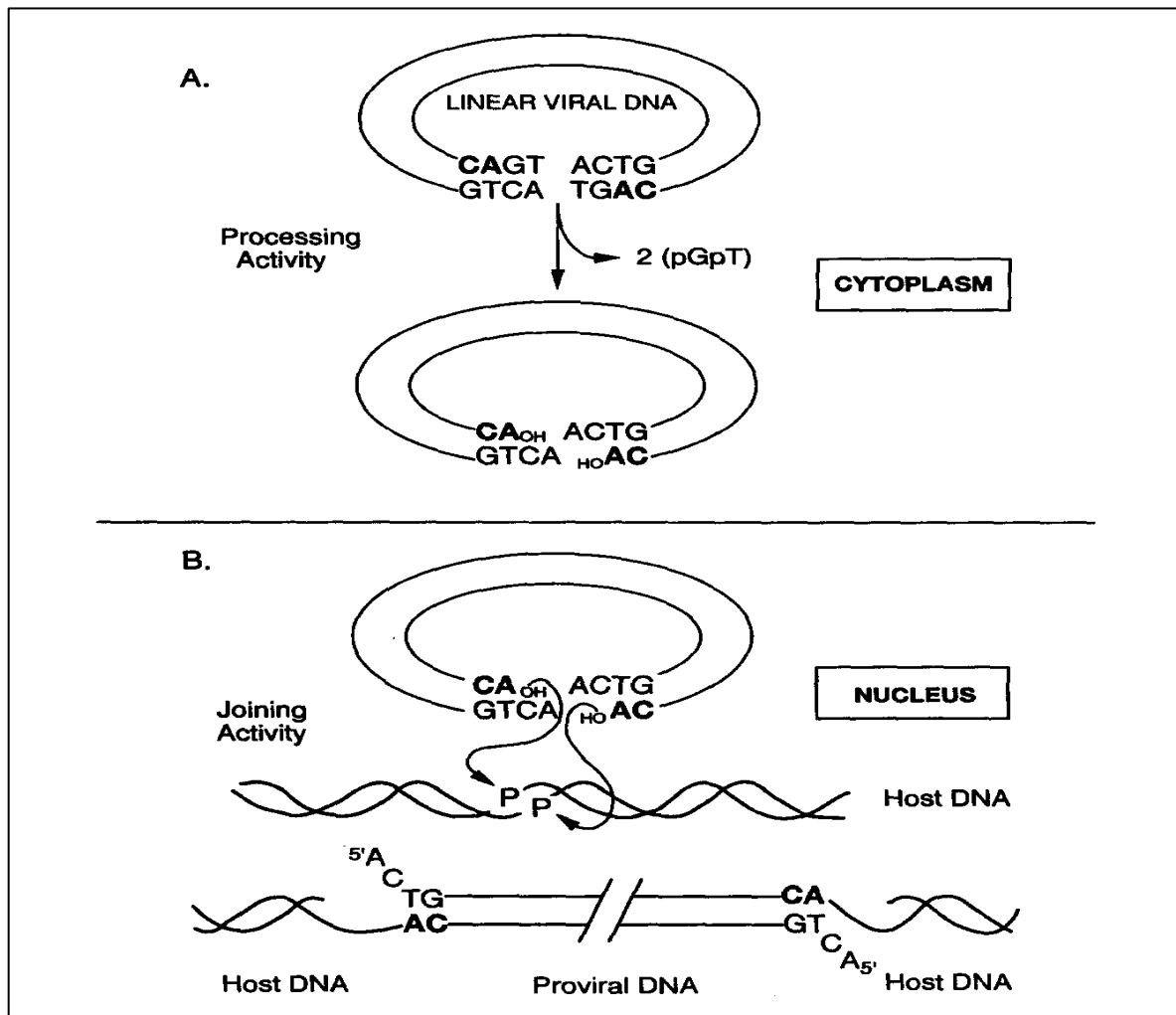


Figure 7. Structure des précurseurs de l'ADN proviral. L'intégrase reconnaît tout d'abord une séquence d'ADN conservée chez les rétrovirus (5'-TG...CA-3') dans les extrémités de l'ADN du VIH-1. (A. *Processing*) L'ADN viral linéaire est clivé en des sites spécifiques. (B. *Joining*) En des réaction de clivage et de ligation concertées, les extrémités 3'-OH de l'ADN viral sont jointes aux terminaisons 5'-PO4 exposées dans l'ADN de l'hôte (137).

1.4.3 Transcription et export nucléaire des ARNm du VIH-1

1.4.3.1 Transcription du provirus

Le provirus fonctionne ni plus ni moins comme un locus de gènes cellulaires. Il procure à l'ARN polymérase II de l'hôte la matrice d'ADN du VIH-1 nécessaire à la synthèse des ARN viraux de la progéniture, c'est-à-dire l'ARN constituant le génome des virions et les ARNm nécessaires à la formation de leurs constituants. La région U3 du LTR en position 5' comprend le promoteur qui, reconnu par l'ARN polymérase II, dirige l'initiation de la transcription dans la région U3-R. Celle-ci résulte de l'interaction directe entre les facteurs de transcription cellulaires et les éléments localisés dans le promoteur du VIH-1 qui agissent en *cis* (agissant exclusivement sur l'expression de gènes contigus). La région U3 possède en effet des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription cellulaires, comme Sp1 (138) (139), NF- κ B (*nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells*) (140) (141) (139) et NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) (142). Le VIH aurait donc évolué de sorte à potentialiser l'activation cellulaire, augmentant ainsi l'expression de son propre génome (143).

Dans le cas précis de l'activation de la transcription par NF- κ B, des hétérodimères de p50/p65 et p50/RelB, comme des homodimères de p50, lient le LTR du VIH-1. Dans plusieurs cellules, l'activité de NF- κ B est étroitement régulée par la liaison spécifique de sa sous-unité p65 à la molécule inhibitrice I κ B (*inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B cells*). L'interaction de NF- κ B avec I κ B masque le signal de localisation nucléaire de p65, retenant NF- κ B dans le cytoplasme. L'activation de la cellule cause la dissociation du complexe NF- κ B : I κ B par phosphorylation de I κ B qui, une fois ubiquitinée, est dégradée par le protéasome (144). Les sous-unités de NF- κ B alors libérées migrent au noyau et augmentent l'initiation, tout comme l'élongation de la transcription virale (145).

Toutefois, la structure de chromatine dans laquelle l'ADN proviral est organisé réprime la transcription (146). D'ailleurs, la persistance du virus sous la forme d'un provirus transcriptionnellement silencieux fait en sorte que les cellules infectées échappent à la thérapie antirétrovirale et permet à l'infection de resurgir après un arrêt du traitement (147) (148) (149). La faible activité transcriptionnelle basale en partance du LTR est cependant augmentée de plus de deux logs par la protéine virale Tat (150) (151). Cette protéine est un facteur de transcription inhabituel du fait qu'elle lie l'ARN et ce, dans la région TAR (*trans-activation response*) (152), une structure en épingle à cheveux agissant en *cis* et

présente à l'extrémité 5' de tous les ARNm viraux. Tat induit ainsi une modification de la chromatine dans le promoteur du VIH-1 et stimule le recrutement de complexes ARN polymérase II capables de transcription processive, c'est-à-dire aptes à continuer de catalyser la transcription, de manière répétitive, sans se dissocier de son substrat (153). Tat stimule en effet l'élongation de la transcription en recrutant P-TEFb (*positive transcription elongation factor*) à la région TAR. Le P-TEFb humain - un hétérodimère formé d'une kinase cycline-dépendante (CDK9) et de la cycline T1 - phosphoryle le domaine situé en position C-terminale de l'ARN polymérase II (et d'autres protéines associées), provoquant ainsi le passage de la transcription d'un état nonprocessif à processif (154). Notons que cette phosphorylation induite par Tat stimule également l'activité guanylyltransférase de l'enzyme coiffante humaine (*human capping enzyme*) (155). Au cours de la transcription, cette enzyme coiffe les ARN d'un motif 7-méthyl-guanine en 5'. La poly(A) polymérase est une autre enzyme cellulaire qui effectue des modifications, cette fois post-transcriptionnelles et en 3', par ajout de multiples résidus adénines (polyadénylation). Ces deux étapes procurent par ailleurs une protection contre les ribonucléases. Elles précèdent l'épissage et sont nécessaires à la reconnaissance des transcrits, ainsi qu'à leur traduction, par la machinerie cellulaire de synthèse de protéines.

1.4.3.2 Export nucléaire des ARNm

La transcription des gènes du VIH-1 à partir du LTR génère un grand nombre d'ARN viraux (156) qui peuvent être séparés en trois catégories. Mentionnons tout d'abord les ARN non épissés dont une partie forme le génome des virions de la progéniture et dont l'autre partie est traduite en polyprotéines précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} (nommée ainsi en référence à *precursor* et à leur poids moléculaire respectif) décrites plus loin. Ensuite, les ARNm partiellement épissés menant à la synthèse des glycoprotéines de l'enveloppe, de Vpu, de Vif et de Vpr. Puis finalement, les ARNm multi-épissés dont sont issus Rev, Tat et Nef.

Ces ARNm multi-épissés du VIH-1, sortant par la voie normale d'export du noyau, sont d'ailleurs les premiers transcrits à apparaître dans le cytoplasme et à y être traduits. Ils servent entre autres à la synthèse de Rev qui en retour, est responsable de l'export nucléaire des ARNm comprenant des introns. En utilisant leur NLS, les protéines Rev nouvellement formées lient les karyophérines β et les hétérodimères formés sont transloqués à travers les pores nucléaires. Une fois dans le noyau, il y a dissociation et dès lors, Rev lie une cible agissant en *cis*, soit l'élément de réponse à Rev (*Rev response element (RRE)*) présent dans tout ARNm viral non épissé ou partiellement épissé (révisé dans (157)). Au complexe Rev : ARN ainsi formé, se joint l'exportine-1 (158) et la protéine RAN-GTP (*Ras-related nuclear protein-guanosine triphosphate*) qui protège de la digestion enzymatique (159). Le tout est transporté à travers un pore nucléaire par l'exportine-1. Dans le cytoplasme, l'hydrolyse du guanosine triphosphate de Ran-GTP en guanosine diphosphate provoque la dissociation du complexe. Suite à la relâche de Rev des transcrits de VIH, l'ARN viral pleine longueur peut être encapsidé dans les virions de la progéniture ou, comme les ARNm partiellement épissés, peut être traduit en protéines virales. Ainsi, en dirigeant les ARNm précurseurs contenant des introns vers une voie cellulaire d'export qui peut supporter les ARN non complètement épissés, la protéine Rev du VIH-1 fait éviter à ces ARNm le système d'export nucléaire habituel qui les retiendrait au noyau.

1.4.4 Traduction des ARNm du VIH-1

1.4.4.1 Mécanismes de traduction

Les ARNm du VIH-1 sont traduits sur les ribosomes cytoplasmiques libres. La traduction est généralement initiée par le mécanisme de balayage (*scanning mechanism*) (160). Il s'agit du processus par lequel la sous-unité ribosomique 40S s'attache à la coiffe méthylée de l'ARNm (161) (162) et balaie la région 5' non traduite pour se positionner au codon d'initiation AUG (163) (164). La sous-unité 60S est alors recrutée et débute ensuite la traduction d'un polypeptide (165). Les glycoprotéines de l'enveloppe virale et Nef, sont

quant à elles, produites par le mécanisme de balayage avec fuite (*leaky scanning*) au codon AUG de *vpu* et de *rev*, respectivement (166) (167) (160). De cette façon, deux protéines indépendantes sont exprimées à partir d'une région du génome relativement petite. Les polyprotéines Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} sont synthétisées à partir de l'ARNm non épissé du VIH-1. L'initiation de la traduction des produits de *gag* du VIH-1 se fait d'une manière alternative au balayage et dépend plutôt d'une région IRES (*internal ribosome entry site*) (165). En permettant l'association directe des sous-unités ribosomiques, cette région du génome viral initie la traduction d'une manière indépendante de la coiffe en 5' de l'ARNm (165). Pendant la traduction de Pr55^{Gag}, Pr160^{GagPol} est produite à un plus faible taux (environ vingt fois moins que Pr55^{Gag}) et ce, par décalage ribosomique (*ribosomal frameshifting*), un mécanisme encore une fois commun à plusieurs autres rétrovirus dont le virus du sarcome de Rous et le virus Visna/maedi (168).

1.4.4.2 Devenir des protéines virales Rev, Tat, Nef, Vif et Vpr

Rev et Tat, comme Vpu, sont des protéines absentes des virions et ne sont donc pas visées par l'étape d'assemblage. Par contre, Nef, grâce à sa myristoylation post-traductionnelle, se localise à la membrane pour son incorporation dans les virions en devenir (169). Tôt dans l'infection, Nef régule à la baisse l'expression en surface de CD4, ainsi que de HLA-A et HLA-B en les dirigeant vers des voies d'endocytose distinctes (révisé dans (170) (171)). En diminuant l'expression de CD4, Nef empêche les virions d'être retenus à la surface de la cellule infectée par une éventuelle interaction entre les glycoprotéines de leur enveloppe et le récepteur CD4 (172). Aussi, la diminution de l'expression de CD4 en surface, quelle soit causée par Nef ou Vpu - comme décrit dans la section suivante - apporte une résistance de la cellule à toute infection supplémentaire (173), un phénomène nommé interférence rétrovirale. Nef touche également l'expression d'autres molécules HLA (appellation désignant les déterminants du CMH chez l'humain). En effet, Nef réduit l'expression, à la surface des cellules, de molécules du CMH de classe II arborant un peptide, tout en augmentant celle des molécules immatures (174). Pour le VIH, pouvoir diminuer en surface des cellules infectées l'expression d'une part, de HLA-A et HLA-B (deux molécules

responsables de la présentation antigénique aux lymphocytes T cytotoxiques) et d'autre part de molécules du CMH de classe II (nécessaires à l'activité des lymphocytes T auxiliaires), constitue un mécanisme d'évasion efficace du système immunitaire. Enfin, il a été démontré que Nef interagit avec une variété de kinases de type Src (*sarcoma*) et affecte ainsi leur activité (175), ce qui a été suggéré comme pouvant stimuler la réplication virale *in vivo* (27).

Certains ARN partiellement épissés du VIH-1 sont traduits en protéines Vif et Vpr. Vpr, par sa liaison à un motif riche en leucine de la région p6 de Pr55^{Gag}, est une protéine incorporée dans les virions (révisé dans (176)) et suivant la maturation, elle est recrutée dans le nucléoïde (177) (178) - le peloton central d'acide nucléique de forme conique caractéristique des virions matures du VIH-1 - où elle s'associe à l'ARN (179) (180). Vpr a le pouvoir, en plus d'aider à l'import nucléaire, d'arrêter le cycle cellulaire en phase G2 et ce, dès les premières heures de l'infection. En effet, un modèle propose que Vpr s'associe à une protéine phosphatase sérine/thréonine de type 2A (PP2A), et en augmente ainsi l'activité catalytique (181). Une fois transloquée au noyau, cette holoenzyme y trouve le *cdc25* (*cell division cycle 25*) qu'elle se charge de déphosphoryler, donc d'inactiver. Ce dernier représente le substrat d'une autre enzyme, la kinase p34^{cdc2} complexée à la cycline B, qui ne peut être activée en ces circonstances, ce qui a pour effet d'empêcher la cellule d'entrer en mitose.

1.4.4.3 Avenir de l'ARNm viral Vpu/Env

Bien qu'initiée sur les ribosomes libres, la traduction de l'ARNm Vpu/Env mono-épissé (fruit du gène *env* (figure 2)), se poursuit sur des ribosomes associés au réticulum endoplasmique (RE). En effet, les glycoprotéines de l'enveloppe virale sont synthétisées par la machinerie que la cellule utilise pour la production d'autres protéines de surface, la voie sécrétoire. Aussitôt que la gp160 naissante entre dans la lumière du RE, elle se replie, la PDI y forme des ponts disulfures et elle devient glycosylée. Des chaperonnes s'y lient l'assistent d'ailleurs dans son repliement comme c'est le cas de la calnexine, de la

calréticuline et de GRP78 (*glucose regulated protein 78*) (182) (183) (184). Cette dernière, membre de la famille Hsp70 (*heat shock protein 70*), prévient en effet les associations non spécifiques de la gp160 et la protège ainsi du mauvais repliement et de l'agrégation. La gp160 continue sa migration vers la surface de la cellule productrice en étant transportée, sous forme de trimères, du RE au Golgi (185) (182). En cet endroit, surviennent des modifications supplémentaires de ses oligosaccharides (186), ainsi que son clivage en protéines gp120 et gp41 matures par la protéase furine (187). Ensuite, les trimères d'homodimères de gp120 et gp41 se retrouvent liés de façon non covalente (57) et poursuivent leur migration dans le Golgi.

Récemment, Miranda et collaborateurs ont proposé qu'au sein des lymphocytes T, les glycoprotéines de l'enveloppe virale passent du Golgi à des granules intracellulaires de la voie sécrétoire régulée, plutôt que d'emprunter la branche constitutive de la voie sécrétoire (188). Tout dépendant de signaux spécifiques qui influencent le moment de l'assemblage et du bourgeonnement, comme l'activation cellulaire, les glycoprotéines alors présentes en surface desdites granules seraient livrées à la surface de la cellule par Pr55^{Gag} (188), rappelant du coup le mode d'expression de Fas ligand (189).

Or, il est clair pour plusieurs que les glycoprotéines de l'enveloppe virale du VIH-1 se retrouvent plutôt à la surface des cellules infectées par la voie sécrétoire et qu'elles y subissent rapidement une endocytose dépendante de la clathrine (190) (191) (192). Une telle endocytose évite la présence prolongée des glycoprotéines de l'enveloppe virale du VIH-1 à la surface des cellules infectées qui pourraient alerter de façon prématurée le système immunitaire (193), avant même l'assemblage et la relâche des virions destinés à se répliquer (188). Ainsi, le complexe de protéines adaptatrices (*adaptor protein complex*) AP-1, qui interagit indirectement avec les microtubules (194), lie la séquence contenant deux leucines en position C-terminale de la queue cytoplasmique des glycoprotéines de l'enveloppe et les fait migrer du Golgi vers la surface cellulaire (195). Ensuite, les résidus tyrosine contenus dans la queue cytoplasmique de la gp41 sont recrutés par la sous-unité μ du complexe de protéines adaptatrices AP-2 en des puits recouverts de clathrine (196) (197) (198) (195). Selon Dong et collaborateurs, il serait logique de penser que l'endocytose des

glycoprotéines de l'enveloppe les conduirait dans des compartiments endocytique où elles s'associeraient à Pr55^{Gag} (199).

Enfin, notons que pendant l'étape de transport de la gp160 vers la surface cellulaire, les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 lient aussi le CD4 dans le RE (200). En cet emplacement, Vpu vient alors se lier à la queue cytoplasmique des molécules de CD4 retenues et recrute des ubiquitine ligases responsables de leur protéolyse par les protéasomes (201). La gp160, ainsi libérée par Vpu, peut alors poursuivre sa migration selon les étapes que nous venons de décrire.

1.4.5 Assemblage, bourgeonnement et maturation du VIH-1

1.4.5.1 Processus d'assemblage et de bourgeonnement des particules virales

1.4.5.1.1 Rôle de Pr55^{Gag}

Bien que de nombreux aspects de l'assemblage des constituants du VIH-1 demeurent inconnus, il est clair que la polyprotéine Pr55^{Gag} dirige cette étape du cycle viral (202) (203). Protéine structurale majeure du VIH-1, Pr55^{Gag} se retrouverait surtout associée, lors de l'assemblage, aux filaments internes d'actine au sein de la cellule productrice (204) (205). Pierre angulaire des processus d'assemblage et de bourgeonnement, elle agit même en absence de tout autre facteur viral (206). Elle est constituée (dans l'ordre, en débutant par l'extrémité située en position N-terminale) des régions codant pour MA, CA, p2, NC, p1 et p6 et contient trois domaines nécessaires à l'assemblage et à la relâche de particules. Il s'agit du domaine M (*membrane binding*) situé en position N-terminale de MA et qui consiste en groupements de myristate et en résidus basiques (207), du domaine I (*interaction*) retrouvé en position C-terminale de CA et en position N-terminale de NC et finalement du domaine L (*late*) présent en position N-terminale de p6 (208). Ainsi, Pr55^{Gag}

peut former seule des pseudovirions, soit des particules ressemblant à des virus (*virus-like particles*) (206) en terme de densité, de taille et de morphologie.

1.4.5.1.2 Modèles d'assemblage

Récemment, Perlman et Resh ont catégorisé les opinions divergentes en matière d'assemblage et de bourgeonnement du VIH-1 en deux grands modèles (209). Selon le premier modèle, le site ciblé par Pr55^{Gag} pour l'assemblage et la relâche est spécifique à un type cellulaire donné. Pour les lymphocytes T, on parle de la membrane plasmique, sans intervention des compartiments endocytiques dont font partie les corps multivésiculaires (*multivesicular bodies*). Dans le cas des macrophages, on fait plutôt référence auxdits corps multivésiculaires. Le second modèle implique que Pr55^{Gag} cible premièrement les corps multivésiculaires dans tous les types cellulaires avec exocytose à la membrane plasmique et que l'assemblage et le bourgeonnement peuvent prendre place à la membrane plasmique ou dans ces corps. Rappelons que les corps multivésiculaires sont destinés à fusionner avec les lysosomes (210), mais qu'ils peuvent alternativement migrer à la surface de la cellule et y fusionner afin de relâcher des protéines, comme c'est le cas des isotypes du CMH de classe II (211) (212).

Aujourd'hui, on tend plus à croire que les compartiments endocytiques servent à l'acheminement de Pr55^{Gag} pour la formation des virions et ce, dans tous les types de cellules (second modèle ci-haut mentionné) (213). En effet, certains ont montré que la machinerie intracellulaire mise à contribution pour la biogenèse des corps multivésiculaires est recrutée par le VIH-1 pour son propre assemblage à la membrane plasmique des lymphocytes T (214), ainsi que de la plupart des cellules hématopoïétiques (215) (199). Il a également été énoncé que les particules de VIH sont assemblées à l'intérieur de compartiments endocytiques dans les macrophages et qu'elles sont par la suite relâchées par exocytose (214). De cette façon, au moment où les lymphocytes T auxiliaires entrent en contact avec ces CPA, il est possible que les macrophages disséminent les virions, au même titre que des exosomes, d'une manière particulièrement efficace, puisque protégés des

anticorps (43) (216) (217). Il a aussi été rapporté qu'une lignée de lymphocytes T humains (cellules Jurkat) traitent Pr55^{Gag} comme un exosome (218) et que les corps multivésiculaires constituent le site de d'assemblage et de bourgeonnement du VIH dans les cellules 293 (cellules de rein embryonnaire humain ressemblant à des cellules épithéliales), ainsi que dans une lignée de cellules épithéliales humaines (219).

Dans les faits, que le bourgeonnement du VIH se produise à la membrane plasmique (209) ou en des membranes intracellulaires, la polyprotéine Pr55^{Gag} nouvellement synthétisée se localise tout d'abord en périphérie du noyau. Puis, la sous-unité δ du complexe de protéines adaptatrices AP-3 lie l'hélice α en position N-terminale de MA pour l'amener aux corps multivésiculaires (199). Le myristate de la région MA, obtenu par myristoylation co-translationnelle, est responsable, quant à lui, de l'ancrage de Pr55^{Gag} dans la membrane des corps multivésiculaires. Dès lors, le VIH interagit aussi avec la protéine cellulaire Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*) et par le fait même, avec les complexes ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) de la machinerie de tri des protéines vacuolaires (*vacuolar protein-sorting pathway*). Plus en détails, le domaine L de la région p6 de la polyprotéine Pr55^{Gag} du VIH-1 présente un motif Pro-Thr-Ala-Pro (PTAP) (220) qui lui permet d'interagir avec la protéine cellulaire Tsg101 (206). L'ubiquitine que Pr55^{Gag} porte en plusieurs de ses domaines permet aussi une interaction avec Tsg101 (221). En effet, suite à la traduction, le motif PTAP interagit avec la machinerie d'ubiquitination de l'hôte (222) et par des réactions enzymatiques, l'ubiquitine s'y retrouve de façon covalente en des résidus lysines (223). L'ubiquitine qui marque ainsi le domaine L du VIH-1 (224) lie donc Tsg101 et ce, par le domaine de cette dernière qui est connexe à l'enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine (*E2 ubiquitin-conjugating enzyme*) (225). Tsg101 joue également un rôle dans la relâche d'autres virus tels HTLV-1 (*human T-lymphotropic virus 1*) et le virus Ebola (226), permettant même le recrutement de ce dernier aux radeaux lipidiques (227). Cependant, le rôle de Tsg101 et des complexes ESCRT reste à être évalué dans les macrophages (217).

Dans les types cellulaires dans lesquels l'exocytose des corps multivésiculaires est rapide ou constitutive, la polyprotéine Pr55^{Gag} est hâtivement transportée à la membrane plasmique où elle se multimérise et forme les complexes d'assemblage. Le ciblage de la

membrane plasmique dépend de la présence de motifs basiques dans la portion MA de Pr55^{Gag} et de phosphatidyl inositol (4,5) biphosphate ([PI(4,5)P₂]) dans la membrane plasmique. En effet, les résidus basiques de MA de Pr55^{Gag} interagissent directement avec le [PI(4,5)P₂] (228). Par ailleurs, la déplétion de [PI(4,5)P₂], par sur-expression de la phosphoinositide 5-phosphatase IV, mène à l'accumulation de Pr55^{Gag} à la membrane des corps multivésiculaires au lieu de la membrane plasmique (229).

Dans les cellules dans lesquelles l'exocytose est lente et/ou régulée (i.e., macrophages), l'acheminement de Pr55^{Gag} par le complexe de protéines adaptatrices AP-3 aux corps multivésiculaires (199) semble être suivi de l'assemblage des constituants viraux, de l'invagination de la membrane limitante, puis du bourgeonnement viral dans la lumière de ces compartiments endocytiques (214). Dans les macrophages et les cellules dendritiques en particulier, les compartiments endocytiques enrichis en molécules du CMH de classe II (*major histocompatibility complex class II-enriched compartments* (MIIC)) constituent clairement le site de localisation de Pr55^{Gag} et de production de particules virales (214) (230) (229) (231). Suite à la venue d'événements de signalisation causés par un contact avec d'autres cellules (232), la relâche de particules virales du VIH-1 de la cellule survient par la voie des exosomes dans laquelle les corps multivésiculaires sont dirigés vers et fusionnent avec la membrane plasmique (233) (211) (234).

Donc, bien que l'explication complète des mécanismes d'assemblage et de bourgeonnement demeure obscure, nous savons que les rétrovirus utilisent la voie de biogenèse des exosomes pour former leur propre progéniture. Ils peuvent aussi, lors de l'infection, utiliser une voie de capture d'exosome comme voie alternative et indépendante des glycoprotéines de l'enveloppe virale, c'est la théorie du cheval de Troie appliquée au VIH (235). Par conséquent, ces virus sont, à leur niveau le plus fondamental, une forme variante d'exosomes. L'observation que la composition lipidique et protéique de l'enveloppe du VIH-1 ressemble de façon frappante à celle de la membrane des exosomes (236) et le fait que ces exosomes contaminent les préparations de VIH (237) (238) ont mené à la formulation de l'hypothèse du cheval de Troie (235). Différents virus, comme HTLV-1 (239), MLV (*murine leukemia virus*) (240), MPMV (*Mason-Pfizer monkey virus*) (241) et le virus Marburg (242), sont d'ailleurs connus pour utiliser les corps

multivésiculaires et d'autres composants de la machinerie endocytaire de la cellule hôte pour l'acheminement et l'assemblage de leurs particules.

1.4.5.1.3 Insertion des glycoprotéines de l'enveloppe virale et des autres constituants

Le modèle que nous venons de décrire est compatible avec l'acheminement des glycoprotéines de l'enveloppe virale du Golgi aux corps multivésiculaires, où elles interagissent avec Pr55^{Gag} (213). Plus particulièrement, la gp41 et Pr55^{Gag} s'associent avec les radeaux lipidiques (243) des corps multivésiculaires qui jouent ainsi un rôle important dans le transport du cholestérol (244) (245). En effet, les radeaux lipidiques sont formés dans le Golgi et le VIH semble migrer par la même voie de transport vers la surface que les radeaux eux-mêmes. Une autre étude toute récente révèle qu'en plus de la polyprotéine Pr55^{Gag} et des glycoprotéines de l'enveloppe virale, l'ARN du VIH-1 s'accumule dans les corps multivésiculaires (246).

Malgré que d'autres études soient nécessaires pour déterminer le moment et l'endroit exacts où survient dans la cellule l'association de Pr55^{Gag} avec les autres constituants des virions, on peut penser qu'elle se produit à tout le moins avant la migration des corps multivésiculaires vers la surface cellulaire pour exocytose. Le modèle proposé par Bukrinskaya permet d'imaginer la séquence suivante d'événements (208). Il semble que les polyprotéines Pr55^{Gag} commencent par se complexer entre elles par le biais de leur section CA (domaine I). Ensuite, elles lient, en leur segment NC (domaine I), la séquence ψ située près du PBS (247) de l'ARN non épissé destiné à former le génome. Deux copies de cet ARN sont incluses dans chaque virion et leurs sites d'initiation de dimérisation sont sollicités dans la formation d'un complexe typique boucle-boucle (*loop-loop kissing complex*) (révisé dans (248)). Par la suite, les polyprotéines Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} s'associent et tandis que la protéine Vif est incorporée par association avec l'ARN du génome viral (99), Vpr et la Cyclophiline A sont incluses dans les virions par leur interaction avec Pr55^{Gag} (249) (250) (90) (91) et les ARN^{lys3} cellulaires par leur liaison aux segments RT et NC de Pr160^{GagPol} (251).

1.4.5.1.4 Bourgeoisement

Le mécanisme de bourgeoisement du VIH demeure largement inconnu. Le peu d'informations dont nous disposons pointent vers un rôle de la protéine Vpr du VIH-1 dans cette étape du cycle viral. Tout d'abord, il appert que Vpr forme des canaux ioniques en s'oligomérisant dans la membrane de la cellule infectée (révisé dans (252)), de tels canaux permettant le passage d'ions à travers la membrane. Ensuite, il a été montré que la concentration intracellulaire en ions calcium peut réguler la structure des radeaux lipidiques (253). Ainsi, on peut croire que les canaux ioniques formés par Vpr contribueraient à modifier la structure des radeaux lipidiques, ce qui y favoriserait le bourgeoisement des virions. Le fait que la distribution intracellulaire du cholestérol régule la localisation de Pr55^{Gag} (254) et que le VIH incorpore dans son enveloppe des molécules spécifiques aux radeaux lipidiques comme CD59 (255) sont des évidences que le bourgeoisement du VIH-1 a lieu en cet endroit. Le bourgeoisement et l'infection à travers les radeaux lipidiques des membranes sont par ailleurs des aspects connus du virus *Influenza* (256) (257) et du virus Ebola (258) (259).

1.4.5.1.5 Insertion de molécules de la surface de la cellule productrice dans l'enveloppe virale

Comme mentionné précédemment, sont incluses dans les virions bourgeoisant des molécules propres à la cellule hôte (205) (260) (261) ((262), voir chapitre 3) (263). Il s'agit d'un phénomène relativement conservé parmi les souches de différents tropismes et faisant partie de divers sous types et groupes du VIH-1 (264), ce qui démontre l'importance de ce processus d'un point de vue évolutif. La connaissance de la pathogenèse de l'infection au VIH-1 que nous avons est tributaire de notre compréhension du mécanisme de bourgeoisement et d'acquisition de molécules de l'hôte de ce virus (255).

La présence d'attributs d'origine cellulaire dans l'enveloppe virale a été mise en évidence non seulement par microscopie électronique (265), mais aussi par des essais de capture qui

consistent à détecter des particules virales liées à des anticorps spécifiques fixés à un support solide tel des billes magnétiques (266). Une technique particulière allie d'ailleurs la capture des particules virales par des anticorps à l'attachement de ces virus à des cellules exprimant le CD4, permettant ainsi de discriminer le virus des particules contaminantes (267). Cependant, comme nous le verrons plus loin, le VIH-1 incorpore des molécules de l'hôte même en absence des glycoprotéines de l'enveloppe (268) ((269), voir chapitre 4) ((270), voir chapitre 5), ce qui fait que cette dernière technique faisant appel à l'interaction entre ces glycoprotéines et le CD4 ne permet pas de détecter la totalité des particules virales. À ce jour, la technique offrant le meilleur rapport spécificité/sensibilité demeure l'immunocapture, soit le dosage de la p24 des virions capturés par des anticorps dirigés contre une molécule d'intérêt exprimée à la surface virale qui, étant liés à la biotine, sont eux-mêmes reconnus par la streptavidine recouvrant des billes magnétiques que l'on immobilise par magnétisme (figure 19).

1.4.5.1.5.1 Mécanisme(s) d'insertion

Le ou les mécanisme(s) d'incorporation de molécules de la surface cellulaire par le VIH demeure(ent) pratiquement inconnu(s). Toutefois, il est clair que l'acquisition des molécules ICAM-1 et HLA-DR ne peut être attribuable aux glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 (268) ((269), voir chapitre 4). De fait, il a été montré que ce virus acquiert en réalité l'intégrine ICAM-1 grâce à l'interaction de cette dernière avec le cytosquelette (271) qui lie en retour Pr55^{Gag} (272) en sa portion MA (273). Pour certaines autres protéines, comme CD59, ce serait leur ancrage aux radeaux lipidiques par leur liaison au GPI qui serait responsable de leur présence à la surface du VIH-1 (255), vu l'association de Pr55^{Gag} aux radeaux lipidiques (274). Finalement, il a été aussi énoncé que les constituants cellulaires possédant des portions cytoplasmiques trop importantes seraient repoussés hors de la zone de bourgeonnement viral et alors exclus des virions, comme c'est le cas du CD4 retrouvé lié à p56^{lck} (275) et de la phosphatase CD45 (255).

1.4.5.2 Maturation des particules virales

Finalemment, la maturation survient pendant ou immédiatement après la relâche des particules virales, et c'est à ce moment que la PR du VIH-1, l'aspartyl protéase, clive Pr160^{GagPol} par hydrolyse de ses liaisons peptidiques, donnant ainsi naissance aux enzymes PR, RT et IN. Pour ce faire, la PR se doit d'être active au sein même du précurseur (276). Pr55^{Gag}, clivée par la même PR, génère quant à elle les protéines MA, CA, NC et p6 (27), ainsi que les peptides p1 et p2, qui eux, sont responsables d'un assemblage efficace et ordonné. Cette maturation de protéines induit en particulier un changement de conformation de MA par *myristoyl switch* (277) (278) (279) qui provoque son relâchement de la membrane plasmique. En effet, le myristate est exposé dans le précurseur Pr55^{Gag}, mais séquestré dans MA (280) (213). Enfin, de cette maturation résulte la formation du nucléoïde.

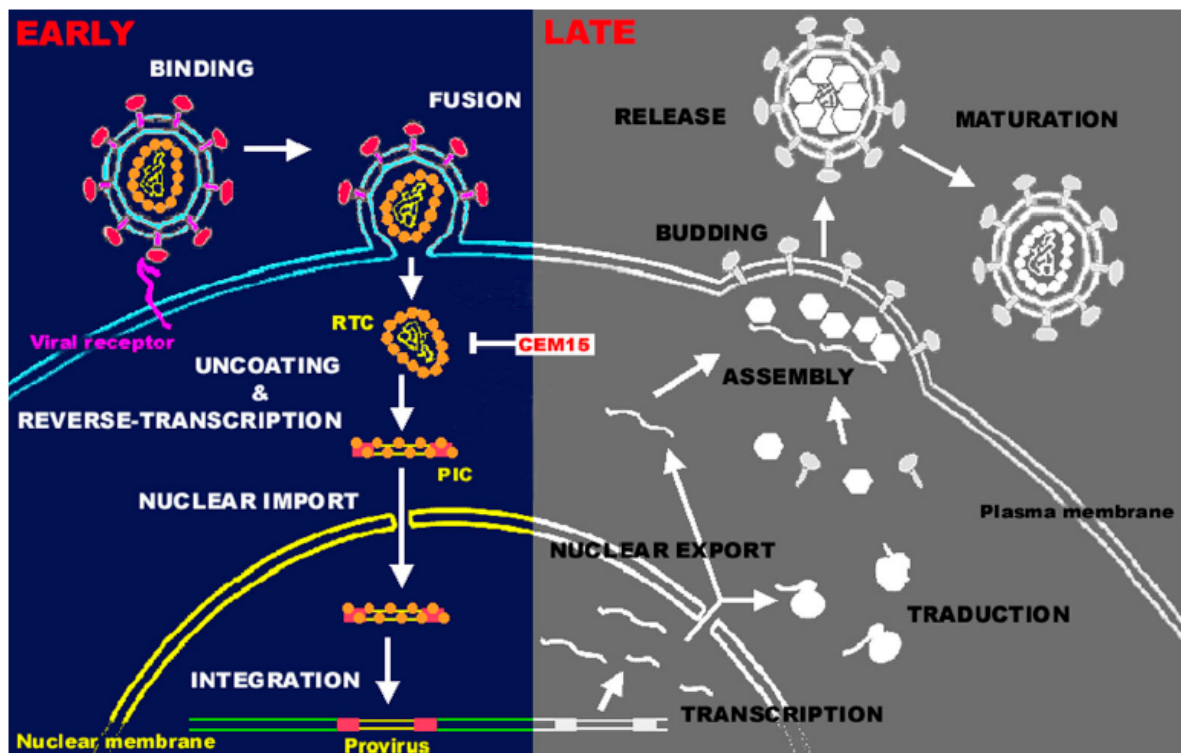


Figure 8. Étapes précoces (*early*) et tardives (*late*) du cycle de réplication du VIH-1 (adapté de (103)).

1.5 Pathogenèse de l'infection au VIH-1

Essentiellement, le VIH cause, chez les individus qu'il infecte, la destruction du pool des lymphocytes T exprimant le CD4, menant ultimement à l'effondrement du système immunitaire (281). La majorité (70-80%) des patients sont des progresseurs typiques (*typical progressors*) chez qui l'infection évolue de la primo-infection ou infection primaire à la période de latence clinique, puis vers le SIDA en un temps moyen de huit à dix ans (révisé dans (281)). Les autres patients se répartissent en trois groupes supplémentaires, soit les progresseurs lents (*long-term survivors*), les progresseurs rapides (*rapid progressors*) et les non progresseurs à long terme (*long-term nonprogressors*).

1.5.1 Transit du VIH-1 dans le corps humain

1.5.1.1 Entrée du virus dans l'hôte

Rappelons qu'outre sa transmission verticale ou par voie parentérale, le VIH-1 est majoritairement transmis par rapports sexuels (1). Ce virus peut entrer dans le corps humain directement dans le sang et ce, dans tout type de transmission. Autrement, le VIH-1 peut gagner les muqueuses des tractus gastro-intestinal, ano-rectal ou uro-génital sous forme de virions libres dans le colostrum, le sperme ou les sécrétions cervico-vaginales ou bien en tant que virions associés aux cellules mononucléées retrouvées dans ces diverses sécrétions (282). Dans le cas précis de la transmission *in utero*, le VIH-1 peut gagner les tissus lymphatiques associés au tube digestif (*gut-associated lymphoid tissues* (GALT)) de l'enfant à naître par l'ingestion du liquide amniotique qu'il contamine (283).

1.5.1.2 Dissémination du virus dans l'hôte

1.5.1.2.1 Transcytose et cellules M

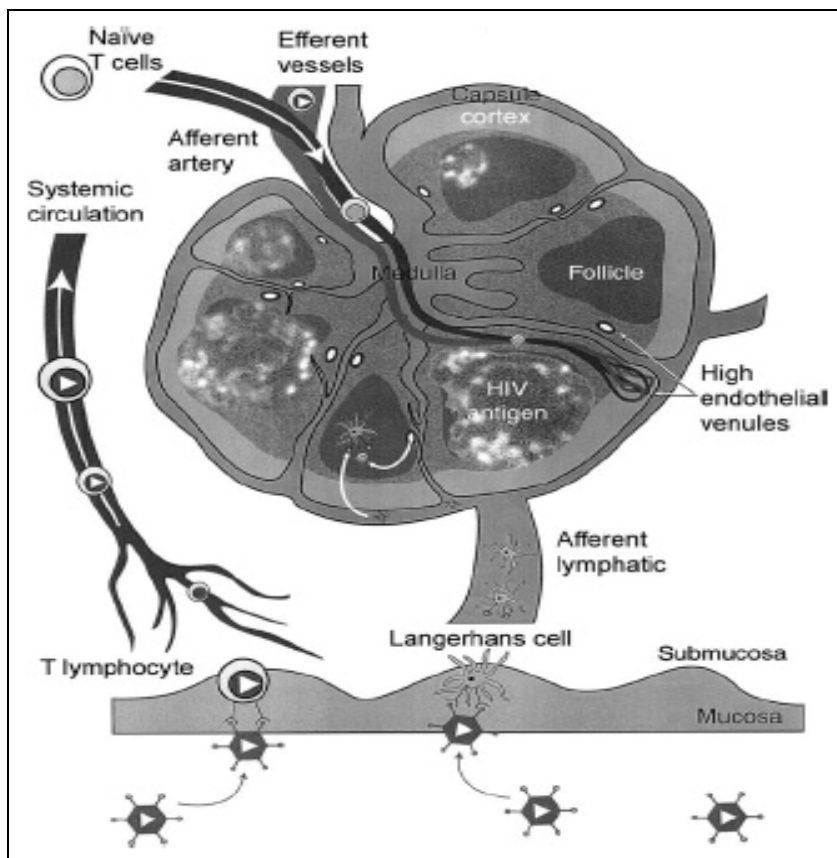
Dans les sites anatomiques énumérés ci-haut, les muqueuses renferment des cellules épithéliales polarisées qui ont la capacité de transporter des vésicules par un processus nommé transcytose. Le VIH-1 peut bénéficier de ce système pour traverser la muqueuse (284) et rejoindre alors les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les CPA et les lymphocytes B de la *lamina propria* très vascularisée (285). De fait, les cellules mononucléées infectées par le VIH-1 contenues dans les sécrétions adhèrent au côté apical des cellules épithéliales et ce contact engendre le bourgeonnement des virions (286). Ensuite, ces derniers sont pris en charge par les cellules épithéliales par une interaction de la gp120 virale avec le GalCer contenu dans les radeaux lipidiques de ces cellules (287). Les particules virales sont finalement acheminées dans des structures ressemblant à des endosomes vers le côté basolatéral où elles sont relâchées (286).

Or, dans la majorité des cas de transmission du VIH-1, il semblerait que le virus entre dans l'organisme plus souvent qu'autrement sous forme de virions libres (288) et la transcytose s'avère dès lors peu efficace (286) (289). En revanche, le VIH-1 pourrait être transporté à travers l'épithélium par des cellules M (283) qui, présentes dans l'intestin, sont par contre absentes du vagin (290) (291). Ces cellules spécialisées endocytosent les antigènes à leur membrane apicale, les transportent dans des vésicules vers leur membrane basolatérale et les exocytosent dans la *lamina propria* (révisé dans (292)).

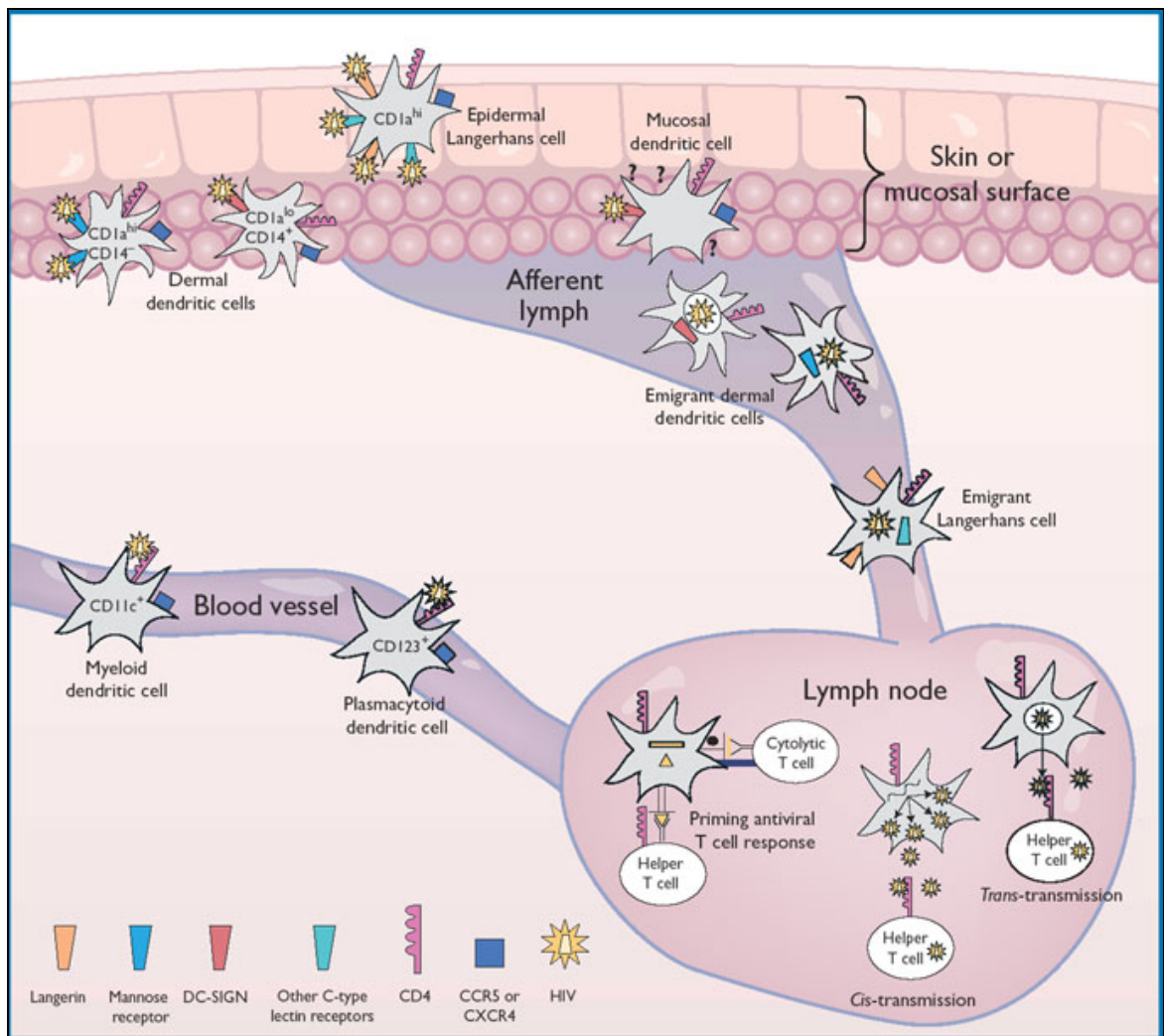
1.5.1.2.2 Cellules dendritiques

À vrai dire, la transmission sexuelle du VIH-1 est tributaire des cellules dendritiques - dont certaines immatures sont nommées cellules de Langerhans - pour capturer et véhiculer le virus à travers les muqueuses et directement aux organes lymphatiques où il infectera les

lymphocytes T (révisé dans (293)) (294) (295) (figure 9 A et B). On retrouve les cellules de Langerhans par ailleurs en abondance dans l'épithélium vaginal et cervical (296) (297), ainsi que dans celui du prépuce humain (298). Ces cellules, par la lectine Langerine qui lie la gp120 (299) (300), capturent le VIH - jusqu'à 10^{11} virions pour une personne de 70 kg (301) - et l'amènent aux ganglions par les vaisseaux lymphatiques (302) (figure 9 B). En ce qui concerne les autres cellules dendritiques des muqueuses, le transport dépend plutôt de la liaison de la gp120 de l'enveloppe virale à la molécule DC-SIGN des cellules (303) (304) (figure 9 B). Également, quoique rarement observé *in vivo*, le VIH-1 peut infecter des cellules de Langerhans (305), comme d'autres cellules dendritiques (voir section 1.5.4.4). Les cellules dendritiques infectées d'une manière productive peuvent transmettre en *cis* le virus nouvellement synthétisé aux lymphocytes T CD4+, alors qu'une transmission en *trans* référerait plutôt à la livraison, aux lymphocytes T CD4+, du virus capturé et séquestré par les cellules dendritiques (306) (figure 9 B).



A.



B.

Figure 9. Établissement de l'infection au VIH dans les ganglions lymphatiques suite à l'exposition initiale des cellules des muqueuses au VIH. (A.) Les cellules de Langerhans et les lymphocytes T CD4⁺ mémoires (noyau foncé) des muqueuses sont susceptibles au VIH (triangles blancs) (295). (B.) Les cellules dendritiques des muqueuses expriment une panoplie de récepteurs qui lient la gp120 virale. Les cellules dendritiques qui ont capturé le VIH peuvent devenir infectées ou isoler le virus dans leurs compartiments endosomiques (virus encerclé) (306).

Une fois dans la zone des lymphocytes T des ganglions lymphatiques, les cellules de Langerhans - ou d'autres cellules dendritiques des muqueuses - présentent un antigène à des lymphocytes T auxiliaires qui en retour, stimulent les lymphocytes B spécifiques à cet

antigène à produire des anticorps. De telles conditions d'activation rendent les lymphocytes T évidemment plus susceptibles au VIH, puisqu'il infecte particulièrement ce type de cellules activées (307). Aussi, le sang expédié aux ganglions lymphatiques contient des lymphocytes naïfs (figure 9 A) qui, ressortant de ces organes par le canal lymphatique efférent, gagnent éventuellement l'ensemble du corps humain. C'est dire à quel point le virus a l'opportunité d'être en étroite relation avec un grand nombre de cellules susceptibles tels les lymphocytes T CD4+, activés ou au repos, d'ailleurs retrouvés infectés dans des biopsies d'organes lymphatiques d'animaux et d'humains en primo-infection (308). La très grande quantité de virions retrouvés dans le sang - jusqu'à 10^7 copies d'ARN du VIH-1 par millilitre de plasma (309) - lors de la primo-infection (décrite dans la section 1.5.2.1) serait justement le résultat d'une très forte réplication virale ayant lieu dans les organes lymphatiques (281). La réplication du virus de l'immunodéficience simienne est par ailleurs détectable dans les ganglions lymphatiques iliaques de macaques rhésus dans les jours suivant une inoculation vaginale (310).

De même que des ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphatiques associés aux muqueuses (*mucosal-associated lymphoid tissues* (MALT)) forment les organes lymphatiques secondaires humains, tandis que la moelle osseuse et le thymus sont les organes lymphatiques primaires. En plus d'inclure les tissus lymphatiques associés au tube digestif (soit les amygdales palatines, les adénoïdes, l'appendice et les plaques de Peyer du petit intestin), le MALT comprend les tissus lymphatiques associés aux bronches (*bronchial-associated lymphoid tissues* (BALT)). La pathogenèse induite par le VIH a lieu principalement dans les organes lymphatiques (311) et plus précisément, les amygdales palatines (que nous désignerons simplement amygdales) constituent un site de réplication du virus chez les humains infectés par le VIH-1 (312). La surface des cellules dendritiques folliculaires (*follicular dendritic cells*) des follicules lymphatiques (*lymphoid follicle*) (figure 10) regorge particulièrement de virions infectieux (313) qui peuvent être transférés aux lymphocytes T CD4+ avoisinants (révisé dans (314)) (315).

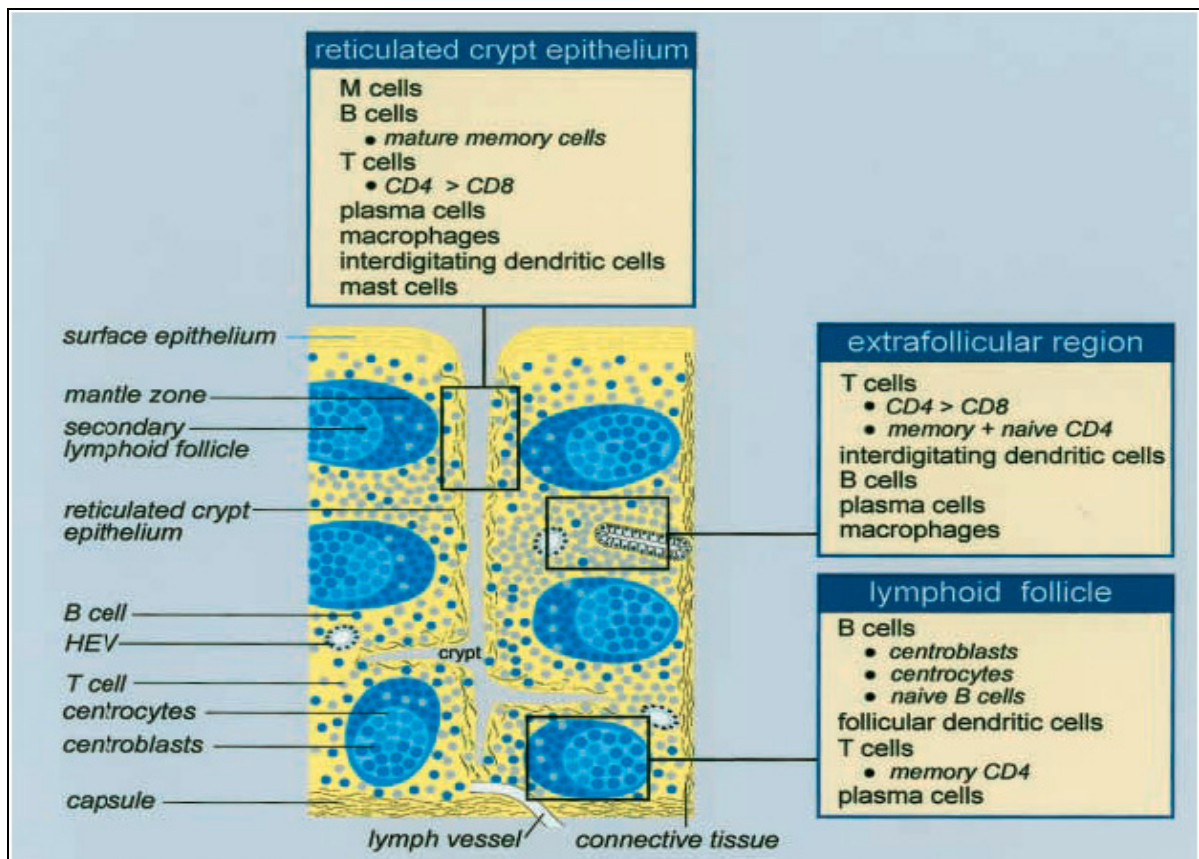


Figure 10. Structure d'une amygdale humaine et composition cellulaire des différents compartiments de l'amygdale. L'ordre d'énumération des types cellulaires dans chaque boîte reflète leur importance, en débutant par les plus populeuses (292).

1.5.1.2.3 Monocytes et macrophages

Bien que la prévalence de macrophages infectés par le VIH-1 de la muqueuse y soit aussi faible que 0,06% des cellules mononucléées de la *lamina propria*, les macrophages intestinaux constituent un réservoir important du VIH-1 (283). Ceci est dû au fait que le tractus gastro-intestinal comprend le plus grand tissu lymphatique associé aux muqueuses du corps humain (316) (283). Ces macrophages de la *lamina propria* de la muqueuse en question sont issus des monocytes infectés du sang qui y ont migré et s'y sont différenciés,

soit en réponse aux stimuli inflammatoires, soit pour y remplacer des macrophages en vieillissement ou morts (317) (318) (319).

1.5.1.2.4 Lymphocytes T CD4+

Somme toute, chez l'humain, le VIH-1 infecte premièrement et majoritairement les lymphocytes T CD4+ (320) (321), surtout dans l'épithélium rectal et cervical. Cette infection est d'autant plus importante que le tractus gastro-intestinal est riche en lymphocytes T fraîchement activés à cause de l'exposition fréquente aux antigènes ingérés. Les lymphocytes T CD4+ ainsi infectés se disséminent ensuite de façon systémique (figure 9 A) et constituent le principal compartiment cellulaire dans lequel le VIH-1 se réplique activement tout au long de l'infection (révisé dans (322)).

1.5.2 Phases de l'infection au VIH-1

1.5.2.1 Primo-infection

Les symptômes de la primo-infection, qui rappellent ceux de la mononucléose, sont observés chez 40-70% des individus infectés en moyenne 12 jours après l'exposition au VIH-1 (323). Six à huit semaines suivant la venue des symptômes, la primo-infection se termine habituellement par une diminution de la réplication virale qui coïncide avec l'apparition de réponses immunes spécifiques au VIH-1 (révisé dans (281)), en l'occurrence l'action des lymphocytes T cytotoxiques et des anticorps dirigés contre les glycoprotéines de l'enveloppe virale et contre la protéine structurale du VIH. Malheureusement, les défenses de l'hôte demeurent impuissantes face aux réservoirs cellulaires dans lesquels le VIH est latent (révisé dans (281)), c'est-à-dire dans un état non productif, mais réversible. Ces réservoirs sont principalement composés de lymphocytes T

CD4+ mémoires au repos (324) (325) et de macrophages différenciés (326) (révisé dans (314)). Selon Siliciano et collaborateurs, cette latence post-intégration des lymphocytes T s'expliquerait par le retour d'une cellule activée infectée à un état de repos (324).

1.5.2.2 Latence clinique

La latence clinique qui suit la primo-infection est caractérisée par la dichotomie qui existe entre la faible charge virale du sang périphérique et celle plus forte qui existe dans les organes lymphatiques (327). De fait, on retrouve chez les individus porteurs du virus, de 5 à 10 fois plus de cellules infectées par le VIH-1 dans les organes lymphatiques (ganglions, adénoïdes et amygdales) que dans le sang périphérique (328). Pantaleo et collaborateurs ont énuméré plusieurs facteurs contribuant à la persistance de la virémie dans de tels organes, dont le fort taux d'activation des cellules s'y trouvant, le piégeage des virions dans le réseau de cellules dendritiques folliculaires, ainsi qu'une série de conditions propres à l'environnement à l'intérieur des organes lymphatiques comme le contact étroit entre les cellules, une plus grande concentration de virions et une plus grande disponibilité de lymphocytes (281).

1.5.2.3 Phase symptomatique

Graduellement, l'épuisement de la population des lymphocytes T CD4+ place au premier plan l'infection et la réplication du VIH-1 au sein des monocytes et des macrophages (283) (329). De plus, au fur et à mesure que l'infection progresse, la différence entre les charges virales du sang et des organes lymphatiques diminue. De 1,5 à 150 millions de virions (i.e., de 150 à 15 000 pg) par millilitre de sang peuvent alors être détectés (330). Cette situation est due à une augmentation du nombre de virions dans le sang qui elle, résulte de la rupture de l'architecture des organes lymphatiques (révisé dans (281)) où le virus se réplique et persiste (331) (332) (328). Finalement, arrive la phase symptomatique (aussi nommée

SIDA) définie par un taux de CD4+ égal ou en dessous de 200 par microlitre (333) et accompagnée de maladies opportunistes la révélant, dont la plus courante est la pneumocystose.

1.5.3 Phénotype viral au cours de l'infection

Bien que des virions du VIH-1 aux tropismes distincts (R5 et X4) soient transmis (334) (335) (336), il est connu que ceux ayant une affinité pour le CCR5 circulent en majorité chez l'hôte, infectant et détruisant les lymphocytes T CD4+ mémoires (337). Ce phénomène, encore difficilement explicable, est observé dès les premiers instants de l'infection (338) (339) (340). Par ailleurs, il existe une allèle mutante du récepteur de chimiokine CCR5, nommée CCR5/delta32, qui est exprimée chez environ 1% de la population d'origine caucasienne. Celle-ci contient une délétion de 32 paires de bases et code pour une protéine tronquée qui, n'étant pas exprimée efficacement à la surface cellulaire, ne peut remplir adéquatement son rôle de co-récepteur du VIH-1. En conséquence, les cas d'infection au VIH-1 chez des personnes homozygotes pour cette allèle demeurent rarissimes (révisé dans (341)), puisque la présence de CCR5/delta32 confère un haut degré de résistance contre les souches du VIH-1 utilisant ce co-récepteur (342).

Le phénotype viral R5 persiste tout le long de l'infection au VIH-1 (343) (344), même après l'émergence tardive des variants X4 (345) (346) (347) qui survient chez au moins la moitié des patients non traités (348). Ce changement de phénotype, d'origine obscure, coïncide avec la chute marquée dans le nombre de lymphocytes T CD4+ (349). Il est d'ailleurs surprenant que ce changement de phénotype apparaisse si tard dans l'infection. D'une part, une simple mutation d'un résidu chargé négativement en position 322 de la région V3 de la gp120 en un résidu chargé positivement est suffisante pour qu'un virus R5 en devienne un X4 (350) (351) (352). D'autre part, une telle mutation doit survenir relativement souvent à cause du taux élevé d'erreurs de la RT du VIH-1 (en moyenne 1

erreur sur 10^4 nucléotides qu'elle assemble) et de l'absence de tout mécanisme de correction de ces erreurs (109) (353).

1.5.4 Types cellulaires touchés

1.5.4.1 Lymphocytes T et NK

À tout stade de l'infection au VIH, le tractus gastro-intestinal présente la déplétion en lymphocytes T CD4+ la plus substantielle, avec une atteinte particulièrement prononcée de ceux exprimant le CCR5, formant justement la majorité des lymphocytes T CD4+ en ce site anatomique (354). Le déclin généralisé des lymphocytes T CD4+ est attribuable à l'infection, par le VIH-1, de leurs précurseurs dans le thymus (355), mais aussi à la destruction des lymphocytes T CD4+ par le virus.

Parmi les mécanismes de destruction proposés, il y a l'effet conféré par le fardeau métabolique que la réplication du VIH représente pour la cellule infectée (356) (357) et les actions de la gp120 et de Tat qui favorisent la mort programmée de la cellule, soit l'apoptose. Exprimée en surface des cellules infectées, la gp120 interagit avec le CD4, le CXCR4 ou le CCR5 des cellules non infectées et provoque la fusion des cellules, donc l'apparition d'un syncytium (révisé dans (358)), puis une apoptose significative (359). Phénomène observé *in vitro* comme *in vivo*, la constitution de syncytia figure parmi les moyens les plus connus dont dispose le VIH-1 pour induire la mort cellulaire (révisé dans (44)). Aussi, le VIH-1 a une propension à perdre sa gp120 *in vivo* (54) (360) et la simple interaction de la gp120 soluble avec le CD4 résulte, d'une part, en la production d'interféron alpha (IFN- α) par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (ayant un précurseur commun avec les lymphocytes) (361). Cette cytokine induit à son tour l'expression, par les lymphocytes T CD4+ et les monocytes, d'un ligand de la même famille que le ligand de Fas et nommé TRAIL (*tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand*) (361). D'autre part, la liaison de la gp120 à la surface des

lymphocytes T CD4⁺ induit l'expression du récepteur de TRAIL, nommé DR5 (*death receptor 5*), ce qui en bout de ligne, mène à l'apoptose des lymphocytes T auxiliaires (361). De son côté, la protéine Tat augmente l'apoptose induite par le CD3 des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ du sang périphérique (362), un processus qui ne requiert pas l'interaction de Fas avec Fas ligand, contrairement par exemple, à l'induction de l'apoptose par un superantigène (363). Rappelons qu'un superantigène est une molécule qui provoque une interaction non spécifique entre un représentant du CMH de classe II et le TCR, ce qui a pour effet de déclencher une réaction immune exacerbée. De plus, les monocytes qui ont été exposés à la protéine Tat du VIH-1 sécrètent le ligand TRAIL, qui induit l'apoptose préférentielle des lymphocytes T CD4⁺ non infectés (364).

Outre les lymphocytes T CD4⁺, le VIH-1 infecte les lymphocytes T CD8⁺ activés (365) (366) et les cellules NK (*natural killer*) (367) qui, par ailleurs, expriment tous deux la molécule CD4 (368) (369) (367). Surtout, ces cellules cytotoxiques présentent un dysfonctionnement du fait qu'elles dépendent de l'interleukine (IL)-2 qui est issue de leur contact avec les lymphocytes T CD4⁺ (370) (371), eux-mêmes perturbés par le VIH-1.

1.5.4.2 Lymphocytes B

Les lymphocytes B constituent, au même titre que les cellules dendritiques folliculaires (372) (373), un important réservoir extracellulaire de VIH-1 permettant sa dissémination (374). De plus, sans les infecter de manière productive *in vivo* (375) (374), le VIH-1 affecte assurément les lymphocytes B, comme le reflète le plus grand renouvellement de ce type cellulaire et des lymphocytes T (376). De plus, l'infection au VIH est caractérisée *in vivo* par une hypergammaglobulinémie (377), c'est-à-dire une production de grandes quantités d'anticorps, surtout de la classe IgG (378) qui apparaît dans les mois suivant la primo-infection (379) (380). Les anticorps ainsi formés sont souvent de faible affinité ou dirigés contre de nombreux antigènes du soi (381) et leur production est associée à la virémie (382) (383) (384).

Rappelons que les anticorps des classes IgG, IgA et IgE sont produits par les lymphocytes B en une séquence d'événement encore mal définie survenant dans les organes lymphatiques, l'endroit même où le VIH peut entrer en contact avec un grand nombre de ces cellules. Les lymphocytes B nouvellement formés, dits naïfs, sont issus de la moelle osseuse où surviennent les réarrangements des segments variables/de diversité/de jonction (VDJ) des gènes variables des chaînes lourdes des immunoglobulines dans les cellules pro-B, puis celui des segments VJ des gènes variables des chaînes légères dans les cellules pré-B. Enfin, survient l'expression d'IgM en surfaces des lymphocytes B immatures et la venue d'IgD sur les lymphocytes B matures. Ces derniers quittent la moelle osseuse pour emprunter la circulation sanguine, migrer à travers les veinules post capillaires spécialisées (*high endothelial venules* (HEV)) (385) et arriver dans les organes lymphatiques comme les amygdales où se concentrent les antigènes. Dans les follicules de tels organes, la chimiokine CXCL13 est sécrétée par des cellules stromales et elle y attire les lymphocytes B (386) (387). Là, lesdits lymphocytes sondent les cellules dendritiques folliculaires qui sont spécialisées dans la capture et l'exhibition d'antigènes (388). En surface de ces mêmes lymphocytes, la reconnaissance d'un antigène par les récepteurs des lymphocytes B (*B cell receptor* (BCR)) - formés d'IgM spécifiques à cet antigène - induit des changements dans les récepteurs de chimiokine du lymphocyte (389). Ainsi, les lymphocytes B deviennent plus sensibles aux chimiokines CCL21 et CCL19 et sont relocalisés à la frontière avec les lymphocytes T où les deux types de lymphocytes entrent en contact (389). Mentionnons que l'expression de CD40L est induite chez les lymphocytes T par la stimulation de leur TCR lors de la présentation d'un antigène au préalable par des cellules dendritiques ou à ce moment par des lymphocytes B (révisé dans (390)). Suite à l'activation des lymphocytes B par interaction avec les lymphocytes T activés, la majeure partie des lymphocytes B se différencient en plasmocytes, tandis que quelques-uns migrent au follicule (391), où ils prolifèrent et forment des centres germinaux, donnant naissance à d'autres plasmocytes et à des lymphocytes B mémoires (392) (393). Les plasmocytes qui sortent dans la lymphe s'établissent dans la moelle osseuse ou dans le petit intestin où ces cellules remplissent leur devoir de sécrétion d'anticorps (394).

Bien que les modalités de la rencontre entre les lymphocytes B et les lymphocytes T demeurent obscures (révisé dans (395)), des analyses immunohistologiques de morceaux

d'amygdales ont montré que la distribution des cellules contenant CD40L est conforme à leur interaction avec les lymphocytes B (390). De fait, la stimulation du récepteur CD40 des lymphocytes B par la molécule CD40L en surface des lymphocytes T auxiliaires activés est nécessaire à la formation de centres germinaux et à la commutation de classe des immunoglobulines, à la maturation de l'affinité des anticorps et à la formation de lymphocytes B mémoires qui s'y produisent (392). Le mécanisme de commutation de classe, encore peu connu, résulte en la délétion de gènes de la région constante des chaînes lourdes des immunoglobulines et en la juxtaposition de séquences d'ADN à être exprimées (396) (figure 11). Cette étape contribue donc à changer la fonction des anticorps à être sécrétés. Parallèlement, à la commutation de classe, l'affinité pour l'antigène est augmentée par le processus d'hypermutation somatique qui permet l'introduction de mutations ponctuelles dans les gènes de la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (397). Ces deux phénomènes d'altération des gènes des immunoglobulines dépendent de l'action de la cytidine désaminase induite par l'activation (*activation-induced deaminase* (AID)) (révisé dans (396)). Enfin, les lymphocytes B sont sélectionnés sur la base de leur spécificité pour les antigènes qu'arborent les cellules dendritiques folliculaires dans leur environnement (398).

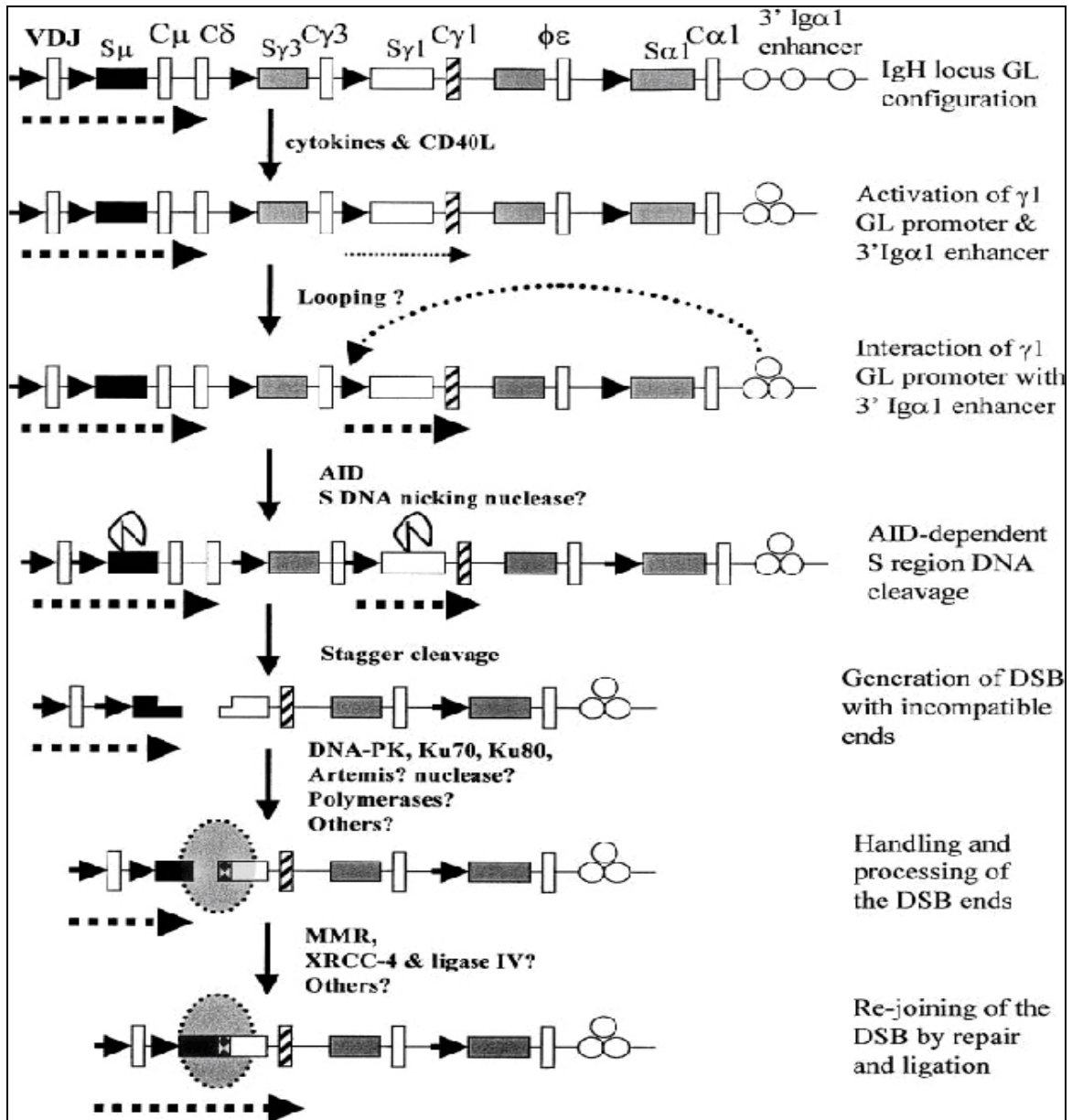


Figure 11. Commutation de classe vers IgG1. Les cytokines appropriées et la liaison de CD40 en surface des lymphocytes B activent le promoteur (flèche courte) en 5' du gène de la région constante γ_1 (C γ_1) et donc sa transcription (flèches longues), menant à l'accumulation de transcrits stériles (*germline (GL) transcripts*). La AID catalyse alors la désamination de résidus dans la région *switch* γ_1 (S γ_1). Le clivage produit des brèches dans l'ADN double brin (*double-strand break (DSB)*) qui sont arrangées par le complexe de réparation de l'ADN (ovales). Le rôle d'enzymes telles DNA-PK, Ku70, Ku80, Artemis, MMR et XRCC-4 dans ces réactions demeure indéfini (396).

1.5.4.3 Monocytes et macrophages

Rappelons que les macrophages des tissus sont susceptibles à l'infection par le VIH-1, comme les monocytes du sang, bien que ces derniers le soient moins (399). Les macrophages infectés par le virus affichent un dysfonctionnement de la phagocytose et de la destruction de parasites intracellulaires tels *Toxoplasma* (400), ainsi que de la production de cytokines (401).

Tôt après la primo-infection, le VIH-1 entre dans le système nerveux central (402) (403) (404) où son principal réservoir cellulaire est constitué de monocytes, de macrophages et de microglies (révisé dans (39)). La migration, à travers les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, de monocytes infectés par le virus serait d'ailleurs à l'origine de la démence associée au SIDA (405). Le VIH-1, en se liant au CSPG (39) infecte également les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau, constituants cellulaires majoritaires de la barrière hémato-encéphalique. Malgré tout, la grande majorité des aspects de l'entrée virale dans le système nerveux central, ainsi que de l'infection et de la propagation du VIH-1 qui y prennent place, demeurent inconnus (39).

1.5.4.4 Cellules dendritiques

Bien que les cellules dendritiques supportent un certain niveau de réplication du VIH *in vivo* (406), elles semblent surtout transporter le virus des muqueuses aux ganglions lymphatiques et le transférer aux lymphocytes T (407). Les cellules dendritiques immatures répliqueraient les virus au tropisme R5, alors que les cellules dendritiques matures seraient permissives à l'entrée des virus R5 et X4, mais moins aptes à les répliquer (408). Par ailleurs, une récente étude a montré que la molécule DC-SIGN est en fait responsable de l'infection des cellules dendritiques et du transfert du VIH aux lymphocytes T, un transfert dit en *cis* (409). Les auteurs de cette étude, Burleigh et collaborateurs, contredisent ainsi

Kwong *et al.* en excluant tout rôle des particules de VIH infectieuses entreposées dans les cellules dendritiques dans la transmission, alors en *trans*, du virus aux lymphocytes T (43).

1.5.5 Rôles des molécules d'origine cellulaire en surface du virus dans la pathogenèse au VIH-1

En 1993, une équipe rapportait que le VIH-1 concentre, en son enveloppe, des molécules d'adhésion provenant de l'hôte (265). Peu après, le groupe d'Hildreth prouvait que de telles molécules présentes dans l'enveloppe virale conservent leur fonction et suggérait que ces protéines aient un impact sur le tropisme, le pouvoir infectieux et la dissémination du VIH (410). Aujourd'hui, les molécules d'origine cellulaire présentes en surface du VIH-1 peuvent être regroupées en trois catégories selon leur(s) fonction(s) (411) : protection contre la réponse immune ou certains médicaments, modification de l'état d'activation de la cellule cible et facilitation de l'attachement, ainsi que de l'entrée.

En effet, plusieurs équipes ont observé que la présence de l'intégrine ICAM-1 dans l'enveloppe du VIH-1 compensait les effets négatifs envers le virus des anticorps neutralisants (412) (413) (414) (415) et de l'inhibiteur de fusion T-20 (416). Le VIH-1 est aussi protégé de la virolyse par le complément par la présence, dans son enveloppe, des molécules CD55, CD59 (417) (418) et CD46 (419).

De plus, le VIH-1 a le pouvoir, encore par le biais des molécules d'origine cellulaire qu'il s'approprie, de modifier l'état d'activation des cellules qu'il cible. Parmi les molécules avec un tel potentiel, il y a d'une part HLA-DR qui, même en surface du VIH-1, peut être chargée d'un peptide et induire, en collaboration avec la molécule de costimulation CD86 également sur le virus, l'activation de facteurs de transcription, ainsi que la transcription de l'ADN intégré aussi bien que non intégré dans des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au peptide en question (420). Dans une autre étude, HLA-DR a induit la prolifération des lymphocytes T, leur production de cytokines et leur apoptose en présence d'un superantigène (330). La simple liaison du TCR par la molécule HLA-DR présente sur le VIH-1 a également été rapportée comme menant à l'apoptose des lymphocytes T (421). On

peut aussi penser qu'en absence de molécules de costimulation comme CD86, la molécule HLA-DR associée au VIH induit l'anergie des lymphocytes T CD4+. D'autre part, CD86 présente en surface du VIH-1 a le pouvoir, à elle seule, d'activer l'expression de gènes chez les lymphocytes T (422) (423). Enfin, nous avons récemment montré que la molécule CD40L présente dans l'enveloppe du VIH-1 active un autre type cellulaire, soit les lymphocytes B ((270), voir chapitre 5).

Aussi, étant donné que le taux de particules infectieuses de VIH-1 peut être aussi bas que une sur dix millions (424) (425) (426), on se doit de prendre en considération tout élément ayant le potentiel d'augmenter le caractère infectieux du virus pour pouvoir éventuellement le contrer. Parce qu'elles permettent au VIH-1 de faire des interactions supplémentaires à celle intervenant entre les glycoprotéines de l'enveloppe et le CD4, les molécules HLA-DR et ICAM-1 présentes dans l'enveloppe virale vont jusqu'à respectivement doubler (45) (427) et décupler (428) (429) le pouvoir d'infection du virus. Si le ligand de ICAM-1, LFA-1, est en plus exprimé sous sa forme activée, donc de haute affinité, l'infection peut être augmentée par un facteur de près de cent (430). De son côté, la molécule CD86 en surface du VIH-1 facilite aussi l'attachement et l'entrée du virus, ce qui augmente sa capacité à infecter des cellules exprimant ses récepteurs (CD28 et CD152). On peut penser que des molécules d'origine cellulaire et acquises par le VIH-1 faciliteraient ainsi la liaison du virus à des cellules exprimant moins de CD4 que les lymphocytes T auxiliaires - comme des macrophages - et contribueraient à l'infection de telles cellules. Enfin, une étude portant plus précisément sur l'entrée virale montre que les virions arborant ICAM-1 sont plus enclins à engendrer une infection productive que ceux qui en sont dépourvus (431). Notons que l'expression de hauts niveaux de molécules d'adhésion comme LFA-1 par les lymphocytes T mémoires (432) n'est peut-être pas étrangère au fait que ces cellules soient particulièrement touchées par l'infection au VIH-1 (433).

En plus de ces diverses fonctions, l'acquisition de CD40L ((270), voir chapitre 5) et des intégrines LFA-1 et VLA-4 (*very late antigen 4*) (434), ainsi que ICAM-1 (435), facilite la dissémination du VIH-1. Il a aussi été suggéré que la molécule d'adhésion CD44 joue un rôle dans le trafic du VIH vers les tissus lymphatiques (436). D'une part, la molécule CD44, présente à la surface des lymphocytes T, est responsable de la domiciliation

lymphocytaire (*lymphocyte homing*) (437). D'autre part, la même molécule est retrouvée en grand nombre sur le VIH-1 tout au long de l'infection (438) et permet au virus de se lier aux cellules endothéliales exprimant le glycosaminoglycane dit acide hyaluronique (410).

1.6 Lutte contre l'infection au VIH-1

1.6.1 Prévention

1.6.1.1 Développement de condoms

Pour prévenir la forte transmission sexuelle de l'infection au VIH, il est à souhaiter que nous disposions le plus tôt possible d'outils comme le Condom Invisible[®], actuellement en phase II d'essai clinique au Cameroun. En plus de présenter une barrière mécanique et un microbicide contre le virus (439), ce gel a l'avantage de protéger le partenaire sexuel receveur à l'insu du partenaire donneur.

1.6.1.2 Développement de vaccins

Dans le même ordre d'idées, de multiples efforts sont mis à contribution pour créer un vaccin contre le VIH. Le fait que le VIH attaque précisément les cellules de l'immunité, qu'il s'adapte à la pression immune et qu'il soit intégré au sein de la cellule qu'il infecte représente les principaux obstacles rencontrés par les vaccinologues. De toute évidence, l'idée d'un vaccin à base de virus vivant atténué, bien que présentant l'avantage de générer une bonne immunité, est controversée compte tenu du danger que le VIH retrouve, par mutation, son pouvoir pathogène. Aussi, ont été testés, mais en vain, des vaccins composés du virus inactivé ou basés sur ses protéines, des types de vaccins d'ailleurs déjà connus pour générer une immunité moindre (440). De par les modes de transmission du VIH, un

vaccin dirigé contre ce virus se doit bien entendu de provoquer une réponse tant mucoale que systémique (440). De plus, le VIH pouvant circuler en association avec des cellules ou sous forme de particules virales libres, la neutralisation efficace du virus requiert une immunité à la fois humorale et cellulaire (441) (440).

Quelques prototypes de vaccins à base de vecteurs adénovirus et contenant des fragments de gènes du VIH tels *gag*, *pol* et *nef* sont actuellement en essai clinique (442). Une immunisation à l'aide de pseudovirions du VIH - des particules ne comprenant pas le génome viral - constitue également une avenue des plus intéressantes, puisque ces derniers peuvent être manipulés pour bien mimer le virus, sans pour autant causer la maladie. Des particules ressemblant à des lentivirus sont d'ailleurs connues pour solliciter les réponses immunes mucoale et systémique (révisé dans (443)). De plus, les antigènes des pseudovirions peuvent être transformés et présentés dans le contexte du CMH de classe I et de classe II, induisant ainsi des réponses immunitaires de la part des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes T CD8+ (444) (445) (446). Ces réponses sont par ailleurs augmentées par la présence de CD40L dans les pseudovirions (447). Enfin, en venir à faire produire par le corps humain des anticorps neutralisants de large spectre comme le b12, dont la structure lorsque complexé à la gp120 vient d'être déterminée à forte résolution, constituerait une percée majeure dans le domaine (448).

1.6.2 Traitement antirétroviral

Certes, les médicaments demeurent hautement toxiques et ne guérissent pas l'infection au VIH (puisque'il subsiste des réservoirs de lymphocytes T CD4+ infectés au repos). Sans compter que le virus leur devient résistant (révisé dans (443)). Cependant, nous disposons tout de même d'une vingtaine de produits faisant l'objet de licences qui réduisent la réplication virale et les symptômes associés à cette infection. Ces derniers interfèrent avec la rétrotranscription, la maturation ou l'entrée du VIH (449). Afin d'étendre l'accès aux traitements contre le VIH à un plus grand nombre d'individus porteurs du virus, l'OMS a lancé en 2003 l'initiative appelée 3 millions d'ici 2005. Un récent sondage a montré que

des 39 pays touchés par ce programme, 36 ont développé un plan national de thérapie antirétrovirale contenant au moins un régime thérapeutique de première ligne recommandé par l’OMS, soit une trithérapie composée de stavudine (d4T), lamivudine (3TC), nevirapine (NVP), zidovudine (AZT) ou efavirenz (EFV) (450). Ainsi, on estime qu’entre 250 000 et 300 000 morts ont été évitées dans le monde en 2004-2005 (451).

1.6.2.1 Modes d’action des antirétroviraux

Parmi les médicaments énumérés ci-haut, d4T, 3TC et AZT sont des inhibiteurs nucléosidiques de la RT, tandis que NVP et EFV sont des inhibiteurs non nucléosidiques de la même enzyme virale. Les inhibiteurs nucléosidiques de la RT sont des substrats alternatifs de cette enzyme qui entrent donc en compétition avec les nucléosides physiologiques tels la thymidine (en concurrence avec AZT et d4T) et la cytidine (la rivale du 3TC). Présents sous leur forme active, soit en dérivé triphosphate, ces inhibiteurs induisent l’interruption de la synthèse d’ADN viral par absence de pont phosphodiester stabilisant le double brin (452). De leur côté, les inhibiteurs non nucléosidiques de la RT n’ont pas besoin d’être activés et n’agissent que sur le VIH-1. Ils se fixent à proximité du site de liaison des nucléosides, formant ainsi un complexe qui bloque le site catalytique de la RT, forçant cette dernière à lier moins de nucléosides et donc à être moins efficace (453).

Les autres médicaments anti-VIH sont les inhibiteurs de PR (comme l’indinavir (IDV) et le saquinavir (SQV)) et l’inhibiteur de l’entrée virale nommé T-20. Les inhibiteurs de PR se lient parfaitement au site actif de cette autre enzyme du VIH, ce qui l’empêche de catalyser le clivage de polyprotéines et de produire des particules virales matures et infectieuses. À titre d’exemple, un régime thérapeutique constitué de deux inhibiteurs nucléosidiques et d’un inhibiteur non nucléosidique a pu faire baisser la charge virale à moins de 50 copies/ml en 48 semaines chez 80% des patients d’une étude (454). Le T-20, récemment apparu sur le marché, est un large peptide qui lie la structure intermédiaire de la gp41 et qui interfère ainsi avec la fusion des membranes virale et cellulaire. Enfin, en ce moment, un inhibiteur de Vpr, particulièrement efficace dans les monocytes et macrophages, est en

essai pour empêcher le bourgeonnement du VIH-1 (455). D'autres traitements expérimentaux comprennent des inhibiteurs de l'IN.

Chapitre 2. Molécules d'origine cellulaire à l'étude

Les cellules dendritiques sont à coup sûr des acteurs d'envergure de l'immunité adaptative. CPA professionnelles, elles capturent des antigènes et migrent par la suite, tout en subissant une maturation, vers la zone riche en lymphocytes T des organes lymphatiques secondaires. Là, dans le contexte du CMH de classe II, elles présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4+ naïfs ou mémoires par liaison des récepteurs CD4 et TCR de ces lymphocytes, ce qui stimule leur expression de CD40L. Cette liaison et d'autres interactions, survenant respectivement entre les molécules LFA-3, CD80/CD86, CD40 et ICAM-1 de la CPA et les molécules CD2, CD28, CD40L et LFA-1 des lymphocytes T CD4+ naïfs (figure 12), résultent en l'activation et en la différenciation de ces derniers en cellules effectrices.

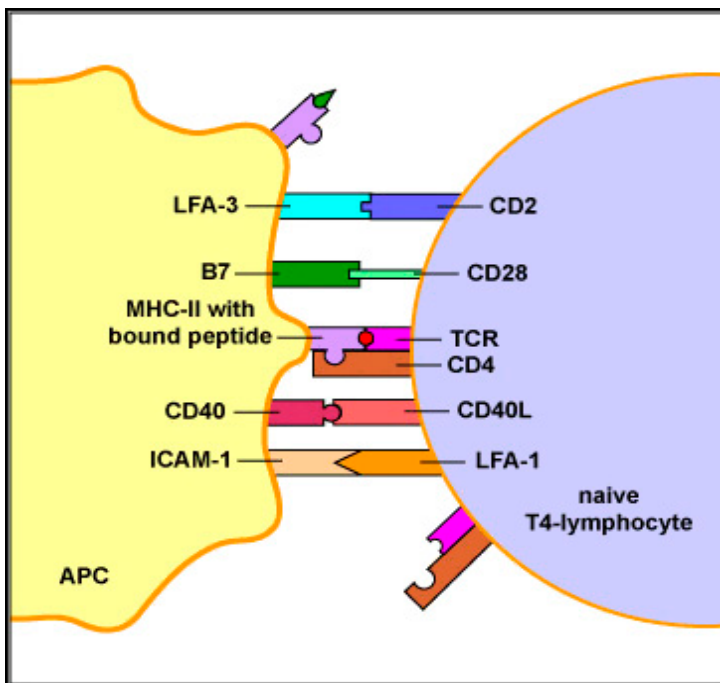


Figure 12. Synapse immunologique entre une cellule présentatrice d'antigène (*antigen-presenting cell* (APC)) et un lymphocyte T CD4+ naïf (*naive T4-lymphocyte*) (456).

Ainsi, les molécules ICAM-1, CD86, CD40, CD40L et HLA-DR - un déterminant du CMH de classe II - jouent un rôle dans l'activation normale de cellules et nous avons voulu les étudier davantage dans le cadre de l'incorporation de protéines d'origine cellulaire par le VIH-1. Dans un premier temps, nos travaux ont porté sur l'ensemble de ces molécules, puis nous nous sommes concentrés plus particulièrement sur HLA-DR et la paire CD40/CD40L.

2.1 ICAM-1 et CD86

L'intégrine ICAM-1 (CD54) est une glycoprotéine présente à la surface de pratiquement tout type de cellules. Cette protéine peut d'ailleurs s'y localiser dans les radeaux lipidiques (457) (458). Elle est le ligand des molécules LFA-1 (459) et CD11b/CD18 (460). Pour sa part, la molécule de costimulation CD86, aussi nommée B7-2, est retrouvée en surface des lymphocytes B, des macrophages et des cellules dendritiques (461), ainsi que sur les lymphocytes T activés (462) (463). Elle constitue un ligand naturel des molécules CD28 et CTLA-4 (CD152) (464). ICAM-1 et CD86 jouent un rôle dans l'adhésion de cellules et comme nous l'avons montré précédemment, procurent des signaux de costimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T (465).

2.2 HLA-DR, CD40 et CD40L

2.2.1 HLA-DR, un isotype du CMH

2.2.1.1 Généralités sur le CMH

Des expériences de transplantation chez la souris (466) constituent les débuts de la recherche portant sur le CMH, dont les premiers antigènes ont été découverts ultérieurement par quelques groupes indépendants (467) (468) (469) (470).

Par la suite, il a été établi, comme nous venons de le voir, que pour déclencher une réponse adéquate contre un pathogène extracellulaire, le système immunitaire humain est tributaire de la présentation de peptides antigéniques microbiens, par des CPA, à des lymphocytes T CD4+ (471) (472) (473). De tels peptides sont présentés par des glycoprotéines de la surface cellulaire codée par les gènes du CMH de classe II présents sur le chromosome 6 chez l'humain. Les produits de ces gènes, soit les molécules HLA-DP, -DQ et -DR, sont dits polymorphiques, parce qu'il existe plusieurs allèles, donc plusieurs formes, de chaque gène. Aussi, des études ont permis de lier certaines allèles au développement de maladies : l'allèle DRB1 est par exemple associée à l'arthrite et l'allèle DQB1 au diabète (474).

2.2.1.2 La synthèse des molécules du CMH de classe II

La synthèse proprement dite des isotypes du CMH de classe II a lieu dans le RE (figure 13). Là, trois molécules s'associent avec des trimères d'une chaperone, nommée chaîne invariante (Ii), formant ainsi des nanomères (475) (476). La chaperone en question permet le bon repliement des molécules dans le RE (477) (478) (479), en plus d'empêcher un chargement prématuré de peptides dans ces molécules du CMH de classe II (475). Aussi, deux motifs à base de leucine - présents dans la queue cytoplasmique de Ii - sont responsables de l'adressage des dites molécules dans la voie endocytaire (480) (481), où elles enrichissent des compartiments spécifiques au chargement de peptides (MIIC) (482) (483) (484).

Jusqu'à ce jour, l'ensemble du trajet que les déterminants du CMH de classe II parcourent dans la cellule n'a malheureusement pas été clairement élucidé. Il est toutefois certain que la voie endocytaire constitue le lieu de transformation des antigènes préalablement

internalisés et de leur association aux molécules du CMH de classe II en assemblage (figure 13). Il semblerait, selon des observations toutes récentes, que les molécules encore associées à Ii, donc immatures, seraient menées à la surface cellulaire et y subiraient alors une internalisation dépendante de la clathrine et du complexe de protéine adaptatrices AP-2 (485) (486). Le clivage de Ii a lieu par la suite dans l'environnement protéolytique et acide des endosomes ou des lysosomes, où se produit la dénaturation et la dégradation des antigènes (487). De fait, l'action de cathepsines sur Ii laisse temporairement un peptide résiduel nommé CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*) dans la niche peptidique (488). Enfin, deux autres protéines codées par les gènes du CMH de classe II, HLA-DM et -DO jouent un rôle dans l'échange de CLIP pour le peptide antigénique (489) (490) (491). Une fois le peptide inséré dans la molécule de CMH de classe II, la molécule, alors mature, est transportée à la surface cellulaire où elle présente le peptide en question aux lymphocytes T auxiliaires (figure 13).

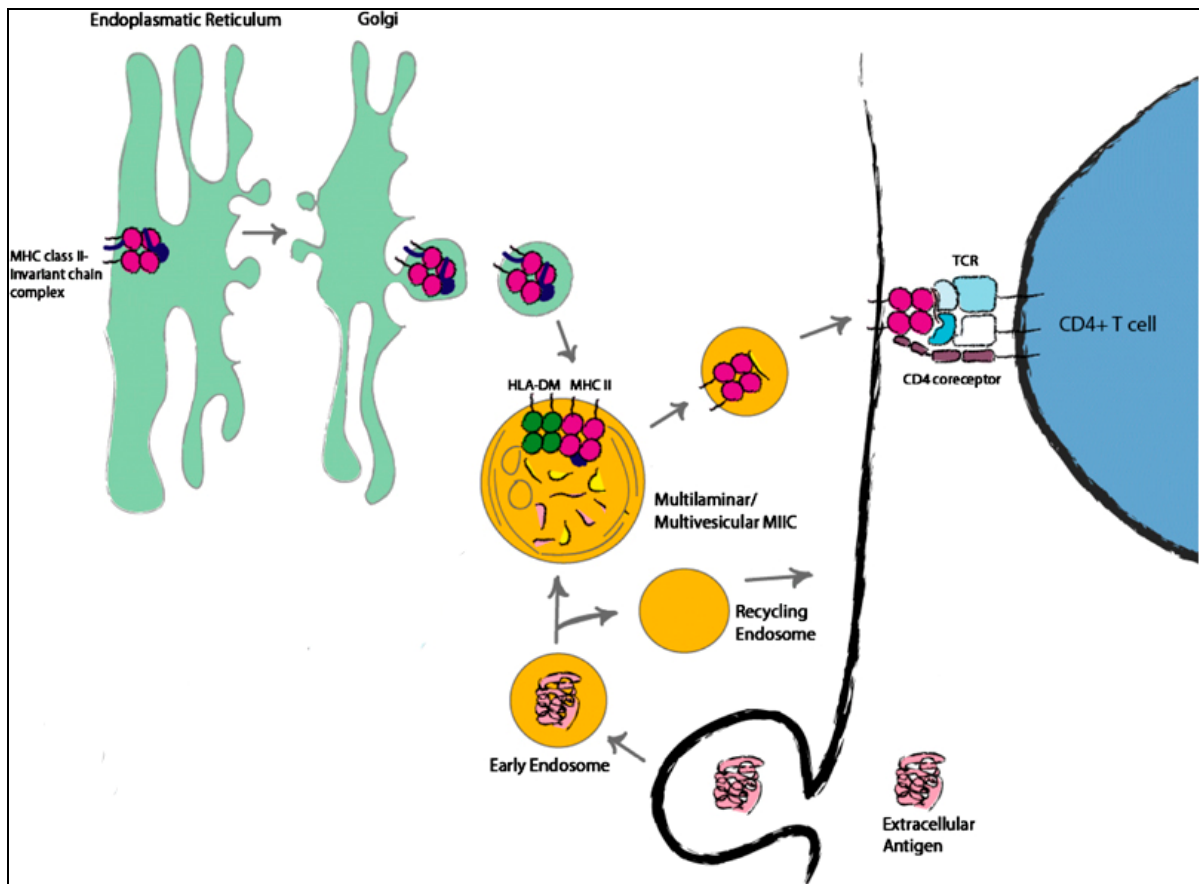


Figure 13. Transport des molécules du CMH de classe II du réticulum endoplasmique (*endoplasmic reticulum*) vers la surface cellulaire (492).

2.2.1.3 La molécule HLA-DR

La molécule HLA-DR est un hétérodimère transmembranaire constitué d'une chaîne alpha (lourde) de 34 kDa et d'une chaîne beta (légère) de 29 kDa. Ces chaînes, aux régions extracellulaires glycosylées, sont associées de façon non covalente et leurs portions transmembranaires sont prolongées par de courts domaines cytoplasmiques (figure 14). À l'intérieur de la cellule, les microfilaments d'actine F des lymphocytes B et des fibroblastes contrôlent le *capping* de HLA-DR (493), ce phénomène par lequel des antigènes multivalents se lient à plusieurs récepteurs adjacents. Fortement exprimée sur les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages, HLA-DR est aussi retrouvée à

la surface d'une fraction significative de lymphocytes T activés (révisé dans (494)). L'IFN- γ a d'ailleurs la capacité d'en provoquer l'expression chez des cellules endothéliales, par exemple (révisé dans (494)). Chez divers types de cellules présentatrice d'antigène, de 3 à 20 % des molécules HLA-DR se trouvent dans les radeaux lipidiques de manière constitutive (révisé dans (495)).

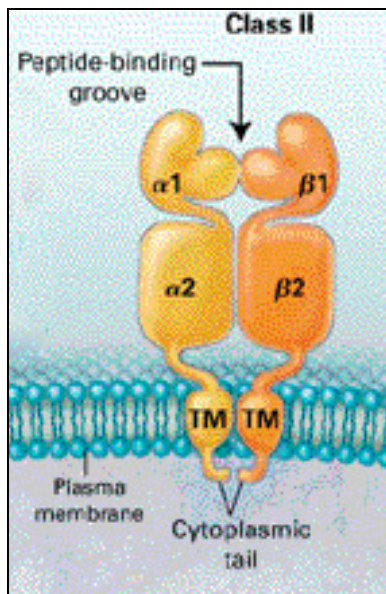


Figure 14. Structure des molécules du CMH de classe II. L'emplacement de la niche peptidique (*peptide-binding groove*) est indiqué d'une flèche (496).

2.2.2 La molécule CD40

2.2.2.1 Description

Le récepteur CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I de la superfamille des récepteurs du TNF et la figure 15 représente sa structure. Ses anciennes appellations sont p50, Bp50 et CDw40.

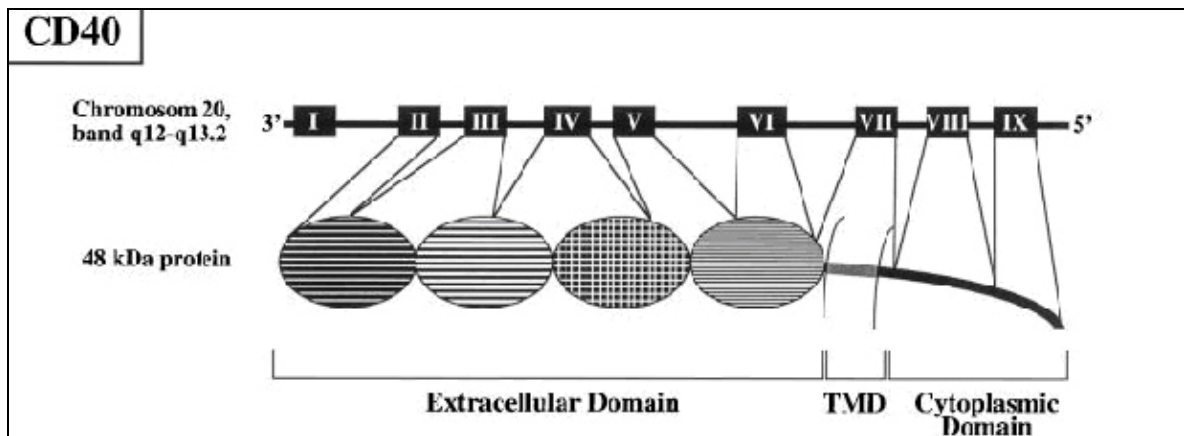


Figure 15. Organisation génomique et protéique de CD40 chez l'humain. Les rectangles noirs représentent les exons du gène (497).

2.2.2.2 Expression

Parmi les cellules exprimant le récepteur CD40, on retrouve les lymphocytes B (498) (499) (500), qui d'ailleurs l'expriment tôt et tout au long de leur développement (501). Aussi, les lymphocytes T activés (qu'ils soient CD4⁺ ou CD8⁺ (502) (503)). Également, les monocytes (504) (505), les macrophages/microglies (506), les cellules dendritiques (507) (505), ainsi que les plaquettes (508), les cellules épithéliales (509), les fibroblastes (510), les cellules endothéliales et les carcinomes (révisé dans (497)).

Le récepteur CD40 est souvent exprimé sous la forme d'un doublet constitué de protéines de 43 et 47 kDa (511) (512). Bien que la forme sous laquelle est exprimé ledit récepteur puisse dépendre du type cellulaire (513), il est certain que son expression est constitutive sur la plupart des types de cellules. CD40 est retrouvé dans les radeaux lipidiques (514) (515). De plus, des cytokines telles IFN- γ , IL-1, IL-3, IL-4, TNF- α et GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) peuvent augmenter son expression (révisé dans (497)), tandis que TGF- β (*transforming growth factor- β*) l'inhiberait par augmentation de la dégradation de l'ARNm de CD40 (516).

2.2.3 La molécule CD40L

2.2.3.1 Description

Glycoprotéine transmembranaire de type II de la superfamille du TNF, la molécule CD40L est, comme son nom l'indique, un ligand de la molécule CD40. Jusqu'à maintenant, deux autres récepteurs de CD40L sont connus, il s'agit de α IIb β 3 (517) et de α 5 β 1 (518). La molécule CD40L est aussi nommée CD154, gp39 et TRAP (*TNF-related activation protein*) et sa structure est représentée par la figure 16.

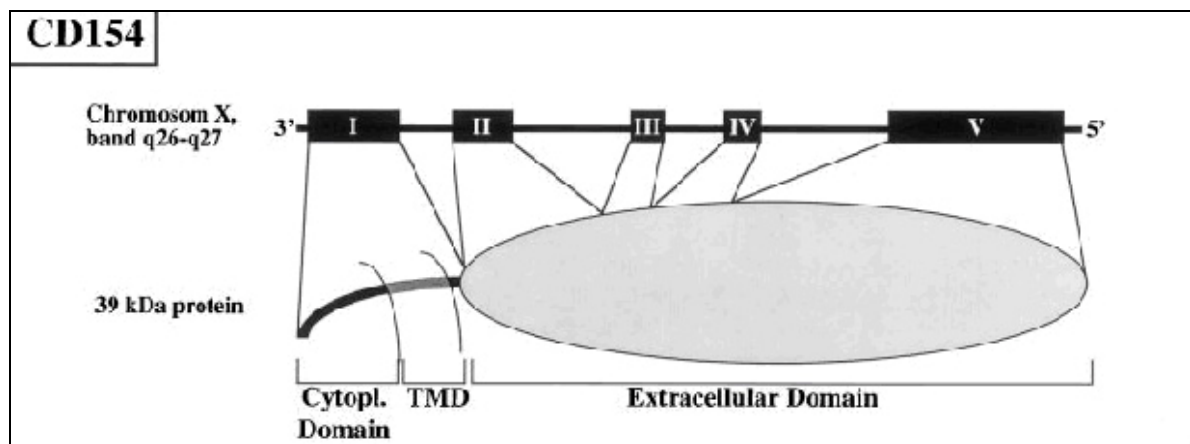


Figure 16. Organisation génomique et protéique de CD40L chez l'humain. Les rectangles noirs représentent les exons du gène (497).

2.2.3.2 Expression

La molécule CD40L est exprimée surtout sur les lymphocytes T CD4⁺ activés, mais également sur les lymphocytes T CD8⁺ activés (519) (520), les cellules NK (521), les lymphocytes B activés (522), les mastocytes et les basophiles (523), les éosinophiles (524), ainsi que sur les monocytes (525), les cellules de Langerhans (526) et les cellules dendritiques (527), sans oublier les plaquettes activées (528). Des analyses d'immunohistochimie ont situé des lymphocytes T exprimant CD40L au pourtour des

centres germinaux, dans les zones des lymphocytes T et dans le thymus (529) (390). La protéine a aussi été localisée dans les radeaux lipidiques (530).

En plus de la protéine de 39kDa exprimée en surface des cellules, on retrouve CD40L sous des formes solubles de 31, 18 et 14 kDa (531) (532) (533). Par ailleurs, à la surface de lymphocytes T, des complexes hétéromultimériques se formeraient entre la protéine de 39 kDa et ces formes solubles (534).

Bien que les mécanismes de régulation de l'expression de CD40L ne soient pas parfaitement compris (535), nous savons que chez les lymphocytes T CD4+, l'expression en surface de CD40L est induite par sollicitation du TCR (505) et ce, via une voie de signalisation faisant intervenir la calcineurine (536). Cette phosphatase dépend du calcium et permet la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-AT qui active la transcription du gène de CD40L (537) (538) (figure 17). Toutefois, les diverses populations de lymphocytes T CD4+ affichent des différences dans la mobilisation du calcium qui peuvent avoir un écho dans la régulation de leur expression de CD40L. En plus d'induire l'expression de CD40L en sollicitant le TCR des lymphocytes T, les CPA la limitent (539) (540). En effet, la liaison du récepteur CD40 à la molécule CD40L conduit à l'endocytose et à la dégradation de cette dernière (541), ce qui fait que l'expression de CD40L est de nature transitoire. Selon certaines sources, l'expression sur les lymphocytes T activés et d'autres types de cellules atteint son paroxysme six heures après activation et décline dans les 24 heures suivantes (542) (543). L'expression de CD40L peut cependant être stabilisée par la costimulation de la molécule CD28 qui induit l'ARNm et la protéine (544) (545) (546). Également, la synthèse de CD40L est induite par des cytokines proinflammatoires comme IL-1, TNF- α et IL-4 (révisé dans (497)), ainsi que IFN- α et IL-12, par augmentation de l'expression de l'ARNm de CD40L (547). Par contre, IFN- γ et TGF- β en inhibent l'expression dans les lymphocytes T (520) (542). Enfin, le fait que l'expression de CD40L en surface des lymphocytes T activés d'amygdale se produise aussi rapidement que cinq minutes après leur activation témoigne de l'existence de molécules de 30-35 kDa préformées dans cette population de cellules (390).

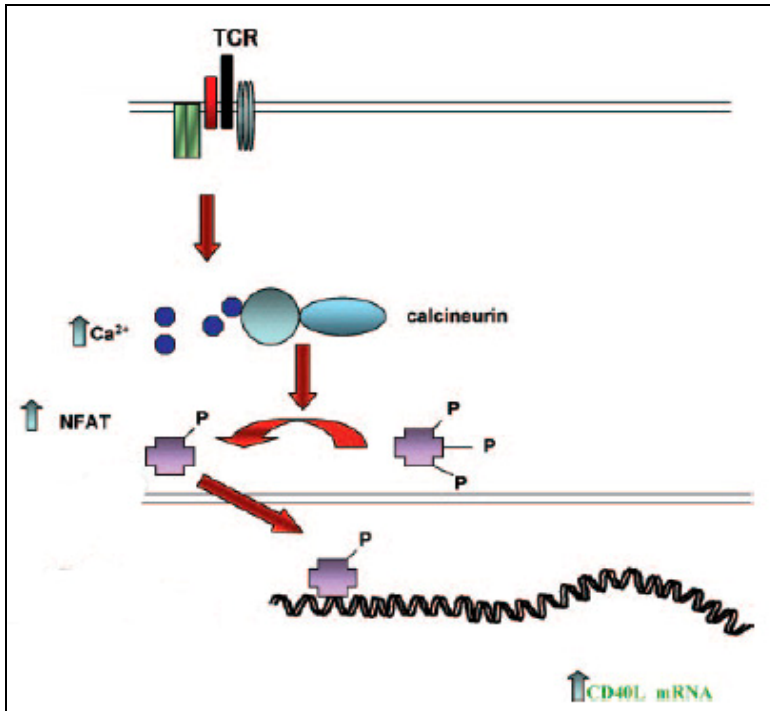


Figure 17. Événements de signalisation menant à l'activation de la transcription du gène CD40L (adapté de (548)).

Ajoutons que des mutations dans le gène de CD40L affectent son expression et causent ainsi le syndrome hyper-IgM lié à l'X (*X-linked hyper IgM syndrome*), une immunodéficience primaire caractérisée par l'absence de centres germinaux qui empêche donc la commutation de classe des immunoglobulines et l'hypermutation somatique (révisé dans (497)).

2.2.4 Fonctions biologiques de l'interaction de la molécule CD40L avec le récepteur CD40

La liaison de CD40L au récepteur CD40 est connue pour engendrer, dans diverses cellules, une panoplie d'événements dont les principaux apparaissent ci-dessous (Tableau 1). Cela dit, cette interaction n'est pas à l'abri de dérèglements. Une surexpression de CD40L est observée dans l'arthrite rhumatoïde (549), le lupus érythémateux disséminé (550), la

sclérose en plaques (551) et dans la maladie du greffon contre l'hôte (552), engendrant une production d'autoanticorps et de cytokines proinflammatoires (553). La signalisation via CD40 joue également un rôle dans le cancer, l'athérosclérose et des désordres neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer (révisé dans (497)).

Tableau 1. Fonctions biologiques de la liaison du récepteur CD40 (497).

	Function	Cell type	Mediator
Humoral immunity	activation	B lymphocytes	CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, MHCII; cytokines: IL-6, IL-10, TNB- α , TGF- β
	Ig class switching	B lymphocytes	IgA, IgD (?), IgE, IgG, IgM
	Formation of germinal center and memory cells	B lymphocytes	cytokines: IL-2, IL-10; cytokine receptors
Cellular immunity	pro-inflammatory cytokines	B lymphocytes eosinophils monocytes dendritic cells epithelial cells fibroblasts keratinocytes endothelial cells smooth muscle cells	IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β
	chemokines	monocytes epithelial cells fibroblasts keratinocytes endothelial cells	IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1 ABCD-1: CCR7 (diminished CCR1/5)
	adhesion molecules	B lymphocytes endothelial cells fibroblasts	LFA-1, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, VLA-4
	matrix metalloproteinases	monocytes fibroblasts endothelial cells smooth muscle cells	interstitial collagenase 1 and 3 (MMP-1, MMP-13), gelatinase A and B (MMP-2, MMP-9), stromelysin 1 (MMP-3) and 3 (MMP-11)
	procoagulant activities	monocytes endothelial cells smooth muscle cells	tissue factor
	others	monocytes dendritic cells fibroblasts endothelial cells	Cox-2, nitric oxide

Chapitre 3. Insertion des molécules HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L et CD86 dans l'enveloppe de souches cliniques du VIH-1 s'étant répliquées dans des cellules mononucléées du sang périphérique ou dans des cultures d'amygdales

3.1 Particularités de certaines méthodes utilisées dans l'étude

Pour la culture de morceaux d'amygdales (figure 18), nous avons utilisé le modèle de Glushakova et collaborateurs se prêtant bien à l'étude de l'infection par le VIH-1 puisqu'il présente l'avantage de conserver l'architecture tridimensionnelle complexe qui prévaut dans les organes lymphatiques humains sains (554). Les cellules mononucléées du sang périphérique ont quant à elles été activées avec de la phytohémagglutinine-L (PHA-L) et de l'IL-2.

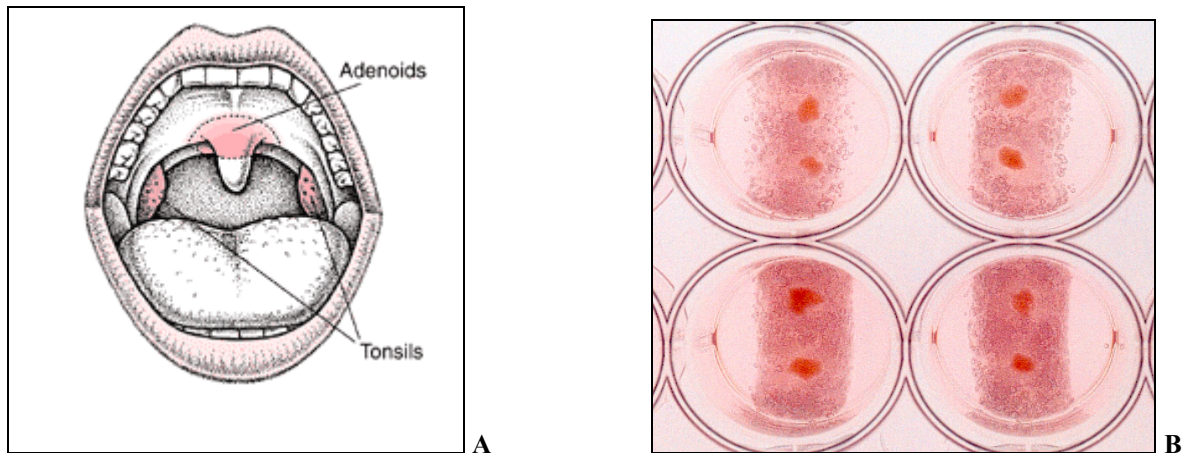


Figure 18. Amygdales humaines. (A) Situation anatomique des amygdales (*tonsils*) (555). (B) Photographie du modèle de culture *ex vivo* de portions d'amygdales par S. Bounou, Université Laval.

Plus tard, nous avons appliqué aux virions de la progéniture la technique d'ultrafiltration dans les tubes à filtre Centricon® Plus-20 Biomax-100 que nous avons adaptée à la concentration du VIH-1 (figure 19). Nous avons fait suivre cette étape par l'immunocapture de particules virales à l'aide d'une méthode que nous avons établie dans le passé (266) (figure 19). Dans l'étude en question, nous avons toutefois adapté ladite technique au traitement d'un plus grand nombre d'échantillons et ce, en mettant au point des étapes de lavage en plaque de 96 puits.

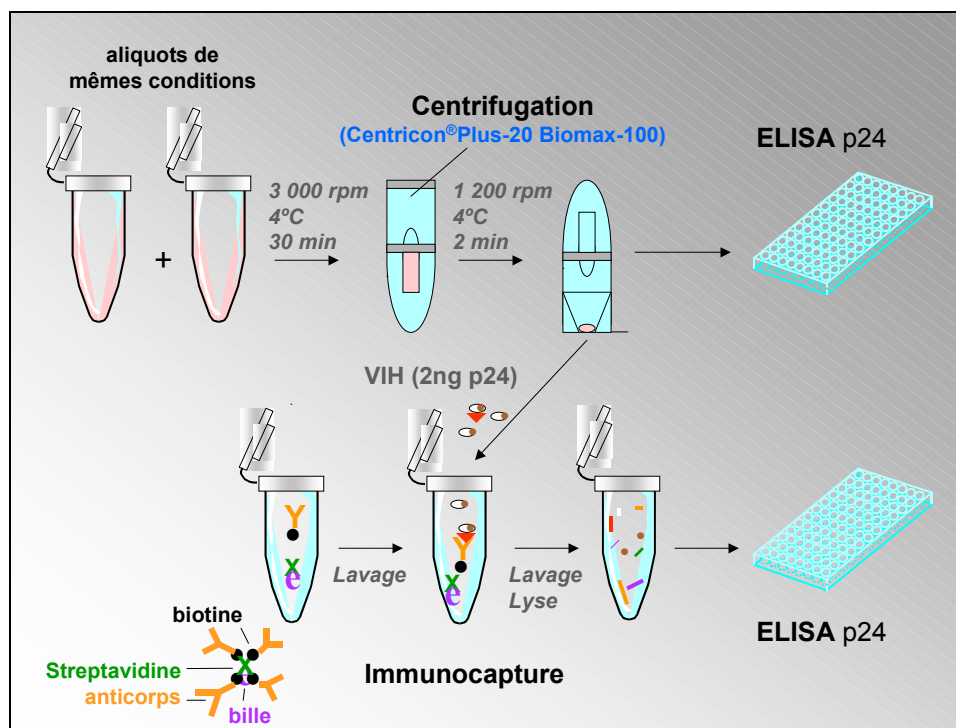


Figure 19. Schéma du protocole d'ultrafiltration par centrifugation et d'immunocapture par G. Martin, Université Laval.

3.2 L'étude

L'étude dont il est mention dans ce chapitre a été publiée dans la revue *Clinical Immunology* (2004) 111 (3) 275-285 et la version finale de cette publication fait l'objet de la section 3.2.2.

3.2.1 Résumé de l'article

Dans le but de fournir de plus amples informations quant à l'acquisition de protéines membranaires de la cellule hôte par le VIH-1 produit dans des réservoirs cellulaires des plus physiologiques, deux isolats cliniques différents ont été utilisés pour infecter des cultures de cellules mononucléées du sang périphérique et des histocultures d'un organe lymphatique humain. L'insertion de HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L et CD86 provenant de l'hôte dans les particules de VIH-1 a été évaluée en utilisant des anticorps spécifiques liés à une matrice solide pour capturer la progéniture virale ultrafiltrée. De façon générale, nos données indiquent que ni le tropisme du VIH-1 (qu'il soit dirigé vers les lymphocytes T ou bien vers les macrophages), ni la source cellulaire du VIH-1 n'a un impact sur le processus d'incorporation, mais que ce dernier est en revanche sous l'influence du donneur de cellules. Étant donné que la majorité de la réplication virale semble se dérouler dans les organes lymphatiques et qu'il a été montré précédemment que plusieurs protéines de l'hôte ancrées dans le virus affectent le cycle de réplication du VIH-1, nos résultats suggèrent que ce phénomène contribue à la pathogenèse de cette infection rétrovirale.

3.2.2 Article

HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L and CD86 are incorporated to a similar degree into clinical human immunodeficiency virus type 1 variants expanded in natural reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured *ex vivo*

Geneviève Martin and Michel J. Tremblay*

*Research Center in Infectious Diseases, CHUL Research Center,
and Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada*

*Corresponding author. Mailing address:

Laboratory of Human Immuno-Retrovirology

Research Center in Infectious Diseases, RC709

CHUL Research Center

2705 Laurier Blvd.

Quebec (QC), Canada, G1V 4G2

Phone: (418) 654-2705. Fax: (418) 654-2212

Electronic address: michel.j.tremblay@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

To provide additional information on the acquisition of host cell membrane proteins by HIV-1 produced by natural cellular reservoirs, two different field isolates were used to infect *ex vivo* expanded PBMCs and human lymphoid tissue histocultures. The insertion of host-derived HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L and CD86 within HIV-1 particles was evaluated by using specific antibodies linked to a solid matrix to capture ultrafiltrated viral progeny. Overall, our data indicate that neither the HIV-1 co-receptor usage (i.e., T-tropic or macrophage-tropic) nor the cellular source of HIV-1 has an impact on the incorporation process but it was found to be under the influence of the donor source. Given that most viral replication is thought to occur in lymphoid tissues and previous works have shown that HIV-1 life cycle is affected by several virus-anchored host proteins, our results suggest that this phenomenon is likely to contribute to the pathogenesis of this retroviral infection.

Keywords: HIV-1; PBMCs; Lymphoid tissue; HLA-DR; ICAM-1; CD40; CD40L; CD86

INTRODUCTION

Intensive efforts have been deployed in the past few years to understand how human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) egresses from host cells. In the light of such work, some conclusions have been formulated. It is thus believed that HIV-1 particles budding from T lymphocytes tend to make up their lipid envelope from the cell membrane, embedding the viral envelope protein complex (Env) into it [1]. On the other hand, in macrophages the budding process is characterized by a grouping of infectious virus particles in some specialized intracellular compartments (i.e., late endosomes) [2]. Although the precise mechanistic aspects of HIV-1 budding remain unresolved, there is clear evidence that this human retrovirus incorporates surface constituents of cellular origin. Among the various cellular proteins acquired by HIV-1, class I and II determinants of the major histocompatibility complex (MHC) [3-8], adhesion molecules [6,9-13] and proteins with co-stimulatory effects [14-17] or enzymatic properties [18,19] have all been found to be inserted within mature HIV-1 particles. Of great interest is the fact that a number of embedded molecules have been reported to be biologically active on the surface of the virus, suggesting they could have major effects in HIV-1 pathogenesis [reviewed in 20].

HLA-DR, for example, is a glycoprotein expressed on B lymphocytes, dendritic cells, monocytes, macrophages and activated T cells [21-23]. When incorporated in HIV-1, this MHC-class II determinant increases the process of virus attachment to target cells and enhances HIV-1 infectivity [6-8]. Virus-associated HLA-DR has also been shown to engage the T-cell receptor (TCR), leading to apoptosis [5]. Another cellular protein found on the surface of HIV-1 is the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Its inducible expression occurs on lymphocytes, monocytes/macrophages, granulocytes, and certain epithelial cells [24]. This molecule has been reported to be involved in HIV-1-mediated syncytium formation [9] and, when present on HIV-1, has similar up-regulatory effects as HLA-DR on viral adhesion and infectivity [6,12,25,26]. Moreover, this virion-associated protein renders HIV-1 more refractory to neutralization by monoclonal antibodies directed against Env proteins [27,28]. In human lymphoid tissue cultured *ex vivo*, insertion of host-

derived ICAM-1 in X4-tropic strains of HIV-1 results in a more rapid and extensive depletion of CD4⁺ T cells [26].

Our research group has recently reported the presence of foreign CD86 on HIV-1 particles and the activation of HIV-1 promoter region in human T cells upon interaction with such CD86-bearing viruses and engagement of the TCR [16]. This costimulatory molecule is mainly expressed on antigen-presenting cells, such as activated B cells, macrophages and dendritic cells [29] and on activated T cells [30,31]. CD28 represents another cell surface constituent with costimulatory properties that has been shown to be acquired by HIV-1 [17]. Of interest to note that CD28 is constitutively expressed on a cellular subpopulation considered as the major reservoir of HIV-1, i.e., CD4⁺ T lymphocytes. CD40 and its natural cognate ligand, CD40L (CD154), are two other costimulatory molecules playing crucial roles in the normal immune response [32-35]. CD40 has been found embedded in HIV-1 [14]. This receptor of the tumor necrosis factor superfamily is expressed on B lymphocytes and dendritic cells [36], as well as on monocytes and macrophages [37]. It can also be found, to a lesser extent, on activated T cells [38-41]. CD40L is a homotrimeric type II membrane protein predominantly expressed on activated CD4⁺ T cells [42,43].

The vast majority of experimental data dealing with the process of incorporation of host-encoded proteins in HIV-1 has been obtained with established human cell lines that were inoculated with laboratory strains of HIV-1. Indeed, very few studies have scrutinized the presence of proteins of host origin in clinical variants of HIV-1 expanded in more natural targets such as suspensions of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [11,15,17,26,44]. Previous works have convincingly illustrated that key pathogenesis events and most viral replication occur in lymphoid tissue [45-50]. Primary cultures of suspended PBMCs alone can neither mimic the rich cellular repertoire within lymphoid tissue nor reproduce the complex interactions between cells and the stroma. Thus, to more closely parallel conditions prevailing under *in vivo* situations, we studied the possible insertion of some specific cell surface molecules (i.e., HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L and CD86) in two field isolates of HIV-1 bearing distinct co-receptor usages (i.e., X4-tropic and R5-tropic). Such clinical variants of HIV-1 were expanded in PBMCs and

human tonsillar tissues cultured *ex vivo*. It should be noted that virus stocks used in the present work were concentrated and purified by an ultrafiltration technique, a step that permits to eliminate the free p24 material.

MATERIALS AND METHODS

Cells

PBMCs were isolated by Ficoll-Hypaque gradient from venous blood samples, seeded in 75 cm² flasks at 1×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 20% fetal calf serum (FCS), glutamine (2 mM), penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml), stimulated for 2 days with phytohemagglutinin-L (1 µg/ml; Sigma Chemical Corporation) and recombinant human IL-2 (30 U/ml), and left to incubate at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Human tonsil histocultures were prepared as described previously [51]. Briefly, human tonsil tissue removed during a routine tonsillectomy was received within 2 h of excision. The tonsils were washed thoroughly with medium containing antibiotics and then sectioned into 2-3 mm² blocks. These tissue blocks were placed on top of collagen sponge gels in the culture medium at the air-liquid interface and infected the next day with clinical isolates of HIV-1. Human embryonic kidney 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin.

Virus production

The HIV-1 B clade clinical isolates 92HT599 (X4-tropic) and 92US657 (R5-tropic) used for this study were obtained through the NIH AIDS Repository Reagent Program (Rockville, MD). PBMCs (5×10^6) were incubated with each viral strain for 2 h at 37°C in a final volume of 1 ml. Next, cells were washed once with complete RPMI, resuspended at 1×10^6 cells/ml in the presence of 30 U/ml of recombinant human IL-2, and incubated at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. Cells were resuspended this way after each harvest, which took place on days 7, 10 and 13 post-infection. Harvested culture portions were centrifuged, and virus-containing supernatants were frozen at -85°C. Tonsillar blocks in culture were infected with 1-2 ng of p24 of HIV-1 (same virus preparation as used to infect PBMCs) added to the top of each tissue block (5 µl of virus) and left at 37°C under a 5%

CO₂ atmosphere. Culture supernatants were harvested and frozen at -85°C on days 7, 10 or 13 post-infection. Fresh medium was added to tonsil cultures on day 7 and 10 after infection. To eliminate free p24, each unfrozen virus preparation was ultrafiltrated in Centricon[®] Plus-20 Biomax-100 filter devices (Millipore Corporation) at 4000xg, 4°C, until all the supernatant has been filtered. Then virus preparations located on the membrane were recovered by an additional centrifugation at 1000xg, 4°C, for 1 min. Isogenic virus preparations, bearing CD40L or not, were produced by calcium phosphate transfection of 293T cells as previously described [12,13,25]. In brief, 293T cells were transfected with pNL4-3 alone (virus stock called NL4-3/null) or were cotransfected with pcDNA3.1-CD40L (virus stock called NL4-3/CD40L). Sixteen hours after transfection, cells were washed with 3 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and were incubated for an additional 24 h with 3 ml of DMEM supplemented with 10% FCS. Virion-containing supernatants were filtered through a 0.45-µm cellulose acetate membrane (Millipore Corporation), aliquoted and frozen at -85°C. A p24 antibody capture assay developed in our laboratory was used to estimate the amount of p24 in all virus stocks [26].

Antibodies

The hybridoma cell line 2.06 (IgG2a) secretes a monoclonal antibody directed against a monomorphic epitope of the HLA-DR determinant of MHC-II (American Type Culture Collection) [52]. Anti-ICAM-1 hybridoma R6.5 (IgG2a) was provided by S. Benedict (University of Kansas) [53]. Anti-CD40 hybridoma G28.5 (IgG1) and anti-CD40L hybridoma 5c8 (IgG2a) were generously provided by W. Mourad (CHUL Research Center), and anti-CD86 hybridoma BU-63 (IgG1) was kindly supplied by D.L. Hardie (University of Birmingham) [54]. Antibodies from these hybridomas were purified with a HiTrap Protein G affinity column (Amersham Biosciences AB) following the manufacturer's instructions. For the purposes of the virus capture assay, biotinylation of the antibodies was performed using EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce).

Flow cytometric analysis

Flow cytometric analysis was performed on infected PBMCs with 5×10^5 cells co-incubated with 500 μ l of PBS containing a saturating amount of each monoclonal antibody at 4°C for 30 min. The cells were washed with cold PBS, and then labeled with 100 μ l of a saturating amount of R-phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse (Caltag Laboratories) at 4°C for 30 min. Finally, cells were washed, fixed with 2% paraformaldehyde and analyzed on a cytofluorometer (EPICS Elite ESP, Coulter Electronics). In order to apply this technique to infected tonsil tissues, we first mechanically disrupted 6 tonsillar blocks with the Pellet Pestle[®] Motor (Kontes Glass Company). The resulting liquid phase was mixed with a saturating amount of monoclonal antibodies. The next steps were the same as for PBMCs.

Virus capture assay

We have developed a modified version of our previously described virus precipitation assay based on the capture of HIV-1 particles using immunomagnetic beads [44]. In brief, commercially available streptavidin-coated magnetic beads (8.4×10^6 beads) (DynaL Biotech Inc.) were mixed with 2 μ g of biotinylated monoclonal antibodies in a final volume of 1 ml PBS plus 10% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature on a rocking plate. Immunomagnetic beads were next washed three times in PBS plus 10% BSA with the use of a magnet support (DynaL Biotech Inc.), and resuspended in 50 μ l PBS plus 10% BSA. HIV-1 (2 ng of p24 for each clinical isolate and 1 ng of p24 for the laboratory strain NL4-3) was added to the antibodies/beads mixture (50 μ l) and the mixture incubated at 4°C overnight on a rocking plate. Immunomagnetic beads were thereafter washed four times in 200 μ l PBS plus 10% BSA and finally resuspended in 200 μ l of PBS plus 10% BSA. Viruses captured on magnetic beads were disrupted by adding 50 μ l of lysis buffer (1 M PBS, pH 7.4, containing 2.5% Triton-X-100) and incubated 30 min at room temperature. Magnetic beads were pelleted with a magnetic plate (DynaL Biotech Inc.) and 125 μ l of the cleared supernatants were loaded on an ELISA plate for p24 measurements.

RESULTS

Results from previous studies have revealed that HLA-DR is probably the most abundant host cell surface constituent found embedded within mature HIV-1 particles. Consequently, our initial series of investigations was focused on this molecule. We investigated also the possible acquisition of host-encoded ICAM-1, CD40, CD40L and CD86 because of their relative importance in the immune system and presence on cells known to harbor HIV-1. Our experimental approach to monitor host proteins on the surface of the virions takes advantage of a solid support (i.e., magnetic beads) labeled with antibodies specific for the cellular protein of interest in combination with a p24 antigen capture assay to specifically quantify captured viruses.

All the molecules tested were found to be acquired by the two clinical HIV-1 isolates (i.e., 92HT599/X4-tropic and 92US657/R5-tropic) but data from the semi-quantitative virus capture assay suggest that the studied proteins seem to be incorporated at different levels (Fig. 1). For instance, HLA-DR seems to be the most efficiently incorporated within mature HIV-1 particles, followed in order by ICAM-1, CD40 and CD86 as monitored by measuring capture efficiencies (Fig. 1, compare panel A with panels B, C and D). The sensitivity of the present virus precipitation test is clearly illustrated by the observation that as much as 94% of the initial input for 92HT599, which was harvested from PBMCs (donor P1) at 10 days post-infection, was captured by the anti-HLA-DR-labeled magnetic beads (Fig. 1A, i.e., 7,512 pg/ml of p24 in a total volume of 250 μ l=1,878 pg of p24 from an initial virus input of 2,000 pg of p24). The maximal virus recovery rates with magnetic beads coated with ICAM-1, CD40 and CD86 were 42% (Fig. 1B, i.e., 92HT599 recovered from PBMCs of donor P1 at 7 days post-infection), 20% (Fig. 1C, i.e., 92HT599 recovered from PBMCs of donor P1 at 7 days post-infection), and 12% (Fig. 1D, i.e., 92HT599 recovered from lymphoid tissue of donor T1 at 10 days post-infection), respectively. Progeny viruses were inefficiently captured by magnetic beads coated with the anti-CD40L antibody (Fig. 1E), therefore suggesting that CD40L is inefficiently acquired by the two HIV-1 field isolates produced by PBMCs or human lymphoid tissue cultured *ex vivo*. As an example, the highest virus recovery rate that was obtained when using the anti-

CD40L antibody on a solid support was 1.1% (Fig. 1E, i.e., 92US657 recovered from PBMCs of donor P2 at 10 days post-infection).

Results from the present study indicate that the efficiency of incorporation of HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD86 and CD40L is not affected by the virus co-receptor usage. Indeed, the degree of incorporation of the studied host-derived proteins was not significantly different between the clinical X4- and R5-tropic viral strains. In most instances, the capture efficiency was weakly influenced by the number of days following the initial HIV-1 infection after which virus stocks were collected. In addition, the source of progeny HIV-1 virions seems to have little influence on the incorporation process since a general trend or correlation cannot be seen when analyzing virus stocks harvested from PBMCs and human tonsil tissue. However, the donor source significantly modulated the capture efficiencies of the tested virus preparations when using magnetic beads bearing anti-HLA-DR, -ICAM-1, -CD40, -CD86 and -CD40L antibodies.

Flow cytometry analyses were also performed on PBMCs and cells disrupted from tonsillar tissues at the time when virus stocks were harvested (i.e., 7, 10 and 13 days post-infection). A high percentage of cells (i.e., greater than 50%) in both PBMCs and human lymphoid tissue express HLA-DR and the intensity remains constant throughout the course of the experiments (Fig. 2). Similar observations were made when ICAM-1 was instead monitored except that the surface expression levels were slightly lower than HLA-DR (data not shown). On the opposite, the amounts of CD40, CD86 and CD40L that were expressed on PBMCs (8.9%, 22.3% and 4.0%, respectively) and dispersed cells from tonsil histocultures (21.4%, 11.1% and 4.6%, respectively) were significantly lower than both HLA-DR and ICAM-1 (data not shown).

To demonstrate that the low capture efficiency of the two studied clinical strains of HIV-1 that were amplified in PBMCs and human lymphoid tissue with beads tagged with the anti-CD40L antibody is not related with technical difficulties inherent to the virus precipitation test, the prototypic X4-tropic laboratory strain of HIV-1 NL4-3 was produced in 293T cells. These cells were genetically manipulated to express CD40L on their surface. HIV-1 particles that were produced from such CD40L-expressing 293T cells were found to be efficiently captured by magnetic beads coated with anti-CD40L antibodies (Fig. 3).

Indeed, as much as 26% of the total virus input from CD40L-positive cells were precipitated (i.e., 1,035 pg/ml of p24 in 250 μ l total volume=259 pg of p24 from an initial virus input of 1,000 pg of p24). No detectable virus-associated p24 could be measured when isogenic NL4-3 particles from the parental 293T cells (CD40L-negative) were used instead.

DISCUSSION

In this paper, we have addressed several questions related to the phenomenon of incorporation of some specific host components into HIV-1. The experimental design of our study allowed us to examine whether HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L and CD86 are inserted within newly formed HIV-1 particles produced in primary human cellular reservoirs. We were also interested in defining if the biological phenotype of HIV-1 (i.e., tropism) can influence the phenomenon of acquisition of host-encoded proteins and whether the degree of incorporation is a process that is affected by the virus producer cell system. These goals were reached by using two clinical isolates of HIV-1 that carry distinctive co-receptor usages (i.e., 92HT599/X4-tropic and 92US657/R5-tropic) which were used to inoculate suspensions of PBMCs and histocultures of human lymphoid tissue. Human lymphoid tissue cultured *ex vivo* were used to produce progeny viruses because a number of studies have shown that lymphoid tissues play a crucial role in HIV-1 pathogenesis since these tissues become the reservoir where virus is produced and persist throughout the long course of infection [46-49,55-59]. We have used histocultures of human tonsils that have been reported to preserve the general cytoarchitecture of lymphoid tissue, including a network of follicular dendritic cells [51]. This last observation is of high importance considering that dendritic cells play a crucial role in the pathogenesis of HIV-1 infection as they do not only handle the crucial antigens but also interact with infectious virions.

Before monitoring the presence of the studied host cell surface components onto the exterior of viral entities, preparations of the two field isolates of HIV-1 that were amplified in PBMCs and tonsillar tissues were concentrated and purified using Centricon[®]Plus-20 Biomax-100 filter devices. This experimental approach serves to eliminate free p24, a confounding factor that complicates measurements of captured viruses since it causes an underestimation of virus-associated p24 in the initial virus input. This additional step to prepare virus stocks is also important keeping in mind the known interactions of cell

surface adhesion molecules such as ICAM-1 with cytoskeletal components [60,61] and the observation that HIV-1 Gag can associate with actin [62,63].

Our findings demonstrate that HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L and CD86 are all acquired by 92HT599 and 92US657 following production in PBMCs and tonsillar tissue. The cellular source of progeny virus (i.e., PBMCs or lymphoid tissue) as well as the biological phenotype of the virion (i.e., X4 or R5) were found to have little influence on the capture efficiency of the studied virus stocks. A study has shown that comparable amounts of MHC-II were detected in T-tropic and M-tropic strains of HIV-1 that were expanded in PBMCs [18], which provide credence to our data. Interestingly, the donor source has a marked influence on the capture efficiencies of the tested virus preparations. This observation is perfectly in agreement with a previous published report that was focused on studying the insertion of HLA-DR in clinical variants of HIV-1 produced in PBMCs and monocyte-derived macrophages [44]. There are several possible explanations that could account for the variations between donors. It can be proposed that the incorporation process of host cell surface components such as HLA-DR within HIV-1 may be affected by the recognized high polymorphic nature of HLA-DR. Moreover, it is also possible that the nature of the virus producer cell influences the acquisition phenomenon based on the idea that HIV-1 buds from different compartments. For example, HIV-1 egresses from the surface of CD4⁺ T lymphocytes while recent evidence suggests that HIV-1 assembles on late endocytic membranes in primary human macrophages and acquires antigens characteristic of this intracellular compartment [2]. Thus, insertion of host-derived proteins within mature HIV-1 particles is a complex process that is under the control of several still undefined factors.

Viruses were very efficiently captured by magnetic beads coated with anti-HLA-DR and anti-ICAM-1 antibodies whereas HIV-1 particles were poorly precipitated by anti-CD40L antibodies loaded on a solid matrix. This may be explained in part by the sustained expression of HLA-DR and ICAM-1 molecules and by the temporary expression of CD40L on the cell surface (see below for more details). It should also be noted that a correlation was seen between capture efficiency of virus preparations and the surface expression level since both HLA-DR and ICAM-1 were highly expressed on virus producer cells (i.e.,

PBMCs and cells disrupted from tonsillar tissues) while CD40L was expressed at the lowest level. Our findings are in line with a study that has reported that high amounts of HIV-1 can be precipitated with antibodies against MHC-II and ICAM-1 [64]. Expression of HLA-DR is known to be increased upon activation of T lymphocytes [21] and macrophages do constitutively express high amounts of this cell surface component [65]. Of direct relevance to the present work is the up-regulated expression of MHC-II in HIV-1-infected individuals as the disease progresses [66] and the noticed enhancement of MHC-II expression upon HIV-1 infection of various cell lines, macrophages and PBMCs [15]. With regard to ICAM-1, this adhesion molecule is increased upon productive infection of primary human T cells with a X4-tropic strain of HIV-1 [67]. Furthermore, ICAM-1 was found to be enhanced on CD4⁺ alveolar lymphocytes in HIV-1-infected patients [68]. CD40 has been reported to be acquired by the R5-tropic laboratory isolate BaL [14] and high amounts of CD86 were observed in clinical and laboratory variants of HIV-1 produced in PBMCs [15]. An increased expression of CD86 has been noticed on spleen dendritic cells from seropositive patients [69] and activated T cells upon HIV-1 infection and from HIV-1-infected individuals [31,66]. We thus confirm that CD40 and CD86 are indeed embedded within HIV-1 but we present the first evidence that both molecules are also found on progeny virus originating from human lymphoid tissue. Another novel information is the presence of CD40L within mature HIV-1 coming from PBMCs and tonsillar tissue. Even though very low levels of viruses are captured by magnetic beads labeled with the anti-CD40L antibody, experiments carried out with isogenic viruses produced in cells expressing high amounts of cell surface CD40L (i.e., 293T cells) provide strong evidence that HIV-1 does acquire this molecule. The weak incorporation of CD40L in HIV-1 might be reminiscent of the very transient nature of CD40L on the cell surface [70]. The kinetics of CD40L expression in the context of HIV-1 infection has resulted in contradictory results and additional studies are required to solve this issue [71-78].

Although the precise molecular process involved in the selective incorporation of host-encoded plasma membrane proteins within HIV-1 is still obscure, recent reports have provided some intriguing possible molecular mechanisms. It has been shown that HIV-1 Gag proteins are preferentially located in some specialized areas on the plasma membrane surface which are called lipid rafts [79,80]. These domains are known to be rich in

cholesterol, sphingolipids and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. Therefore, host proteins located in such plasma membrane rafts would be preferentially incorporated in budding HIV-1 particles. This postulate is supported by the localization of MHC-II, ICAM-1 and CD40 in lipid rafts [81-83]. Experiments aimed at defining if proteins that are concentrated in these microdomains are the only cell surface components acquired by HIV-1 would be highly informative considering that antigen presentation can be achieved under some circumstances by cells lacking constitutive expression of MHC-II molecules in lipid rafts, thus suggesting that MHC-II can be found sometimes in areas distinct from lipid rafts [84,85].

In summary, clinical isolates of HIV-1 bearing distinct co-receptor usages incorporate HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L and CD86 when expanded in physiologic cell systems such as PBMCs and human lymphoid tissue cultured *ex vivo*. The latter findings may reveal significance for the pathogenesis of HIV-1 infection since lymphoid tissues are considered as major reservoirs of this retrovirus throughout the course of infection and several virion-anchored host proteins have been demonstrated to exert a functional role in HIV-1 biology.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Maurice Dufour for flow cytometry analyses and Ms. Sylvie Méthot for editorial assistance. We acknowledge Drs. Caroline Gilbert and Réjean Cantin for stimulating discussions. This study was made possible through an operating grant to M.J.T. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Research Program (grant #HOP-14438). This study was performed by G.M. in partial fulfillment of a Ph.D. degree from the Microbiology-Immunology Program, Faculty of Medicine, Laval University. G.M. holds a CIHR Doctoral Award and M.J.T. is the recipient of a Senior Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology.

REFERENCES

- [1] D.E. Ott, Potential roles of cellular proteins in HIV-1, *Rev Med Virol* 12 (2002) 359-374.
- [2] A. Pelchen-Matthews, B. Kramer, M. Marsh, Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages, *J Cell Biol* 162 (2003) 443-455.
- [3] J.A. Hoxie, T.P. Fitzharris, P.R. Youngbar, D.M. Matthews, J.L. Rackowski, S.F. Radka, Nonrandom association of cellular antigens with HTLV-III virions, *Hum Immunol* 18 (1987) 39-52.
- [4] L.O. Arthur, J.W. Bess, Jr., R.C. Sowder, 2nd, R.E. Benveniste, D.L. Mann, J.C. Chermann, L.E. Henderson, Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines, *Science* 258 (1992) 1935-1938.
- [5] J.L. Rossio, J. Bess, Jr., L.E. Henderson, P. Cresswell, L.O. Arthur, HLA class II on HIV particles is functional in superantigen presentation to human T cells: implications for HIV pathogenesis, *AIDS Res Hum Retroviruses* 11 (1995) 1433-1439.
- [6] C. Castilletti, M.R. Capobianchi, S. Fais, et al., HIV type 1 grown on interferon gamma-treated U937 cells shows selective increase in virion-associated intercellular adhesion molecule 1 and HLA-DR and enhanced infectivity for CD4-negative cells, *AIDS Res Hum Retroviruses* 11 (1995) 547-553.
- [7] R. Cantin, J.F. Fortin, G. Lamontagne, M. Tremblay, The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells, *Blood* 90 (1997) 1091-1100.
- [8] R. Cantin, J.F. Fortin, G. Lamontagne, M. Tremblay, The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity, *J Virol* 71 (1997) 1922-1930.

- [9] J.E. Hildreth, R.J. Orentas, Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation, *Science* 244 (1989) 1075-1078.
- [10] R.J. Orentas, J.E. Hildreth, Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV, *AIDS Res Hum Retroviruses* 9 (1993) 1157-1165.
- [11] M.R. Capobianchi, S. Fais, C. Castilletti, M. Gentile, F. Ameglio, F. Dianzani, A simple and reliable method to detect cell membrane proteins on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles, *J Infect Dis* 169 (1994) 886-889.
- [12] J.F. Fortin, R. Cantin, G. Lamontagne, M. Tremblay, Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity, *J Virol* 71 (1997) 3588-3596.
- [13] J.F. Fortin, R. Cantin, M.J. Tremblay, T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1, *J Virol* 72 (1998) 2105-2112.
- [14] I. Frank, L. Kacani, H. Stoiber, H. Stossel, M. Spruth, F. Steindl, N. Romani, M.P. Dierich, Human immunodeficiency virus type 1 derived from cocultures of immature dendritic cells with autologous T cells carries T-cell-specific molecules on its surface and is highly infectious, *J Virol* 73 (1999) 3449-3454.
- [15] M.T. Esser, D.R. Graham, L.V. Coren, C.M. Trubey, J.W. Bess, Jr., L.O. Arthur, D.E. Ott, J.D. Lifson, Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation, *J Virol* 75 (2001) 6173-6182.
- [16] S. Bounou, N. Dumais, M.J. Tremblay, Attachment of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) particles bearing host-encoded B7-2 proteins leads to nuclear factor-kappa B- and nuclear factor of activated T cells-dependent activation of HIV-1 long terminal repeat transcription, *J Biol Chem* 276 (2001) 6359-6369.

- [17] J.F. Giguere, J.S. Paquette, S. Bounou, R. Cantin, M.J. Tremblay, New insights into the functionality of a virion-anchored host cell membrane protein: CD28 versus HIV type 1, *J Immunol* 169 (2002) 2762-2771.
- [18] B.D. Roberts, S.T. Butera, Host protein incorporation is conserved among diverse HIV-1 subtypes, *Aids* 13 (1999) 425-427.
- [19] S.D. Lawn, B.D. Roberts, G.E. Griffin, T.M. Folks, S.T. Butera, Cellular compartments of human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo: determination by presence of virion-associated host proteins and impact of opportunistic infection, *J Virol* 74 (2000) 139-145.
- [20] M.J. Tremblay, J.F. Fortin, R. Cantin, The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1, *Immunol Today* 19 (1998) 346-351.
- [21] H.S. Ko, S.M. Fu, R.J. Winchester, D.T. Yu, H.G. Kunkel, Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen- and antigen-activated T cells, *J Exp Med* 150 (1979) 246-255.
- [22] E.L. Reinherz, P.C. Kung, J.M. Pesando, J. Ritz, G. Goldstein, S.F. Schlossman, Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody. Activation stimuli required for expression, *J Exp Med* 150 (1979) 1472-1482.
- [23] D.T. Yu, R.J. Winchester, S.M. Fu, A. Gibofsky, H.S. Ko, H.G. Kunkel, Peripheral blood Ia-positive T cells. Increases in certain diseases and after immunization, *J Exp Med* 151 (1980) 91-100.
- [24] T.A. Springer, Adhesion receptors of the immune system, *Nature* 346 (1990) 425-434.
- [25] J.S. Paquette, J.F. Fortin, L. Blanchard, M.J. Tremblay, Level of ICAM-1 surface expression on virus producer cells influences both the amount of virion-bound host ICAM-1 and human immunodeficiency virus type 1 infectivity, *J Virol* 72 (1998) 9329-9336.

- [26] S. Bounou, J.E. Leclerc, M.J. Tremblay, Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo, *J Virol* 76 (2002) 1004-1014.
- [27] C.D. Rizzuto, J.G. Sodroski, Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization, *J Virol* 71 (1997) 4847-4851.
- [28] J.F. Fortin, R. Cantin, M.G. Bergeron, M.J. Tremblay, Interaction between virion-bound host intercellular adhesion molecule-1 and the high-affinity state of lymphocyte function-associated antigen-1 on target cells renders R5 and X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1 more refractory to neutralization, *Virology* 268 (2000) 493-503.
- [29] G.J. Freeman, A.S. Freedman, J.M. Segil, G. Lee, J.F. Whitman, L.M. Nadler, B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells, *J Immunol* 143 (1989) 2714-2722.
- [30] M. Azuma, H. Yssel, J.H. Phillips, H. Spits, L.L. Lanier, Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes, *J Exp Med* 177 (1993) 845-850.
- [31] K.C. Wolthers, S.A. Otto, S.M. Lens, D.N. Kolbach, R.A. van Lier, F. Miedema, L. Meyaard, Increased expression of CD80, CD86 and CD70 on T cells from HIV-infected individuals upon activation in vitro: regulation by CD4+ T cells, *Eur J Immunol* 26 (1996) 1700-1706.
- [32] T.M. Foy, A. Aruffo, J. Bajorath, J.E. Buhlmann, R.J. Noelle, Immune regulation by CD40 and its ligand GP39, *Annu Rev Immunol* 14 (1996) 591-617.
- [33] L.B. Clark, T.M. Foy, R.J. Noelle, CD40 and its ligand, *Adv Immunol* 63 (1996) 43-78.
- [34] I.S. Grewal, R.A. Flavell, A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses, *Immunol Today* 17 (1996) 410-414.

- [35] R.D. Stout, J. Suttles, The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses, *Immunol Today* 17 (1996) 487-492.
- [36] E.A. Clark, CD40: a cytokine receptor in search of a ligand, *Tissue Antigens* 36 (1990) 33-36.
- [37] M.R. Alderson, R.J. Armitage, T.W. Tough, L. Strockbine, W.C. Fanslow, M.K. Spriggs, CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40, *J Exp Med* 178 (1993) 669-674.
- [38] C.F. Ware, P.D. Crowe, T.L. Vanarsdale, J.L. Andrews, M.H. Grayson, R. Jerzy, C.A. Smith, R.G. Goodwin, Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells, *J Immunol* 147 (1991) 4229-4238.
- [39] R.J. Armitage, T.W. Tough, B.M. Macduff, W.C. Fanslow, M.K. Spriggs, F. Ramsdell, M.R. Alderson, CD40 ligand is a T cell growth factor, *Eur J Immunol* 23 (1993) 2326-2331.
- [40] W.C. Fanslow, K.N. Clifford, M. Seaman, M.R. Alderson, M.K. Spriggs, R.J. Armitage, F. Ramsdell, Recombinant CD40 ligand exerts potent biologic effects on T cells, *J Immunol* 152 (1994) 4262-4269.
- [41] F.A. Vyth-Dreese, T.A. DelleMijn, J.W. van Oostveen, C.A. Feltkamp, A. Hekman, Functional expression of adhesion receptors and costimulatory molecules by fresh and immortalized B-cell non-Hodgkin's lymphoma cells, *Blood* 85 (1995) 2802-2812.
- [42] R.J. Armitage, W.C. Fanslow, L. Strockbine, et al., Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40, *Nature* 357 (1992) 80-82.
- [43] M. Roy, T. Waldschmidt, A. Aruffo, J.A. Ledbetter, R.J. Noelle, The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells, *J Immunol* 151 (1993) 2497-2510.

- [44] R. Cantin, G. Martin, M.J. Tremblay, A novel virus capture assay reveals a differential acquisition of host HLA-DR by clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 expanded in primary human cells depending on the nature of producing cells and the donor source, *J Gen Virol* 82 (2001) 2979-2987.
- [45] K. Tenner-Racz, P. Racz, M. Dietrich, P. Kern, Altered follicular dendritic cells and virus-like particles in AIDS and AIDS-related lymphadenopathy, *Lancet* 1 (1985) 105-106.
- [46] G. Pantaleo, C. Graziosi, L. Butini, P.A. Pizzo, S.M. Schnittman, D.P. Kotler, A.S. Fauci, Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 9838-9842.
- [47] C.H. Fox, K. Tenner-Racz, P. Racz, A. Firpo, P.A. Pizzo, A.S. Fauci, Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA, *J Infect Dis* 164 (1991) 1051-1057.
- [48] H. Spiegel, H. Herbst, G. Niedobitek, H.D. Foss, H. Stein, Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells, *Am J Pathol* 140 (1992) 15-22.
- [49] G. Pantaleo, C. Graziosi, J.F. Demarest, et al., HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease, *Nature* 362 (1993) 355-358.
- [50] S.S. Frankel, B.M. Wenig, A.P. Burke, et al., Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid, *Science* 272 (1996) 115-117.
- [51] S. Glushakova, B. Baibakov, L.B. Margolis, J. Zimmerberg, Infection of human tonsil histocultures: a model for HIV pathogenesis, *Nat Med* 1 (1995) 1320-1322.
- [52] D.J. Charron, H.O. McDevitt, Analysis of HLA-D region-associated molecules with monoclonal antibody, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 6567-6571.

- [53] C. Chirathaworn, J.E. Kohlmeier, S.A. Tibbetts, L.M. Rumsey, M.A. Chan, S.H. Benedict, Stimulation through intercellular adhesion molecule-1 provides a second signal for T cell activation, *J Immunol* 168 (2002) 5530-5537.
- [54] P. Engel, J.G. Gribben, G.J. Freeman, et al., The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen, *Blood* 84 (1994) 1402-1407.
- [55] K. Tenner-Racz, P. Racz, J.C. Gluckman, M. Popovic, Cell-free HIV in lymph nodes of patients with AIDS and generalized lymphadenopathy, *N Engl J Med* 318 (1988) 49-50.
- [56] K. Tenner-Racz, P. Racz, H. Schmidt, M. Dietrich, P. Kern, A. Louie, S. Gartner, M. Popovic, Immunohistochemical, electron microscopic and in situ hybridization evidence for the involvement of lymphatics in the spread of HIV-1, *Aids* 2 (1988) 299-309.
- [57] H.K. Parmentier, D. van Wichen, D.M. Sie-Go, J. Goudsmit, J.C. Borleffs, H.J. Schuurman, HIV-1 infection and virus production in follicular dendritic cells in lymph nodes. A case report, with analysis of isolated follicular dendritic cells, *Am J Pathol* 137 (1990) 247-251.
- [58] J. Embretson, M. Zupancic, J.L. Ribas, A. Burke, P. Racz, K. Tenner-Racz, A.T. Haase, Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS, *Nature* 362 (1993) 359-362.
- [59] A.T. Haase, K. Henry, M. Zupancic, et al., Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue, *Science* 274 (1996) 985-989.
- [60] O. Carpen, P. Pallai, D.E. Staunton, T.A. Springer, Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin, *J Cell Biol* 118 (1992) 1223-1234.
- [61] L. Heiska, C. Kantor, T. Parr, D.R. Critchley, P. Vilja, C.G. Gahmberg, O. Carpen, Binding of the cytoplasmic domain of intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) to alpha-actinin, *J Biol Chem* 271 (1996) 26214-26219.

- [62] O. Rey, J. Canon, P. Krogstad, HIV-1 Gag protein associates with F-actin present in microfilaments, *Virology* 220 (1996) 530-534.
- [63] B. Liu, R. Dai, C.J. Tian, L. Dawson, R. Gorelick, X.F. Yu, Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin, *J Virol* 73 (1999) 2901-2908.
- [64] I. Frank, H. Stoiber, S. Godar, H. Stockinger, F. Steindl, H.W. Katinger, M.P. Dierich, Acquisition of host cell-surface-derived molecules by HIV-1, *Aids* 10 (1996) 1611-1620.
- [65] B.S. Lee, N.A. Rust, A.J. McMichael, H.O. McDevitt, HLA-DR2 subtypes form an additional supertypic family of DR beta alleles, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 4591-4595.
- [66] C. Kochli, T. Wendland, K. Frutig, R. Grunow, S. Merlin, W.J. Pichler, CD80 and CD86 costimulatory molecules on circulating T cells of HIV infected individuals, *Immunol Lett* 65 (1999) 197-201.
- [67] G. Marodon, N.R. Landau, D.N. Posnett, Altered expression of CD4, CD54, CD62L, and CCR5 in primary lymphocytes productively infected with the human immunodeficiency virus, *AIDS Res Hum Retroviruses* 15 (1999) 161-171.
- [68] S.P. Aries, B. Schaaf, F. Hansen, K. Weyrich, V. Kurowski, R. Dennin, K. Dalhoff, Expression of complement receptors and regulatory proteins on alveolar CD4+ lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 infected individuals, *Eur Respir J* 10 (1997) 1736-1741.
- [69] D. McIlroy, B. Autran, J.P. Clauvel, E. Oksenhendler, P. Debre, A. Hosmalin, Low CD83, but normal MHC class II and costimulatory molecule expression, on spleen dendritic cells from HIV+ patients, *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 (1998) 505-513.
- [70] M. Casamayor-Palleja, M. Khan, I.C. MacLennan, A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their

surface after activation through the T cell receptor complex, *J Exp Med* 181 (1995) 1293-1301.

[71] D. Brugnoli, E. Prati, P. Airo, F. Castelli, R. Cattaneo, The ability of CD4+ cells from HIV+ individuals to express CD40 ligand after in vitro stimulation is not impaired, *Clin Immunol Immunopathol* 74 (1995) 112-114.

[72] N. Chirmule, T.W. McCloskey, R. Hu, V.S. Kalyanaraman, S. Pahwa, HIV gp120 inhibits T cell activation by interfering with expression of costimulatory molecules CD40 ligand and CD80 (B71), *J Immunol* 155 (1995) 917-924.

[73] K.C. Wolthers, S.A. Otto, S.M. Lens, R.A. Van Lier, F. Miedema, L. Meyaard, Functional B cell abnormalities in HIV type 1 infection: role of CD40L and CD70, *AIDS Res Hum Retroviruses* 13 (1997) 1023-1029.

[74] G. Vanham, L. Penne, J. Devalck, L. Kestens, R. Colebunders, E. Bosmans, K. Thielemans, J.L. Ceuppens, Decreased CD40 ligand induction in CD4 T cells and dysregulated IL-12 production during HIV infection, *Clin Exp Immunol* 117 (1999) 335-342.

[75] A.E. Sousa, A.F. Chaves, M. Doroana, F. Antunes, R.M. Victorino, Early reduction of the over-expression of CD40L, OX40 and Fas on T cells in HIV-1 infection during triple anti-retroviral therapy: possible implications for lymphocyte traffic and functional recovery, *Clin Exp Immunol* 116 (1999) 307-315.

[76] R.S. Kornbluth, The emerging role of CD40 ligand in HIV infection, *J Leukoc Biol* 68 (2000) 373-382.

[77] R.S. Kornbluth, An expanding role for CD40L and other tumor necrosis factor superfamily ligands in HIV infection, *J Hematother Stem Cell Res* 11 (2002) 787-801.

[78] C.S. Subauste, M. Wessendarp, A.G. Smulian, P.T. Frame, Role of CD40 ligand signaling in defective type 1 cytokine response in human immunodeficiency virus infection, *J Infect Dis* 183 (2001) 1722-1731.

- [79] D.H. Nguyen, J.E. Hildreth, Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts, *J Virol* 74 (2000) 3264-3272.
- [80] A. Ono, E.O. Freed, Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 13925-13930.
- [81] H.A. Anderson, E.M. Hiltbold, P.A. Roche, Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation, *Nat Immunol* 1 (2000) 156-162.
- [82] A. Kaykas, K. Worringer, B. Sugden, CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex, *Embo J* 20 (2001) 2641-2654.
- [83] R.W. Tilghman, R.L. Hoover, E-selectin and ICAM-1 are incorporated into detergent-insoluble membrane domains following clustering in endothelial cells, *FEBS Lett* 525 (2002) 83-87.
- [84] R.D. Huby, R.J. Dearman, I. Kimber, Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts, *J Biol Chem* 274 (1999) 22591-22596.
- [85] R. Huby, F. Chowdhury, G. Lombardi, Rafts for antigen presentation?, *Nat Immunol* 2 (2001) 3.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Capture of HIV-1 clinical isolates expanded in PBMCs and human lymphoid tissue with magnetic beads coated with anti-HLA-DR, -ICAM-1, -CD40, -CD86 and -CD40L antibodies. PBMCs from donors P1 (▨) or P2 (▤) and tonsillar tissues from donors T1 (▥) or T2 (■) were inoculated with HIV-1 clinical isolates 92HT599 (X4-tropic) or 92US657 (R5-tropic). Virus preparations were concentrated and purified from cell-free culture supernatants harvested at 7, 10 and 13 days post-infection. Similar amounts of each virus stock, standardized in term of p24 (i.e., 2 ng of p24), were subjected to the virus capture assay using streptavidin-coated beads tagged with biotinylated anti-HLA-DR (panel A), -ICAM-1 (panel B), -CD40 (panel C), -CD86 (panel D) and -CD40L antibodies (panel E). The amounts of precipitated viruses were estimated with the use of a p24 test. The data shown represent the means \pm standard deviations of triplicate samples. Background p24 control values that were obtained with beads labeled with an isotype-matched irrelevant antibody (i.e., IgG₁ or IgG_{2a}) have been subtracted from the values shown.

Figure 2. Flow cytometric analyses of HLA-DR on HIV-1 producer cells. PBMCs from donor P1 were infected either with 92HT599 (panel A) or 92US657 (panel C) while human lymphoid tissue from donor T1 were inoculated either with 92HT599 (panel B) or 92US657 (panel D). Upon cell harvest on days 7, 10 and 13 post-infection, cells were incubated with an antibody specific for HLA-DR (clone 2.06), then incubated with R-phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse (solid lines). Controls consisted of cells incubated with an isotype-matched irrelevant monoclonal IgG_{2a} antibody (dotted lines). PPC: percentage of positive cells.

Figure 3. CD40L is efficiently incorporated in a prototypic X4 laboratory strain of HIV-1 produced in 293T cells. 293T cells were either transfected with pNL4-3 (NL4-3/null) or

cotransfected with pNL4-3 and the pcDNA3.1-CD40L expression vector (NL4-3/CD40L). Similar amounts of each virus stock, standardized in term of p24 (i.e., 1 ng of p24), were next incubated with magnetic beads coated with antibodies specific for CD40L. The levels of precipitated viruses were estimated with the use of a p24 test. The data shown represent the means \pm standard deviations of triplicate samples. Background p24 control values that were obtained with beads labeled with an isotype-matched irrelevant antibody (i.e., IgG_{2a}) have been subtracted from the values shown.

HLA-DR

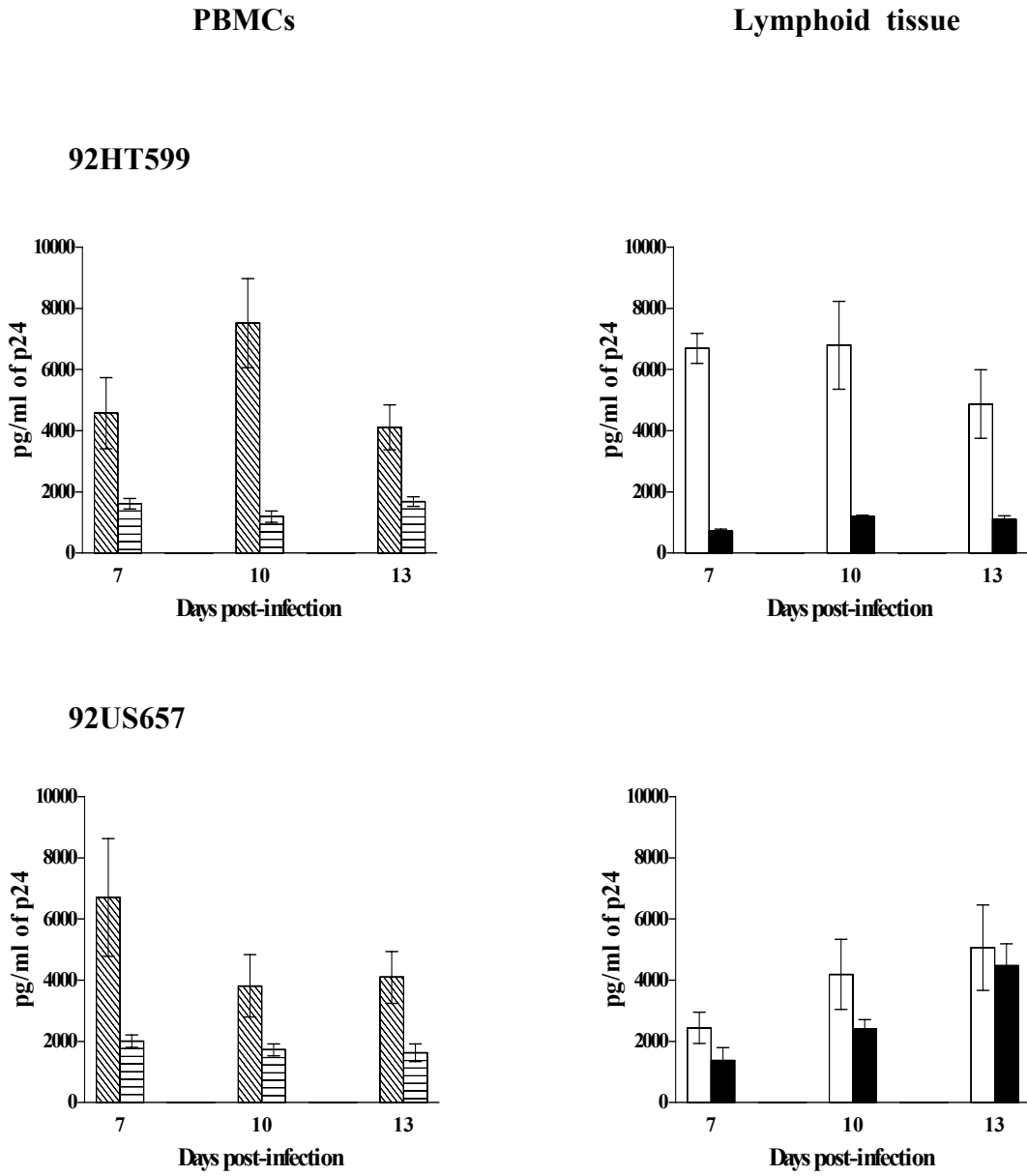


Figure 1A

ICAM-1

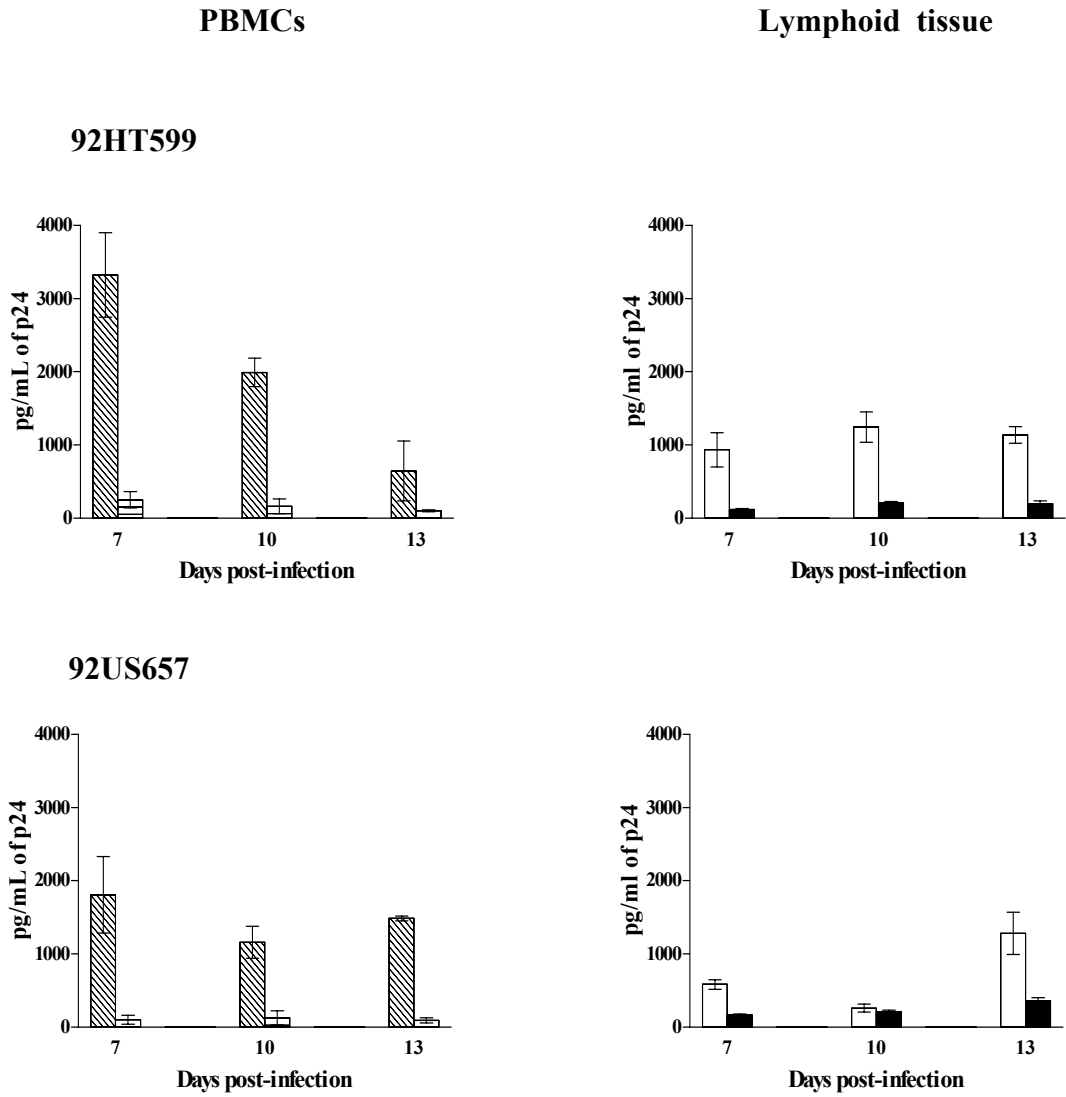


Figure 1B

CD40

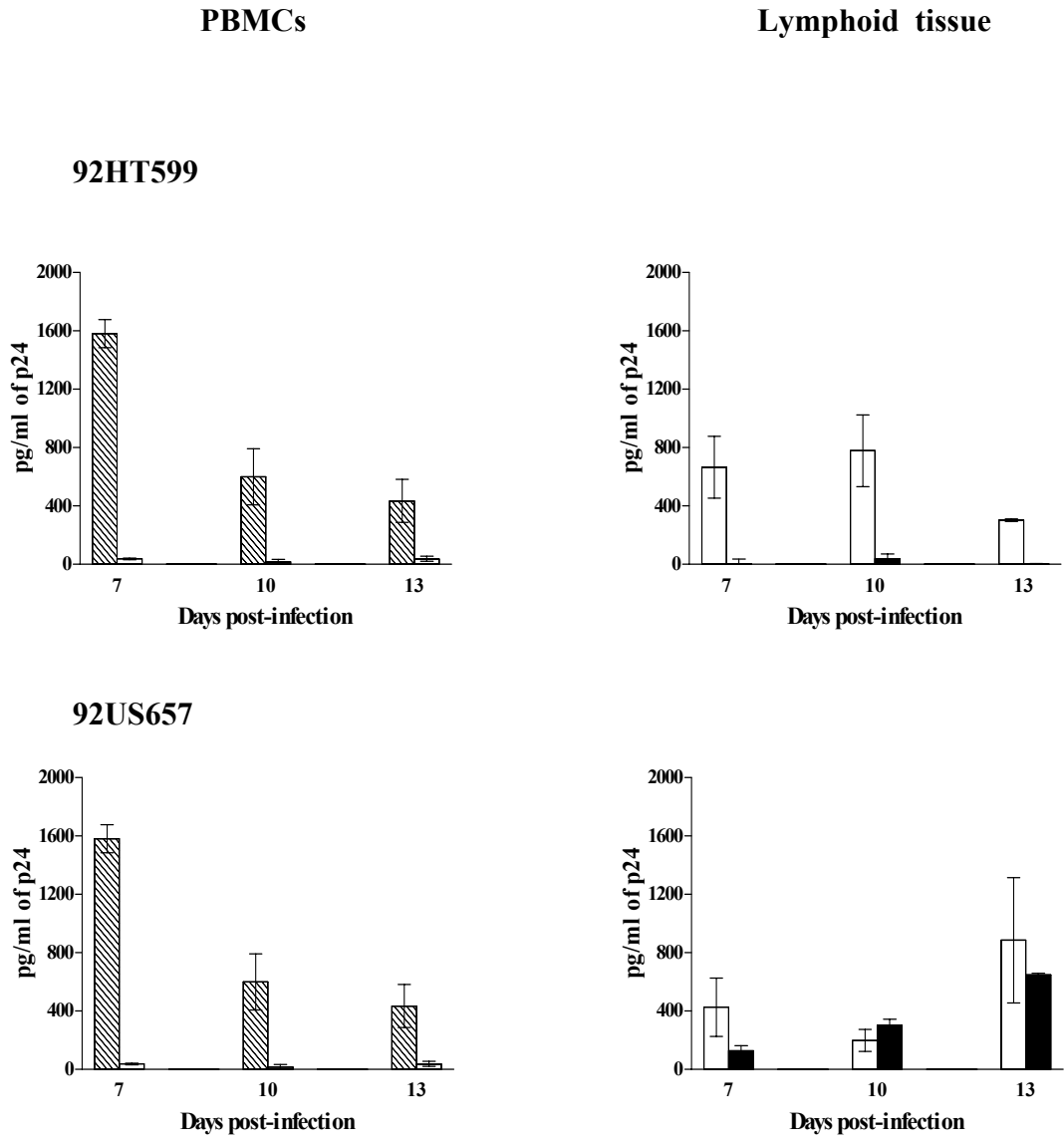


Figure 1C

CD86

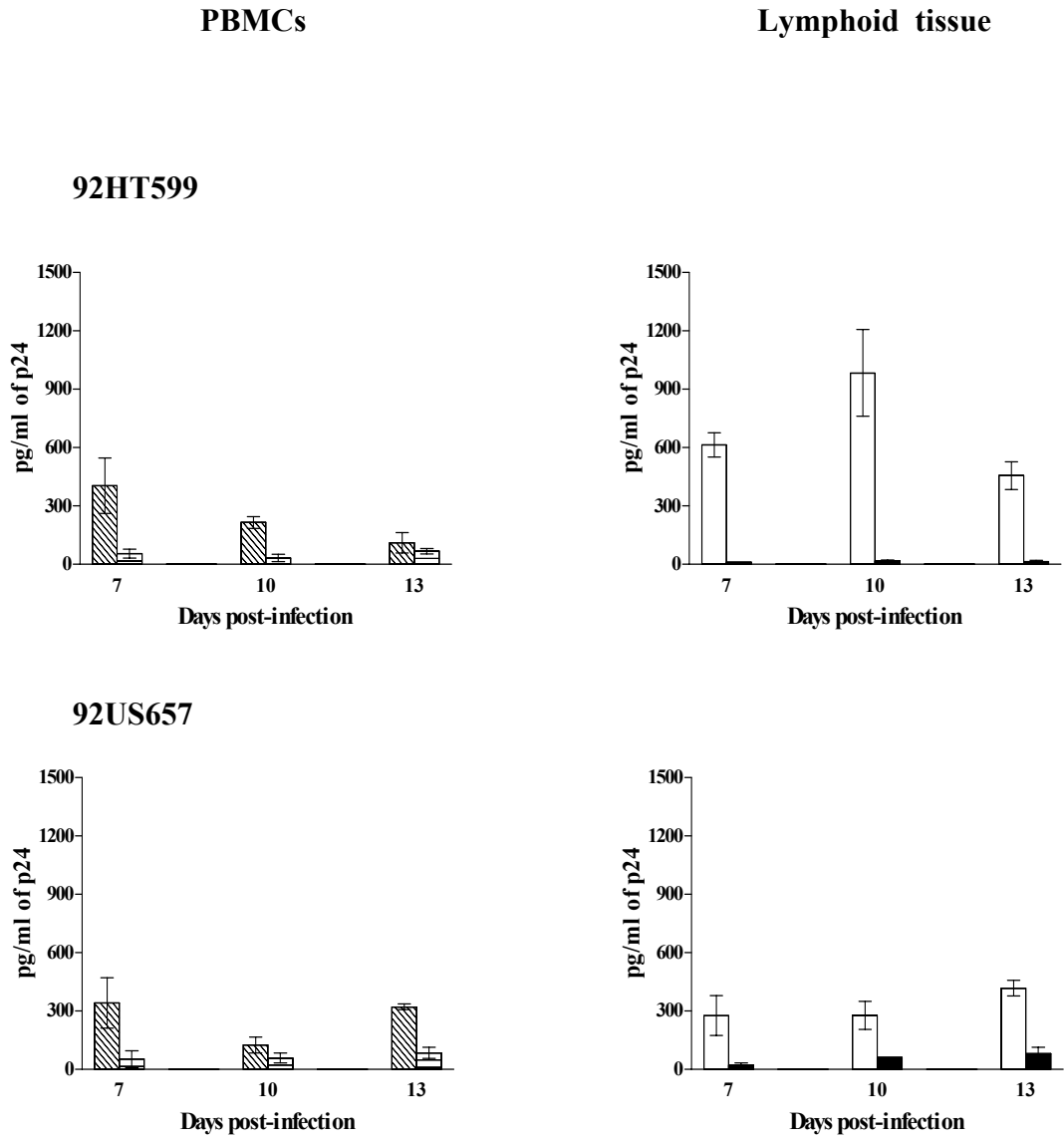


Figure 1D

CD40L

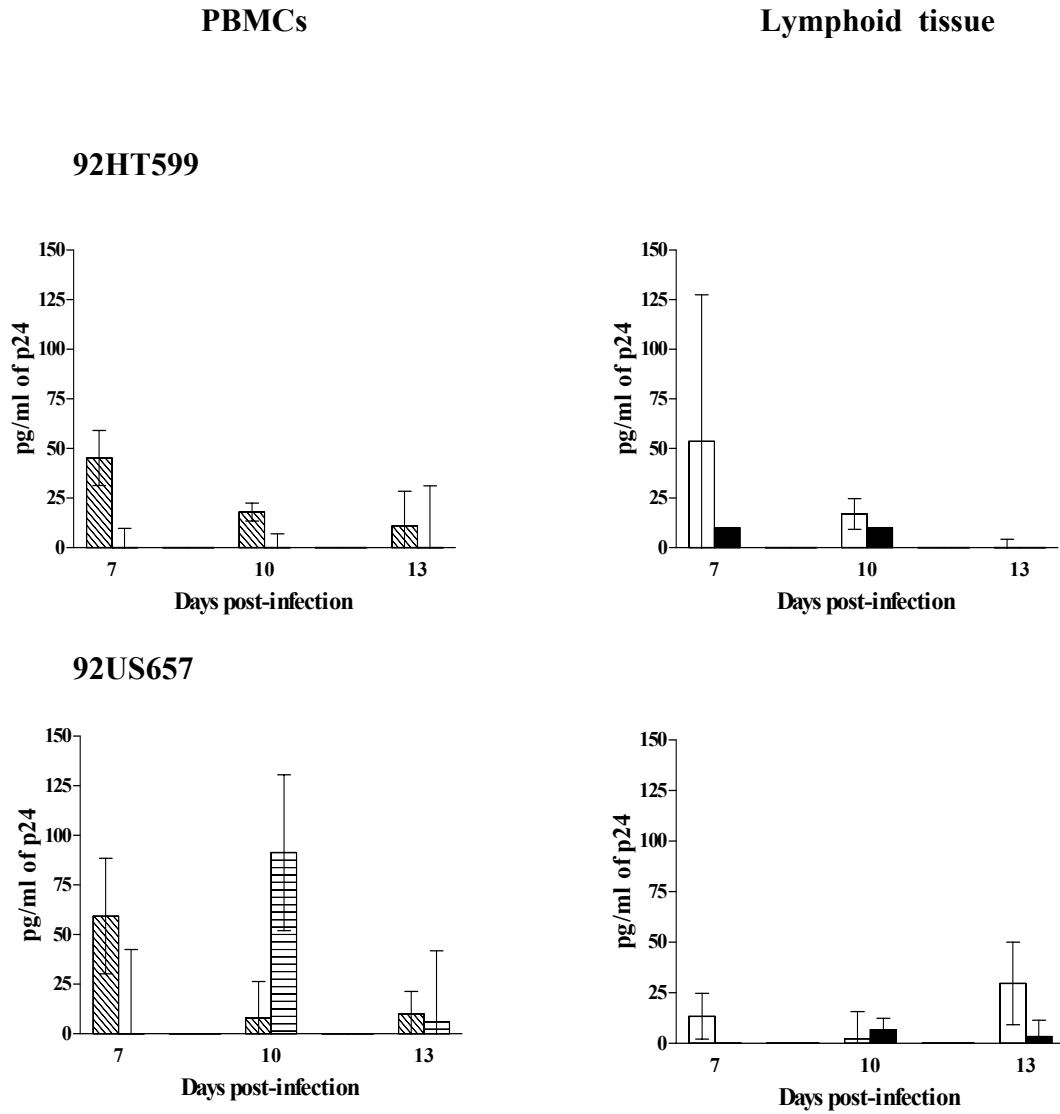


Figure 1E

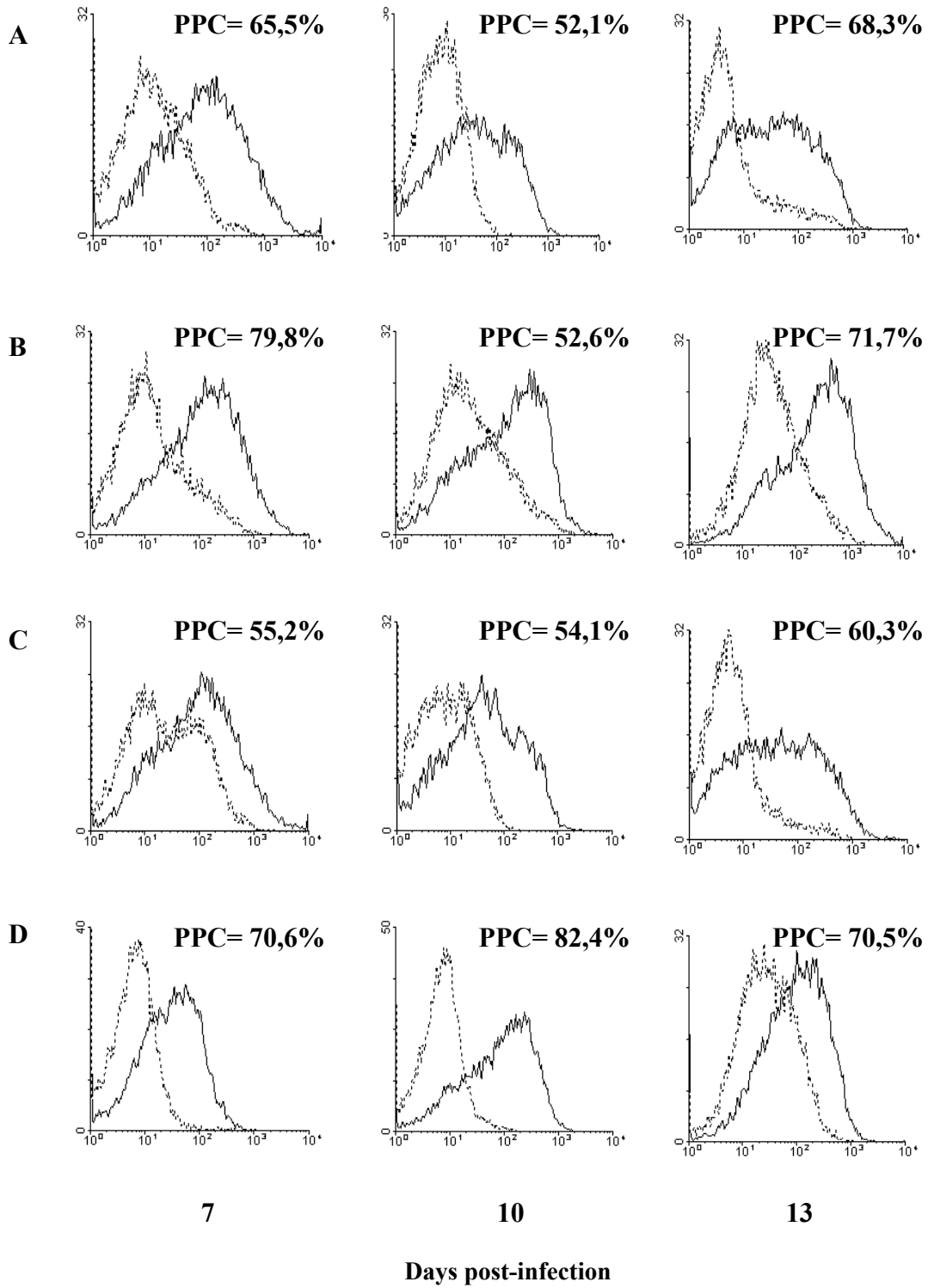


Figure 2

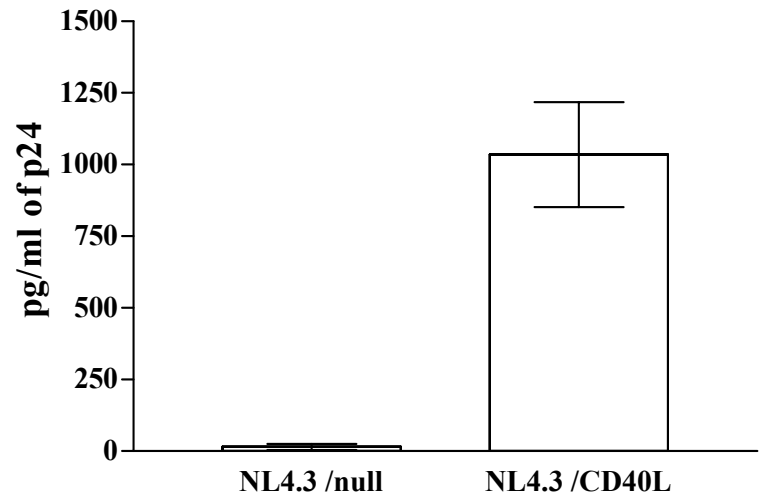


Figure 3

Chapitre 4. Les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 ne sont pas nécessaires à l'insertion de la molécule HLA-DR de l'hôte dans l'enveloppe virale

4.1 Particularités de certaines méthodes utilisées dans l'étude

Dans nos expériences de transfection de cellules 293T, l'expression de HLA-DR est attribuable à l'utilisation du plasmide codant pour le facteur de transactivation CIITA (*class II transactivator*). Sans se lier directement à l'ADN, CIITA recrute le complexe d'ARN polymérase au promoteur (556) pour réguler l'expression constitutive et inductible des gènes du CMH de classe II (557). En ce qui concerne les lymphocytes T CD4+, ils ont été activés avec de la PHA-L et de l'IL-2.

4.2 L'étude

L'étude dont il est question dans ce chapitre a été publiée dans la revue *Virology* (2005) 335 (2) 286-290 et la version finale de cette publication fait l'objet de la section 4.2.2.

4.2.1 Résumé de l'article

HLA-DR est une protéine provenant de l'hôte présente en surface du VIH-1. Afin de clarifier le mécanisme par lequel cette molécule est insérée dans les virus, nous avons évalué si le processus d'incorporation pouvait être influencé par le niveau d'expression des glycoprotéines de l'enveloppe codées par le virus. Des virions de type sauvage et des virus dépourvus des glycoprotéines de l'enveloppe virale - ou en affichant des niveaux plus

faibles - ont été produits dans différents types cellulaires. Les résultats de la capture de virus indiquent que la molécule HLA-DR est efficacement incorporée et à des concentrations comparables dans les préparations virales testées. Ainsi, les glycoprotéines de l'enveloppe virale ne jouent pas un rôle actif dans l'acquisition, par le VIH-1, de la molécule HLA-DR provenant de l'hôte.

4.2.2 Article

**Envelope glycoproteins are dispensable for insertion of host
HLA-DR molecules within nascent human immunodeficiency virus type 1 virions**

**Geneviève Martin¹, Yannick Beauséjour¹,
Jacques Thibodeau², and Michel. J. Tremblay^{1*}**

*¹Research Center in Infectious Diseases, CHUL Research Center,
and Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada*

*²Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie,
Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada*

*Corresponding author. Mailing address:

Laboratory of Human Immuno-Retrovirology

Research Center in Infectious Diseases, RC709

CHUL Research Center

2705 Laurier Blvd, Quebec (QC)

Canada, G1V 4G2.

Phone: (418) 654-2705; Fax: (418) 654-2212

E-mail: michel.j.tremblay@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

HLA-DR is a host-derived protein present at the surface of HIV-1. To clarify the mechanism through which this molecule is inserted within viruses, we monitored whether the incorporation process might be influenced by the level of virus-encoded envelope (Env) glycoproteins. Wild type virions and viruses either lacking or bearing lower levels of Env were produced in different cell types. Results from a virus capture test indicate that HLA-DR is efficiently incorporated and at comparable levels in the tested virus preparations. Therefore Env does not play an active role in acquisition of host HLA-DR by emerging HIV-1 particles.

Keywords: Envelope glycoproteins; HLA-DR; Human immunodeficiency virus type 1

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) *gag* and *env* genes encode for polyproteins Pr55^{Gag} and gp160, respectively. The latter is the precursor of the gp120 and gp41 glycoproteins that are forming the mature virus envelope (Env), which facilitates binding of the virus to target cells and mediate fusion and entry. During viral assembly, the matrix (MA) domain of Pr55^{Gag} interacts with Env, a process leading to the packaging of Env glycoproteins into newly formed viral entities (Dorfman et al., 1994; Freed and Martin, 1995; Yu et al., 1992). Thereafter, virions egress from the producer cell and it is during this step that HIV-1 acquires a large collection of host cell membrane constituents. It has been reported that HIV-1 may actually benefit from such embedded surface molecules (reviewed in (Tremblay et al., 1998)). Yet, the mechanism underlying the incorporation process of host-derived molecules is poorly understood and efforts have to be put forward into defining this phenomenon thoroughly since it might modulate the pathogenesis caused by this human retrovirus. To work towards this end, we attempted to define whether HLA-DR acquisition is influenced by the level of Env glycoproteins based on a previous study suggesting that Env is mandatory for the efficient insertion of Human Leukocyte Antigen (HLA) class II proteins within HIV-1 (Poon et al., 2000). Indeed, Poon and coworkers demonstrated that the presence of Env glycoproteins, and more particularly the gp41TM cytoplasmic tail, is necessary to achieve incorporation of HLA class II proteins in virions produced by the human T lymphoid cell line H9 and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). HLA-DR, a product of major histocompatibility complex (MHC) class II genes, is a heterodimer formed by non-covalently bound α - and β -transmembrane chains prolonged by short cytoplasmic domains. This HLA determinant is a well-studied molecule in the context of incorporation of host molecules into HIV-1 (Cantin et al., 1997a, 1997b; Castilletti et al., 1995; Rossio et al., 1995).

The acquisition of HLA-DR by HIV-1 produced in 293T cells is independent of Env

Progeny viruses were initially generated in 293T cells using a well established transient transfection-and-expression system (Fortin et al., 1997; Fortin et al., 1998; Paquette et al., 1998). Briefly, 293T cells were co-transfected with a plasmid encoding for the class II

transactivator (CIITA) (Khalil et al., 2002) to drive expression of MHC class II determinants and plasmids coding for HIV-1 viruses bearing various levels of gp120 (NL4-3 backbone). The molecular clones of HIV-1 that were used in this study include wild type (WT) NL4-3 (Adachi et al., 1986), two NL4-3 matrix mutants (34VE and 30LE) (Freed and Martin, 1995, 1996), a NL4-3 plasmid deficient for both Env and Nef (Env-/Nef-) (Connor et al., 1995), and a NL4-3 vector deficient for Env only (Env-/Nef+) (Ott et al., 1999). Table I shows the levels of virus-associated gp120 and p24 determined by ELISA (Paquette et al., 1998) and molar ratios of gp120 to p24 calculated on the basis of their respective molecular masses (i.e., 120 and 24 kDa, respectively) as described previously (Beausejour and Tremblay, 2004a). Based on these molar ratios, WT, 34VE, 30LE, Env-/Nef- and Env-/Nef+ viruses displayed 100%, 21%, 4%, 0%, and 0% gp120, respectively. Virus stocks were ultrafiltrated (Centricon®Plus-20 Biomax-100 filter devices, Millipore Corporation) to eliminate free p24. Then, viruses were submitted to a virus capture assay comprising streptavidin-coated magnetic beads (Dynal Biotech Inc.) and biotinylated monoclonal antibodies (anti-HLA-DR, clone 2.06), followed by determination of p24 concentration by a homemade enzymatic test (Martin and Tremblay, 2004). Beads coated with an isotype-matched (i.e., IgG_{2a}) irrelevant antibody were used as controls. As illustrated in Fig. 1, comparable amounts of viruses were captured by HLA-DR-tagged beads in the WT, 34VE, 30LE and Env-/Nef- populations, thus suggesting that HLA-DR incorporation is not influenced by the degree of virus-associated Env glycoproteins. Given that Nef is influencing the budding site of HIV-1 (Zheng et al., 2001) which could in turn affect the incorporation process based on the idea that HIV-1 has been shown to egress from infected cells through specialized microdomains called lipid rafts (Chazal and Gerlier, 2003), similar experiments were also conducted with an Env-deficient vector that carries Nef. Data from the virus capture assay using samples from two separate transfection experiments confirmed that host-encoded HLA-DR molecules are acquired by HIV-1 particles devoid of Env glycoproteins (Fig. 2). Altogether these results also indicate that Nef is not contributing to the efficient insertion of HLA-DR within mature HIV-1 particles.

Env glycoproteins are not responsible for HLA-DR incorporation in virions produced in more natural cellular reservoirs

Although studies performed in 293T cells are informative, this human epithelial cell line might bear features distinct from the more natural cellular reservoirs of HIV-1, i.e., mononuclear cells from the immune system. Moreover, we wanted to validate our findings in the same cell types that were used to demonstrate the importance of Env packaging in HLA class II acquisition by HIV-1 (Poon et al., 2000). This goal was achieved by first producing WT and Env-/Nef- viruses pseudotyped with the broad-host-range vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G (VSV-G) in 293T cells. The pseudotyping strategy with VSV-G allows bypassing the natural mode of HIV-1 entry and not only broadens the natural virus tropism but also significantly enhances virus infectivity (Luo et al., 1998). Next, pseudotyped viruses were used to infect H9 cells and PBMCs from three healthy donors that were stimulated for 72 h with PHA-L (1 µg/ml: Sigma Corporation) and recombinant human IL-2 (50 U/ml). Additionally, RAJI-CD4 cells were also infected with pseudotyped viruses because these cells express high levels of MHC class II molecules (Accolla, 1983). Viruses released from the infected cells were ultrafiltrated and subjected to the virus capture test. In agreement with our findings with 293T cells, both WT and Env/Nef-deficient viruses produced by PBMCs, H9 and RAJI-CD4 cells were found to acquire host HLA-DR at comparable levels (data not shown).

Studies were also carried out in the two cellular subsets recognized as the major reservoirs of HIV-1, namely macrophages and CD4⁺ T lymphocytes. Autologous monocyte-derived macrophages (MDMs) and purified CD4⁺ T cells were obtained from three healthy donors before infection with VSV-G pseudotypes WT, 34VE and 30LE viruses. Once again, we could not draw any conclusion on the possible involvement of Env glycoproteins in the efficient incorporation of host-derived HLA-DR into the virion. Indeed, as shown in Fig. 3, viruses that carry very low amounts of gp120 (i.e., 30LE) were captured with a comparable efficiency as WT virions when using beads coated with anti-HLA-DR antibodies. The virus producer cell type (i.e., MDMs or CD4⁺ T lymphocytes) has no effect on the process of HLA-DR incorporation process by WT or matrix mutants viruses. It should be noted that similar observations were made when testing progeny viruses harvested from autologous

MDMs and CD4⁺ T cells inoculated with WT and Env-/Nef⁺ viruses that were pseudotyped with VSV-G (data not shown).

In the present work, we provide evidence that host HLA-DR is found embedded within HIV-1 particles that either do not bear or carry much lower levels of Env glycoproteins compared to wild type viruses. This observation parallels what is seen with ICAM-1 since this cell surface adhesion molecule is efficiently anchored on virions independently of Env (Beausejour and Tremblay, 2004a), but is in sharp contrast with the study by Poon and colleagues which is focused on HLA class II incorporation (Poon et al., 2000). The explanation for this discrepancy is currently unknown but differences in experimental methodologies may account for the different results. For example, although both studies have studied the same viral strain (i.e., NL4-3), we used a semi-quantitative immunocapture assay with a monoclonal anti-HLA-DR antibody that was followed by detection of captured viruses by a sensitive p24 test, a technique that detects as low as 31.25 pg per ml of p24 (Martin and Tremblay, 2004), whereas Poon and co-workers first immunoprecipitated viruses through the use of a polyclonal anti-HLA class II antibody before detection by immunoblotting for Gag proteins that can detect a minimum of 1 to 2 ng of a specific protein (Burnette, 1981).

In summary, the precise mechanism through which host-encoded HLA-DR molecules are incorporated within budding HIV-1 particles is still mysterious and further studies are needed to shed light on this issue. We are currently defining whether the association of HLA-DR with the cytoskeleton might contribute to the efficient incorporation of this cell surface protein onto HIV-1 based on the idea that oligomerization of HLA-DR molecules induces their association with the cytoskeleton and their recruitment into lipid rafts (El Fakhry et al., 2004). Moreover, it has been recently suggested that some cytoplasmic linker proteins might be involved in acquisition of host ICAM-1 by nascent HIV-1 virions (Beausejour and Tremblay, 2004b).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Sylvie Méthot for editorial assistance and Dr. J. Sting for the CIITA expression vector. This study was performed by G.M. in partial fulfillment of a PhD degree from the Microbiology-Immunology Program, Faculty of Medicine, Laval University. This study was made possible by an operating grant to M.J.T. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Research Program (grant # HOP-14438). G.M. holds a CIHR Doctoral Award and J.T. is the recipient of a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. M.J.T. holds the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (Senior level).

REFERENCES

- Accolla, R. S. (1983). Human B cell variants immunoselected against a single Ia antigen subset have lost expression of several Ia antigen subsets. *J Exp Med* 157(3), 1053-8.
- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., and Martin, M. A. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59(2), 284-91.
- Beausejour, Y., and Tremblay, M. J. (2004a). Envelope glycoproteins are not required for insertion of host ICAM-1 into human immunodeficiency virus type 1 and ICAM-1-bearing viruses are still infectious despite a suboptimal level of trimeric envelope proteins. *Virology* 324(1), 165-72.
- Beausejour, Y., and Tremblay, M. J. (2004b). Interaction between the cytoplasmic domain of ICAM-1 and Pr55Gag leads to acquisition of host ICAM-1 by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 78(21), 11916-25.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2), 195-203.
- Cantin, R., Fortin, J. F., Lamontagne, G., and Tremblay, M. (1997a). The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells. *Blood* 90(3), 1091-100.
- Cantin, R., Fortin, J. F., Lamontagne, G., and Tremblay, M. (1997b). The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J Virol* 71(3), 1922-30.

- Castilletti, C., Capobianchi, M. R., Fais, S., Abbate, I., Ficociello, B., Ameglio, F., Cordiali Fei, P., Santini, S. M., and Dianzani, F. (1995). HIV type 1 grown on interferon gamma-treated U937 cells shows selective increase in virion-associated intercellular adhesion molecule 1 and HLA-DR and enhanced infectivity for CD4-negative cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(5), 547-53.
- Chazal, N., and Gerlier, D. (2003). Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(2), 226-37, table of contents.
- Connor, R. I., Chen, B. K., Choe, S., and Landau, N. R. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206(2), 935-44.
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W. A., and Gottlinger, H. G. (1994). Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* 68(3), 1689-96.
- El Fakhry, Y., Bouillon, M., Leveille, C., Brunet, A., Khalil, H., Thibodeau, J., and Mourad, W. (2004). Delineation of the HLA-DR region and the residues involved in the association with the cytoskeleton. *J Biol Chem* 279(18), 18472-80.
- Fortin, J. F., Cantin, R., Lamontagne, G., and Tremblay, M. (1997). Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* 71(5), 3588-96.
- Fortin, J. F., Cantin, R., and Tremblay, M. J. (1998). T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *J Virol* 72(3), 2105-12.
- Freed, E. O., and Martin, M. A. (1995). Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J Virol* 69(3), 1984-9.

- Freed, E. O., and Martin, M. A. (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* 70(1), 341-51.
- Khalil, H., Deshaies, F., Bellemare-Pelletier, A., Brunet, A., Faubert, A., Azar, G. A., and Thibodeau, J. (2002). Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60(5), 372-82.
- Luo, T., Douglas, J. L., Livingston, R. L., and Garcia, J. V. (1998). Infectivity enhancement by HIV-1 Nef is dependent on the pathway of virus entry: implications for HIV-based gene transfer systems. *Virology* 241(2), 224-33.
- Martin, G., and Tremblay, M. J. (2004). HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L, and CD86 are incorporated to a similar degree into clinical human immunodeficiency virus type 1 variants expanded in natural reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured ex vivo. *Clin Immunol* 111(3), 275-85.
- Ott, D. E., Chertova, E. N., Busch, L. K., Coren, L. V., Gagliardi, T. D., and Johnson, D. G. (1999). Mutational analysis of the hydrophobic tail of the human immunodeficiency virus type 1 p6(Gag) protein produces a mutant that fails to package its envelope protein. *J Virol* 73(1), 19-28.
- Paquette, J. S., Fortin, J. F., Blanchard, L., and Tremblay, M. J. (1998). Level of ICAM-1 surface expression on virus producer cells influences both the amount of virion-bound host ICAM-1 and human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* 72(11), 9329-36.
- Poon, D. T., Coren, L. V., and Ott, D. E. (2000). Efficient incorporation of HLA class II onto human immunodeficiency virus type 1 requires envelope glycoprotein packaging. *J Virol* 74(8), 3918-23.
- Rossio, J. L., Bess, J., Jr., Henderson, L. E., Cresswell, P., and Arthur, L. O. (1995). HLA class II on HIV particles is functional in superantigen presentation to human T cells: implications for HIV pathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(12), 1433-9.

- Tremblay, M. J., Fortin, J. F., and Cantin, R. (1998). The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol Today* 19(8), 346-51.
- Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T. H., and Essex, M. (1992). The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* 66(8), 4966-71.
- Zheng, Y. H., Plemenitas, A., Linnemann, T., Fackler, O. T., and Peterlin, B. M. (2001). Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr Biol* 11(11), 875-9.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Incorporation of host HLA-DR in viruses produced in 293T cells. WT, 34VE, 30LE and Env-/Nef- viruses were produced in HLA-DR-expressing 293T cells and incubated with streptavidin-coated magnetic beads tagged with biotinylated anti-HLA-DR antibodies (2.06) or isotype-matched irrelevant antibodies (IgG_{2a}). The amounts of precipitated viruses were estimated with a p24 test. Data shown are the means \pm SD of triplicate samples and are representative of three independent experiments. Comparison of means using single-factor ANOVA and Dunnett's test indicate that there are no statistically significant differences between levels of immunoprecipitated WT, 34VE, 30LE or Env-/Nef- viruses by anti-HLA-DR antibodies ($P < 0.05$).

Fig. 2. Efficient incorporation of host HLA-DR in viruses produced in 293T cells. WT and Env-/Nef+ viruses were produced in HLA-DR-expressing 293T cells and incubated with streptavidin-coated magnetic beads tagged with biotinylated anti-HLA-DR antibodies (2.06) or isotype-matched irrelevant antibodies (IgG_{2a}). The amounts of precipitated viruses were estimated with a p24 test. Data shown are the means \pm SD of triplicate samples.

Fig. 3. Insertion of host HLA-DR in HIV-1 particles produced in primary human cells. WT, 34VE and 30LE viruses pseudotyped with VSV-G were first produced in 293T cells and next used to infect autologous MDMs and CD4⁺ T cells from three different healthy donors (A, B and C). Progeny viruses were incubated with streptavidin-coated magnetic beads labelled with biotinylated anti-HLA-DR antibodies (2.06) or isotype-matched irrelevant antibodies (IgG_{2a}). The amounts of precipitated viruses were estimated with a p24 test. Data shown are the means \pm SD of triplicate samples.

Table 1. gp120 associated to wild type and mutated HIV-1 virions

Virus stocks	gp120 (ng/ml) ^a	p24 (ng/ml) ^a	gp120/p24 molar ratios (10 ⁻²)	gp120/p24 (%) ^b
WT	19.0 ± 0.9	161 ± 8	2.4	100
34VE	31 ± 1	1202 ± 55	0.5	21
30LE	0.50 ± 0.03	103 ± 5	0.1	4
Env-/Nef-	0	NT	NA	NA
Env-/Nef+	0	NT	NA	NA

Results are the mean ± standard deviation of triplicates and are representative of three independent experiments. NT, not tested; NA, not applicable

^a The amounts of virus-associated gp120 and p24 were determined by enzymatic assays.

^b The percentage of gp120 associated to virions of the wild type stock was arbitrarily fixed to 100.

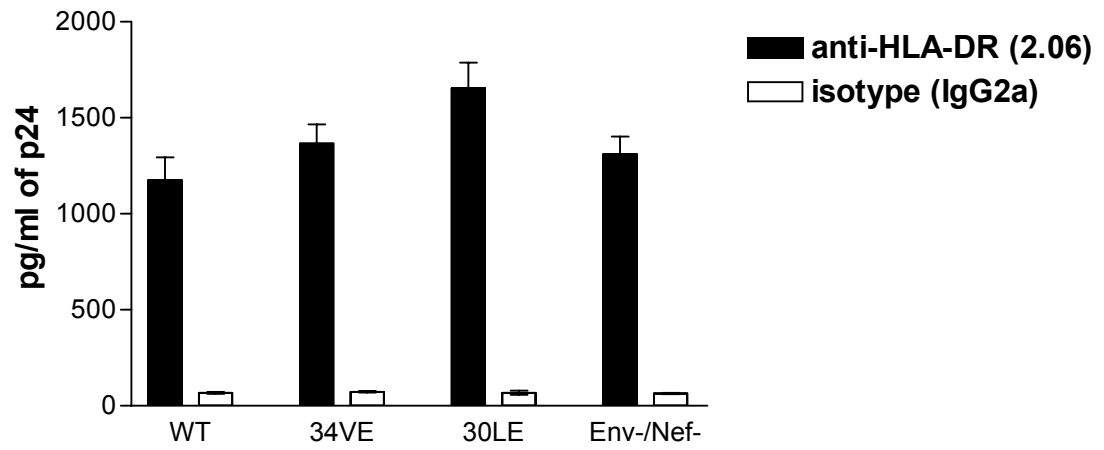


Figure 1

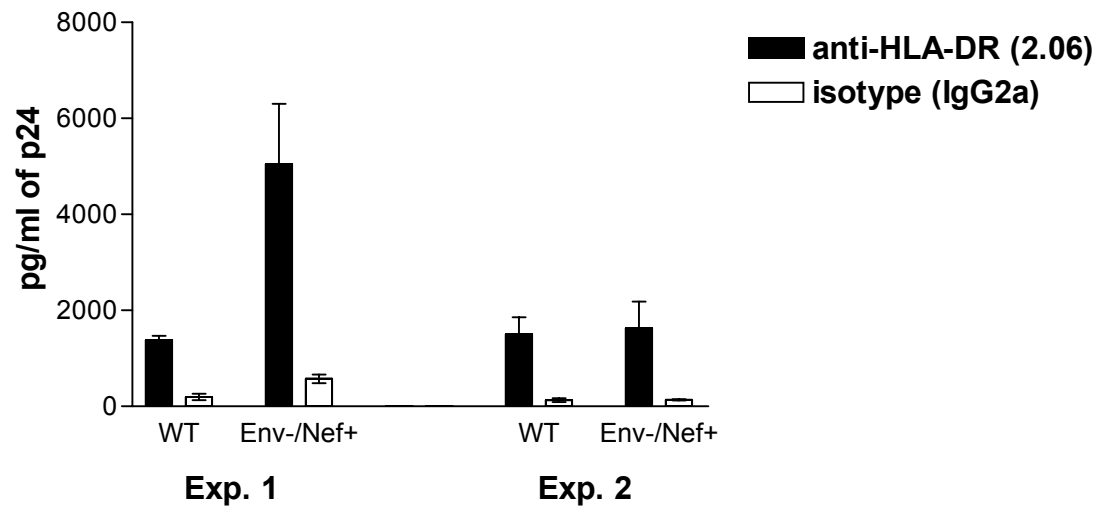


Figure 2

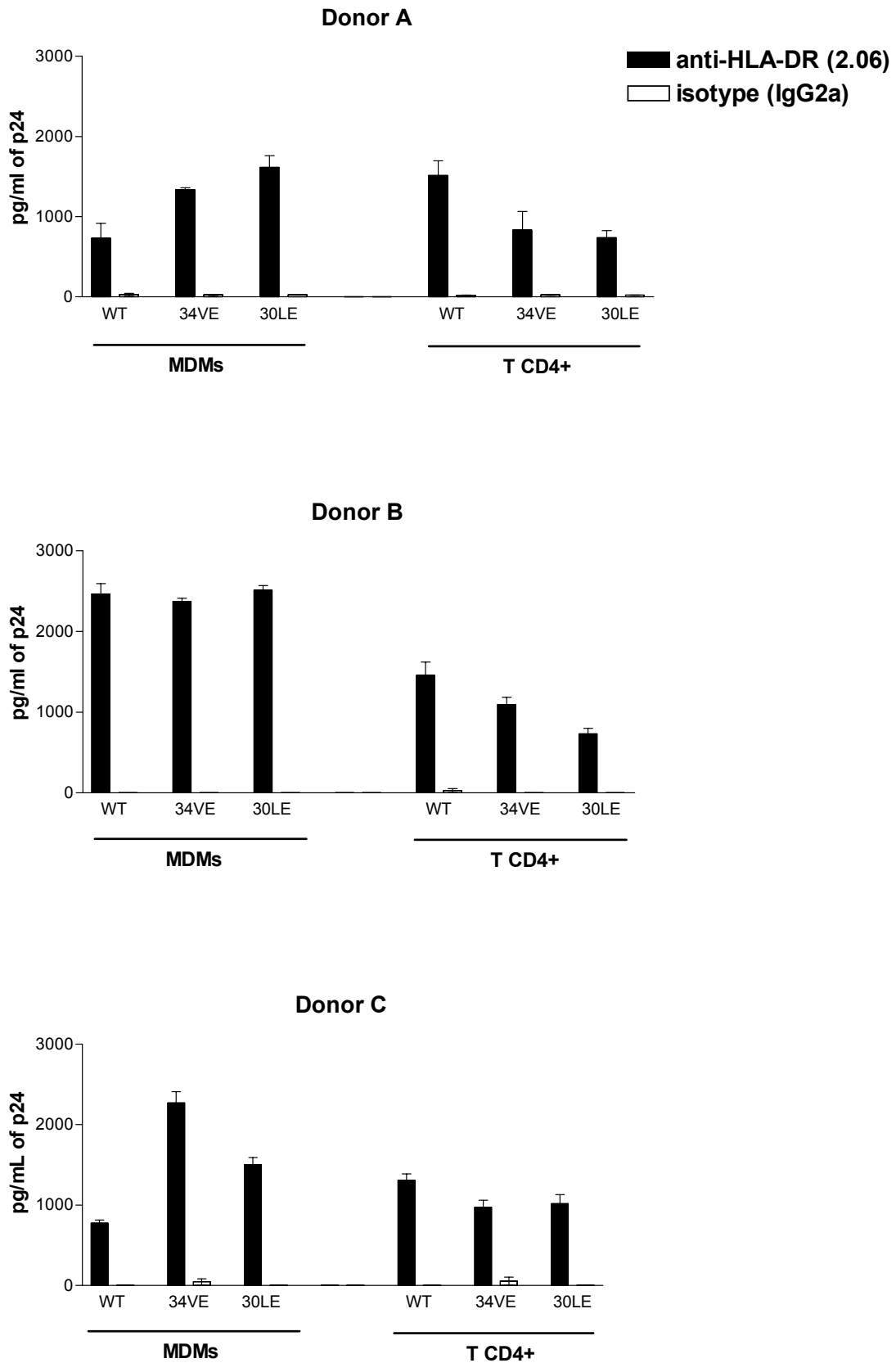


Figure 3

4.3 Résultat complémentaire

De plus, nous avons étudié l'incorporation de la molécule HLA-DR en présence d'un unique élément du VIH-1, soit Pr160^{GagPol}. Les pseudovirions ont été produits dans des cellules 293T - soit des cellules 293 contenant l'antigène grand T du virus SV40 - par cotransfection du plasmide hGagPol codant pour la polyprotéine Pr160^{GagPol} humanisée avec le plasmide qui code pour le facteur de transactivation CIITA. Les pseudovirions ont été ultrafiltrés, puis soumis à la technique d'immunocapture (figure 19), en utilisant des anticorps reconnaissant la molécule HLA-DR (clone 2.06), comme décrit dans l'article en 4.2.2. Le résultat obtenu montre que la simple présence de Pr160^{GagPol} permet l'incorporation de HLA-DR d'origine cellulaire dans les pseudovirions (figure 20).

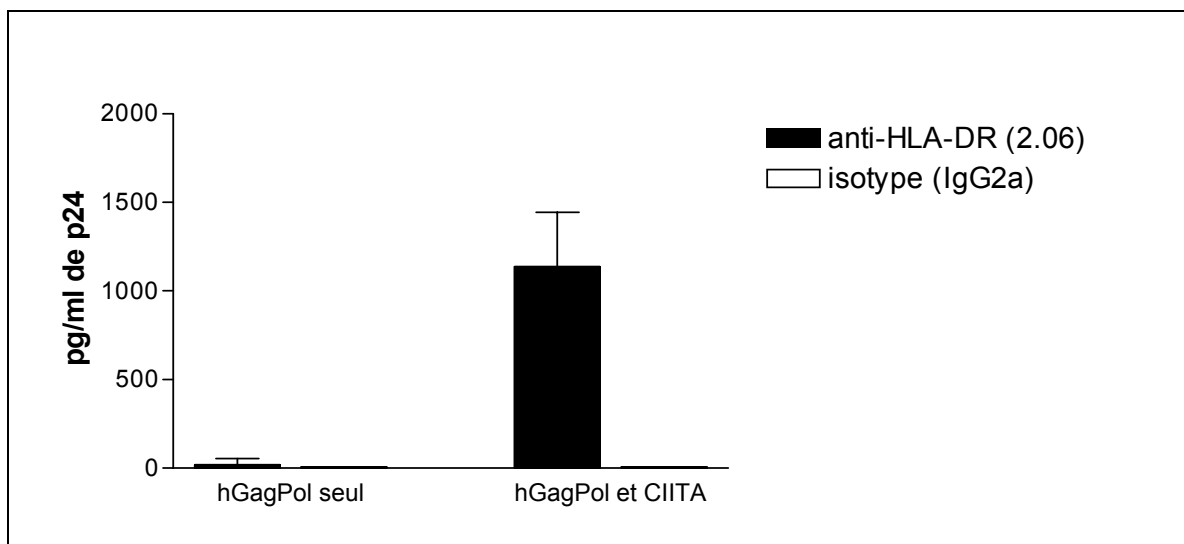


Figure 20. Présence de HLA-DR dans l'enveloppe des pseudovirions formés par la polyprotéine Pr160^{GagPol} humanisée, elle-même codée par le plasmide hGagPol.

Chapitre 5. Effets sur les lymphocytes B d'amygdales de l'insertion de la molécule CD40L de l'hôte dans l'enveloppe du VIH-1

5.1 Particularités de certaines méthodes utilisées dans l'étude

Dans la série d'expériences faisant l'objet du présent chapitre, nous avons élaboré un protocole pour extraire les cellules mononuclées des amygdales et en purifier les lymphocytes B (figure 21). Entre autres choses, nous avons voulu mimer l'environnement dans lequel sont produites les immunoglobulines et avons donc incubé les lymphocytes B purifiés avec de l'IL-4 et de l'IL-10, deux cytokines permettant la sécrétion d'IgG (voir la section 6.1). Les lymphocytes T CD4+ ont pour leur part été activés avec de la PHA-L et de l'IL-2.

5.2 L'étude

L'étude dont il est question dans ce chapitre a été publiée dans la revue *Journal of Virology* (2007) 81(11) 5872-5881 et la version finale de cette publication fait l'objet de la section 5.1.2.

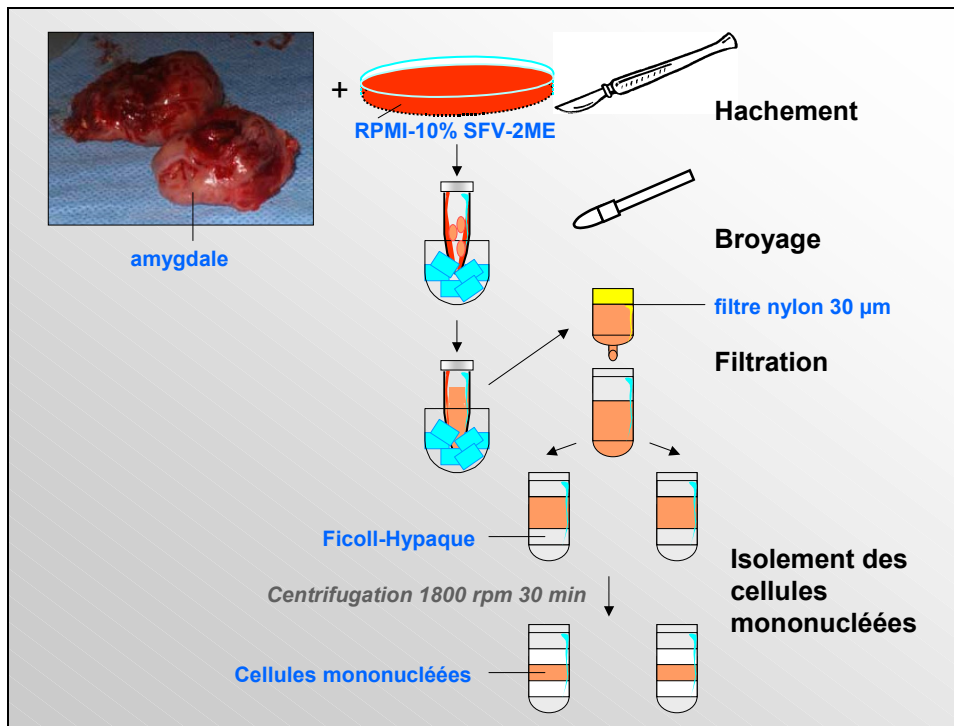


Figure 21. Schéma du protocole de purification des cellules mononucléées d'amygdales par G. Martin, Université Laval.

5.2.1 Résumé de l'article

Une activation anormale des lymphocytes B est souvent observée chez les personnes infectées par le VIH-1. Pourtant, nous connaissons encore peu de choses du ou des mécanisme(s) responsable(s) de ce dysfonctionnement. Étant donné que nous avons récemment montré que CD40L, un ligand de CD40, est inséré dans les particules de VIH-1 émergeant de cellules, nous avons émis l'hypothèse que le contact entre la molécule CD40L d'origine cellulaire ancrée dans le virus et le récepteur CD40 à la surface des lymphocytes B puisse résulter en l'activation de ce type cellulaire. De fait, nous rapportons que les virus portant la molécule CD40L d'origine cellulaire, et non les virions isogéniques dépourvus de CD40L, peuvent induire les lymphocytes B à produire des immunoglobulines G et de l'IL-6. De telles entités virales ont aussi provoqué l'adhésion homotypique des

lymphocytes B. Au niveau intracellulaire, ces événements ont été mis en parallèle avec la translocation au noyau du facteur de transcription ubiquitaire NF- κ B. La présence de CD40L provenant de l'hôte dans l'enveloppe du VIH-1 a résulté en une augmentation de l'attachement du virus aux lymphocytes B et en un transfert plus efficace du virus de ces cellules aux lymphocytes T CD4⁺ autologues. Les effets ci-haut mentionnés ont été observés même en absence des glycoprotéines de l'enveloppe codées par le virus. L'ensemble des données recueillies de cette série d'expériences suggère que la molécule CD40L de l'hôte, présente sur le VIH-1, joue un rôle dans l'apparition des anomalies propres aux lymphocytes B observées chez les individus infectés.

5.2.2 Article

Human Immunodeficiency Virus Type 1-Associated CD40 Ligand Transactivates B lymphocytes and promotes infection of CD4⁺ T cells

Geneviève Martin, Jocelyn Roy, Corinne Barat, Michel Ouellet,

Caroline Gilbert, and Michel J. Tremblay*

*Research Center in Infectious Diseases, CHUL Research Center,
and Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada*

*Corresponding author. Mailing address:

Laboratory of Human Immuno-Retrovirology

Research Center in Infectious Diseases, RC709

CHUL Research Center

2705 Laurier Blvd.

Quebec (QC), Canada, G1V 4G2

Phone: (418) 654-2705. Fax: (418) 654-2212

E-mail: michel.j.tremblay@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

Abnormal activation of B lymphocytes is a feature commonly seen in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected persons. However, the mechanism(s) responsible for this dysfunction is still poorly understood. Having recently shown that CD40L, the ligand for CD40, is inserted within emerging HIV-1 particles, we hypothesized that the contact between virus-anchored host CD40L and CD40 on the surface of B lymphocytes might result in activation of this cell type. We report here that CD40L-bearing viruses, but not isogenic virions lacking host-derived CD40L, can induce immunoglobulin G and interleukin-6 production. Furthermore, such viral entities were found to induce B-cell homotypic adhesion. These effects were paralleled at the intracellular level by nuclear translocation of the ubiquitous transcription factor NF- κ B. The presence of host-derived CD40L within virions resulted in an increased virus attachment to B cells and a more-efficient B-cell-mediated transfer of HIV-1 to autologous CD4⁺ T lymphocytes. All the above processes were independent of the virus-encoded envelope glycoproteins. Altogether the data gathered from this series of investigations suggest that the incorporation of host-encoded CD40L in HIV-1 is likely to play a role in B-cell abnormalities that are seen in infected individuals.

INTRODUCTION

Over the past few years, studies on a rare immunodeficiency disease named X-linked hyper-immunoglobulin syndrome revealed the importance of interactions between CD40L and CD40 in the normal immune response (reviewed in (37)). The CD40L molecule is a type II membrane glycoprotein belonging to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily that is expressed mainly in activated CD4⁺ T lymphocytes (4). It binds to and trimerizes CD40 (69), a type I-membrane glycoprotein of the TNF-receptor superfamily which is expressed on B lymphocytes from diverse sources, such as tonsils (5). The degree of multimerization of CD40 regulates the strength of the intracellular signal transduction events (29, 56, 70), resulting, notably, in the activation and differentiation of B cells (24). This activation leads to homotypic aggregation of these cells and the secretion of a number of cytokines, including interleukin-6 (IL-6), IL-10, IL-12 and TNF- α (reviewed in (9)). The differentiation of B lymphocytes into Ig-secreting plasma cells is actually the final step of the isotype switching process (27). In the case of IgG, their synthesis normally occurs following stimulation of CD40 and IL-4 receptor, leading to NF- κ B- and signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6)-dependent transcription of germ line genes and subsequent DNA recombination to C γ genes (2, 62).

Although B lymphocytes are not considered to be a cellular reservoir for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), this cell type is afflicted by a wide spectrum of abnormalities in the setting of HIV-1 infection. For example, it has been reported that B cells display a hyperactivation state in the presence of active viral replication which translates into hypergammaglobulinemia *in vivo* (reviewed in (58)) and the spontaneous secretion, especially of the IgG subclass, of Ig in culture (33, 38, 46, 48). Other B-cell dysfunctions include an increased expression of cell surface activation markers (41), the appearance of B-cell subpopulations characteristic of cellular activation and terminal differentiation (19, 50), augmented B-cell turnover (18), and an increased incidence of B-cell malignancies (45). With respect to the appearance of hypergammaglobulinemia, this disorder is characterized by the production of low-affinity antibodies and antibodies

directed against various self-antigens (19), which are both believed to be due to ongoing viral replication (63). Indeed, viremia has been found to be associated with abnormal levels of IgG in sera of HIV-1-infected patients (50, 51). In addition, in many patients, hypergammaglobulinemia appears as early as a few months following primary infection (21, 52). Interestingly, this disorder is seen even before the appearance of quantitative and functional defects in CD4⁺ T cells (47, 66).

Given that HIV-1 pathogenesis is associated with the appearance of numerous B-cell defects and considering that we recently demonstrated that CD40L constitutes one of the host cell-derived proteins incorporated into emerging HIV-1 particles (44), we tested the possibility that interactions between virus-associated host CD40L and CD40 on the surface of B lymphocytes might result in cellular activation. The activation status of B cells was assessed by monitoring NF- κ B nuclear translocation, cytokine production, the secretion of IgG, and the induction of cell-to-cell adhesion. Moreover, because B lymphocytes continually percolate through peripheral lymphoid tissues, where they establish an intimate contact with activated CD4⁺ T lymphocytes, we also assessed whether the presence of host-derived CD40L within mature HIV-1 particles could result in a more-efficient B-cell-dependent spreading of the virus to CD4⁺ T cells.

MATERIALS AND METHODS

Cells. Human tonsils removed during routine tonsillectomy were received within a few hours of excision. The tonsillar tissue was mechanically disrupted in cold RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin and 50 µM 2-mercaptoethanol [RPMI 1640-10% FCS-2ME]. The resulting cellular suspension was filtered through a 30-µm mesh nylon filter and subjected to a Ficoll-Hypaque gradient for the isolation of mononuclear cells. Thereafter, autologous B cells and CD4⁺ T lymphocytes were negatively separated as described previously (57). B lymphocytes were purified using the EasySep human B-cell enrichment cocktail (StemCell Technologies), resulting in a B-cell population almost free of CD4⁺ T lymphocytes, as assessed by flow cytometry (i.e., <1% CD4⁺ T cells), whereas CD4⁺ T lymphocytes were isolated with the EasySep human CD4⁺ T-cell enrichment cocktail (StemCell Technologies). Before initiation of virus transmission assays, B and T lymphocytes were maintained separately in RPMI 1640-10% FCS-2ME medium. Human embryonic kidney 293T cells were cultured in complete Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) (i.e., DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin G, and 100 µg/ml streptomycin).

Plasmids and antibodies. pNL4-3 is a full-length infectious molecular clone of HIV-1 (X4-tropic) (1) that was obtained through the AIDS Repository Reagent Program (Germantown, MD). pNL4-3balenv was created by replacing the *env* gene of NL4-3 with that of the R5-tropic strain Bal (kindly provided by R.J. Pomerantz, Thomas Jefferson University) (20). The envelope (Env)-deficient plasmid pNL4-3 Env- was a generous gift of D.E. Ott (National Cancer Institute) (53). The vector coding for human CD40L (i.e., pcDNA3.1-CD40L) was provided by R. Kornbluth (University of California San Diego) (36). The anti-CD40 hybridoma G28.5 (IgG1) (15) and the anti-CD40L hybridoma 5c8 (IgG2a) (39) were generously provided by W. Mourad (Université de Montréal). The antibody against the NF-κB p50 subunit was purchased from Santa Cruz while the antibody specific for the anti-NF-κB p65 subunit was kindly given by N. Rice (National Cancer Institute-Frederick Cancer Research and Development Center) (60). Antibodies from these

hybridomas were purified with a HiTrap Protein G affinity column by following the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences AB). For purposes of the virus capture assay, biotinylation of the tested antibodies was performed using EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce).

Virus production and capture assay. Progeny viruses were produced by calcium phosphate transfection of 293T cells as previously described (23). It should be noted that 293T cells do not constitutively express CD40L (data not shown). Briefly, 293T cells were cotransfected with a plasmid encoding for the human CD40L molecule (i.e., pcDNA3.1-CD40L) and one of the following molecular clones of HIV-1: a plasmid coding for wild type NL4-3 particles (i.e., pNL4-3) (virus stock called NL4-3/CD40L), a vector coding for R5-tropic Bal Env glycoproteins inserted within the NL4-3 backbone (i.e., pNL4-3balenv/CD40L) (virus stock called NL4-3balenv/CD40L), or a plasmid coding for Env-deficient NL4-3 viruses (i.e., pNL4-3 Env-) (virus stock called NL4-3 Env-/CD40L). Viruses lacking host CD40L were made by transfection of 293T cells only with one of the listed NL4-3 constructs: wild type NL4-3 (virus stock called NL4-3/null) and NL4-3balenv (virus stock called NL4-3balenv/null). Controls consisted of 293T cells transfected with pcDNA3.1-CD40L alone (called Mock/CD40L). Supernatants from such transfected 293T cells were filtered through a 0.45- μ m cellulose acetate membrane (Millipore Corporation). To eliminate free p24, each supernatant was ultrafiltrated in CentriconPlus-20 Biomax-100 filter devices (Millipore Corporation). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test developed in our laboratory was used to estimate the amount of p24 in all virus stocks (12). For all virus stocks, the presence or absence of the CD40L molecule was confirmed by performing our virus capture assay using an initial virus input of 1 ng of p24 as we described previously (44).

IgG production assay. Purified B lymphocytes (1×10^6) were cultured in 1 ml of RPMI 1640-10% FCS-2ME containing 400 U/ml of human recombinant IL-4 (R&D Systems) (25) and 50 ng/ml of human recombinant IL-10 (PeproTech Inc.) (14, 16). Thereafter, such B cells were incubated at 37°C either with medium alone, Mock/CD40L preparation (always added in same volume as the less-concentrated viral stock), anti-CD40 (clone G28.5) (1 μ g/ml), or one of the studied virus stocks (standardized in terms of p24 contents /

200 ng of p24). In some conditions, wedelolactone (BIOMOL International LP), an inhibitor of the I κ B kinase complex, was added at 10 μ M along with virus stocks. Supernatants were harvested at 5 and 12 days following initiation of the culture, frozen and kept at -20°C until assayed for the IgG content by ELISA (Bethyl Inc.).

Cellular adhesion and cytokine production. Purified B lymphocytes (1×10^6) were cultured using conditions similar to those for IgG production, either with medium alone, Mock/CD40L, anti-CD40 (clone G28.5) (1 μ g/ml), or one of the tested virus preparations (200 ng of p24). Photographs of cultures were taken after 72 h, and supernatants were harvested and then frozen and kept at -20°C until assayed for their cytokine content. The simultaneous evaluation of multiple cytokines/chemokines was achieved through the use of the Luminex 100 instrument and the Beadlyte human multicytokine detection system 4 (Upstate), which is a multiplex assay kit used for measuring 12 different cytokines (i.e., IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- α , gamma interferon, MCP-1 and RANTES). Quantitative measurement of IL-6 was also carried out with a regular ELISA test (eBioscience).

Preparation of nuclear extracts and EMSA. Purified B lymphocytes were incubated in RPMI 1640-10% FCS-2ME for 30 or 60 min at 37°C either with medium alone, Mock/CD40L, phorbol myristate acetate (20 ng/ml) and ionomycin (1 μ M) (both from Sigma), or some of the studied virus stocks (i.e., NL4-3/null or NL4-3/CD40L at a final concentration of 10 or 30 ng of p24 per 1×10^5 B cells). Treatment of B cells was terminated by addition of cold phosphate-buffered saline (PBS), and nuclear extracts were prepared as previously described (64). Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed by incubating 10 μ g of nuclear proteins in 20 μ l of binding buffer (10 mM HEPES [pH 7.9], 4% glycerol, 1% Ficoll, 25 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM EDTA, 25 mM NaCl) containing 2 μ g of poly(dI-dC), 10 μ g of nuclease-free bovine serum albumin fraction V, and 0.8 ng of a γ -³²P-labeled double-stranded DNA oligonucleotide for 20 min at room temperature. The following double-stranded DNA oligonucleotides were used as probes and/or competitors: the consensus NF- κ B binding site (5'-ATGTGAGGGGACTTTCCAGGC-3'), the consensus SP1 binding site (5'-ATTTCGATCGGGGCGGGGCGAG-3'), and the consensus binding site for Oct-2A

(5'-GGAGTATCCAGCTCCGTAGCATGCAAATCCTCTGG-3') (for nonspecific competition). Cold competition assays were carried out by adding a 100-fold molar excess of an unlabeled double-stranded DNA oligonucleotide simultaneously with the labeled probe. Supershift assays were performed by preincubating nuclear extracts with 1 μ g of an antibody against NF- κ B p50 or NF- κ B p65 for 30 min on ice prior to the addition of the binding buffer containing the labeled probe. DNA-protein complexes were resolved from unbound labeled DNA by electrophoresis in native 4% (w/v) polyacrylamide gels. Then, the gels were dried, exposed, and autoradiographed.

Virus binding assay. Purified B lymphocytes (3.5×10^6) were incubated at 37°C for 1 h in 1 ml of RPMI 1640-10% FCS-2ME containing NL4-3/null, NL4-3/CD40L, NL4-3balenv/null, or NL4-3balenv/CD40L (350 ng of p24). In some cases, cells were also incubated with NL4-3/CD40L or NL4-3balenv/CD40L in combination with 10 μ g/ml of a trimeric and soluble form of CD40L (sCD40L) (CEDARLANE Laboratories Ltd). The cells were extensively washed with PBS and resuspended in 350 μ l of a lysis buffer (PBS-0.05% Tween-2.5% Triton X-100-2.5% trypan blue). The p24 content was determined by ELISA.

Virus entry assay. Purified B lymphocytes (3.5×10^6) were incubated at 37°C for 1 h in 1 ml of RPMI 1640-10% FCS-2ME containing NL4-3/null or NL4-3/CD40L (350 ng of p24). Next, the cells were washed with PBS and exposed to trypsin for 5 min to remove uninternalized viruses. Next, RPMI 1640-10% FCS-2ME was added, and then cells were washed in PBS and resuspended in 350 μ l of a lysis buffer (PBS-0.05% Tween-2.5% Triton X-100-2.5% trypan blue). The amount of internalized viruses was estimated by measuring the p24 content.

Virus transmission assay. Purified B lymphocytes (1.5×10^5) were initially pulsed with NL4-3/null, NL4-3/CD40L, NL4-3balenv/null, or NL4-3balenv/CD40L (10 ng of p24) for 1 h at 37°C in 100 μ l of RPMI 1640-10% FCS-2ME. In some experiments, cells were also incubated with NL4-3/CD40L or NL4-3balenv/CD40L used in combination with 10 μ g/ml of sCD40L (CEDARLANE Laboratories Ltd). Next, the cells were extensively washed with PBS and then co-cultured with phytohemagglutinin (PHA)/IL-2-stimulated autologous

CD4⁺ T lymphocytes (1×10^5). Supernatants were harvested at days 4, 6 and 8 post-infection to quantify the p24 content.

Statistical analysis. The means of variables of matched pairs were compared using Student's *t*-test with Microsoft Excel. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Incorporation of host-derived CD40L in HIV-1 is independent of Env glycoproteins.

Although it is clear that CD40L is acquired by R5- and X4-tropic variants of HIV-1 once expanded in natural cellular reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured *ex vivo* (44), there is no information regarding the molecular mechanism responsible for the insertion of this cell surface molecule within viruses or on the potential role of this host-derived protein in HIV-1 biology. It was previously reported that incorporation of host HLA-DR glycoproteins within HIV-1 is independent of virus-encoded Env glycoproteins (43). Therefore, we initially investigated whether the acquisition of CD40L by emerging virions was independent of Env as well. To this end, virions were produced using a transient transfection and expression system based on cotransfection of 293T cells with an expression vector coding for human CD40L and an infectious molecular clone of HIV-1 (i.e., wild type NL4-3 or Env-deficient NL4-3). The physical presence of host-derived CD40L within mature HIV-1 particles was assessed by a virus capture assay using beads coated with anti-CD40L antibodies. It should be noted that 293T cells were transfected with an amount of the CD40L expression vector resulting in a surface expression level of CD40L comparable to what is seen in primary human CD4⁺ T lymphocytes following stimulation through the T-cell receptor and CD28 co-stimulatory molecule (data not shown). Data from the capture test performed on virus preparations indicate that CD40L is efficiently acquired by HIV-1 and that this process is independent of viral Env glycoproteins (Fig. 1). The estimated recovery rates for CD40L-bearing virions either bearing or lacking Env glycoproteins varied between 14 and 18%. Similar observations were made when using virus stocks obtained from two independent transfection protocols (data not shown).

Virus-anchored host CD40L promotes IgG production. We next studied the putative biological function(s) of such virus-associated CD40L molecules. Since the majority of antibodies detected in HIV-1-associated B-cell abnormalities are IgGs, we studied the modulatory effect of virus-anchored host CD40L on production of this class of Ig by B cells purified from human tonsils. We found that incubation of purified B lymphocytes

from three different donors with CD40L-bearing NL4-3 particles resulted in a statistically significant induction of IgG synthesis, a phenomenon that was not seen when using isogenic virions devoid of CD40L (Fig. 2A). Similar findings were made when using R5-tropic viruses (i.e., NL4-3balenv) (Fig. 2B). It is important to emphasize that levels of IgG mediated by CD40L-bearing virions were sometimes higher than the values obtained with a monoclonal anti-CD40 antibody (i.e., G28.5), which was used as a positive control. The production of IgG by NL4-3/CD40L and NL4-3balenv/CD40L was completely abolished upon the treatment of B cells with wedelolactone, an inhibitor of the I κ B kinase complex (data not shown). This suggests that the virus-mediated induction of IgG synthesis was relying on NF- κ B activation (see below). Experiments performed with Env-deficient viruses bearing host-derived CD40L confirmed that Env glycoproteins are not required to permit acquisition of this cell membrane constituent by HIV-1 (Fig. 2C). It also demonstrates that CD40L is still functional on virions devoid of Env.

CD40L-bearing virions trigger IL-6 secretion and homotypic cell-to-cell adhesion. The pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α are known to be produced by B cells isolated from HIV-1-infected persons (32). Thus, we evaluated secretion of several soluble factors following the exposure of B lymphocytes to viruses either lacking or bearing host-derived CD40L. We used the Luminex 100 technology to screen for the production of 12 different cytokines/chemokines, including those mentioned above, in cell-free supernatants from B cells incubated with isogenic NL4-3-based particles. High levels of IL-4 and IL-10 were detected in the tested samples, and no increase in the production of these two cytokines could be observed following treatment with the tested virus preparations (i.e., NL4-3/null, NL4-3/CD40L, NL4-3balenv/null and NL4-3balenv/CD40L) or anti-CD40 antibody (Fig. 3A). Although a basal level of IL-6 was measured in B cells exposed to supernatants from 293T cells transiently transfected with the CD40L expression vector (i.e., Mock/CD40L), a weak but statistically significant increase in IL-6 production was detected with CD40L-bearing virions (both NL4-3/CD40L and NL4-3balenv/CD40L) but not with isogenic viruses lacking host-derived CD40L (i.e., NL4-3/null and NL4-3balenv/null). The higher secretion of IL-6 upon exposure to CD40L-bearing NL4-3 particles was confirmed when a commercial human IL-6 ELISA kit was used (Fig. 3B). A comparable virus-mediated induction of IL-6 production was seen when using CD40L-bearing NL4-3balenv (data not

shown). Env-deficient viruses that bear host-derived CD40L were also effective at mediating production of IL-6 from purified B cells (Fig. 3C). Again, the monoclonal anti-CD40 antibody G28.5 was used as a positive control in this series of investigations.

The activation of B lymphocytes can also be monitored by assessing homotypic aggregation (6, 26, 31). Microphotographs of purified B cells that were exposed to progeny virus either lacking or bearing host CD40L were taken. Large cell clusters were found only in B cells incubated with CD40L-bearing R5 virions and not with viruses devoid of host-derived CD40L (Fig. 4A). Comparable findings were obtained when B cells were exposed to CD40L-bearing X4 viruses as well as to Env-deficient particles that carry host CD40L on their surface (Fig. 4B).

CD40L-bearing viruses drive nuclear translocation of NF- κ B p50 homodimer and p50/p65 heterodimer. In the experiments described below, we attempted to characterize the intracellular events occurring after CD40 ligation on B lymphocytes by virus-associated CD40L. To this end, we performed mobility shift assays and found that NL4-3 particles bearing host-derived CD40L, but not viruses lacking CD40L, induced the nuclear translocation of NF- κ B in B lymphocytes (Fig. 5A). As expected, a basal level of nuclear NF- κ B was found in these cells (7). Competition with a 100-fold excess of a specific (i.e., cold NF- κ B) or nonspecific (i.e., cold Oct-2A) oligonucleotide confirmed the specificity of the NF- κ B binding complex. Moreover, an SP1-labeled probe was used to test the nonspecific binding, and no signal was detected (data not shown). Supershift experiments carried out with specific antibodies revealed that the NF- κ B binding complex induced by the attachment of CD40L-bearing HIV-1 particles to the surface of purified B lymphocytes was composed of p50/p50 homodimers and p50/p65 heterodimers (Fig. 5B). Interestingly, a dose-dependent increase in the activation of NF- κ B was seen when using increasing doses of CD40L-bearing virions (Fig. 5C).

CD40L enhances HIV-1 binding to B lymphocytes and augments infection of autologous CD4⁺ T cells *in trans*. Finally, we tested whether the additional CD40L/CD40 interaction could translate into a more-efficient capture and transfer by B cells of HIV-1 to autologous CD4⁺ T lymphocytes. As illustrated in Fig. 6, the attachment of CD40L-bearing

NL4-3 particles onto B lymphocytes was increased compared to the attachment of isogenic virions devoid of this cell surface constituent and this enhanced virus adsorption was abrogated upon a treatment with sCD40L. Moreover, a more-significant HIV-1 transfer was seen when using CD40L-bearing virions than with progeny viruses lacking host-derived CD40L (Fig. 7). The more-efficient transmission of CD40L-bearing virions was abrogated upon the addition of sCD40L.

Virus entry assays performed with purified B lymphocytes that were first exposed to the tested virus preparations and next treated with trypsin to remove uninternalized virions indicated that virions do not enter such cells and remain on the cell surface (data not shown). In addition, p24 levels measured until 14 days following acute infection of purified B cells with viruses either lacking or bearing host-derived CD40L remained below the detection limit of our p24 test (data not shown). This indicates that virus replication in the B-cell-T-cell cocultures was not a result of direct, *cis* infection of B cells by HIV-1. Comparable findings were made when transfer studies were carried out with the R5-tropic NL4-3balenv variant, although the levels of HIV-1 p24 were lower than with the X4-tropic NL4-3 strain (data not shown). Taken together, our data indicate that the physical presence of host-derived CD40L onto the exterior of virions resulted in a more-efficient *trans* infection of autologous CD4⁺ T lymphocytes when using B cells as transmitters.

DISCUSSION

While working on the mechanistic aspects of the process of incorporation of host molecules within emerging HIV-1 particles, we recently provided evidence that HIV-1 acquires HLA-DR independently of Env (43). Here, we provide evidence that the virus-encoded Env glycoproteins are also not required for the incorporation of host-derived CD40L within HIV-1 particles. Although the exact process by which CD40L is acquired by HIV-1 remains to be more fully elucidated, we demonstrate that CD40L-bearing virions can promote homotypic aggregation of B lymphocytes isolated from human tonsils and induce secretion of IgG and IL-6 from such cells. Interestingly, none of the observed virus-anchored host CD40L-mediated effects was attributable to HIV-1 Env. At the intracellular level, a rapid nuclear translocation of NF- κ B was detected following exposure of tonsillar B cells to virions harboring host CD40L. In addition, we show that virus-associated CD40L increases the attachment of viral particles to B lymphocytes and facilitates their eventual transfer to autologous CD4⁺ T lymphocytes, thus enhancing virus propagation. In the past, a number of studies have highlighted the potential role that such host molecules might have in the pathogenesis of AIDS (reviewed in (35)). However, it is, to the best of our knowledge, the first study connecting some of the numerous B-cell abnormalities seen in infected patients and a virus-anchored host cell membrane component.

Our results also indicate that CD40L, once embedded within HIV-1, triggers IgG synthesis in primary B lymphocytes. The amounts of IgG we observed varied among donors, which is perfectly in line with the results of a previous study (22). It can be proposed, based on the current observations and the previously reported presence of host CD40L in clinical isolates of HIV-1 produced in physiologic cell systems (44), that the hypergammaglobulinemia documented in HIV-1-infected patients might be linked to some extent to insertion of host-derived CD40L within HIV-1. Interestingly, the hypergammaglobulinemia state seen in C57BL/6 mice infected with the murine retrovirus LP-BM5 (also called the murine AIDS model) was alleviated after treatment with anti-CD40L monoclonal antibodies (28). Moreover our data indicate that Env-deficient HIV-1 particles that bear CD40L are also efficient at inducing IgG production, an observation that

contrasts with the previously reported gp120-mediated IgG production by B lymphocytes (30, 61). Differences in experimental methodologies may account for the apparent discrepancy (e.g., purified recombinant gp120 versus fully competent HIV-1 particles).

In addition to the hypergammaglobulinemia syndrome, HIV-1-infected patients display a more-important production of some cytokines including IL-1, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 and IL-12, than uninfected individuals (3, 32, 61). More particularly, an increase in IL-6 secretion at the early stages of infection (8, 13) and its spontaneous production by B lymphocytes from HIV-1-infected individuals (32) were previously described. Thus, the augmentation in IL-6 synthesis that we observed in B lymphocyte cultures exposed to CD40L-bearing HIV-1 particles represents further evidence of the possible link that can be made between virus-anchored host CD40L and the B-cell dysfunction seen in advanced HIV-1 diseases. A previous study performed by Boue and colleagues has demonstrated that HIV-1 alone does not induce IL-6 secretion by B cells isolated from healthy donors (10). Virus preparations used in this work were produced in chronically infected CEM, an established T-cell line that does not constitutively express CD40L. Thus, the inability of CEM-derived HIV-1 particles to drive IL-6 production in B cells might be due to the absence of CD40L in the viral particle. It is noteworthy that IgG production seems to be dependent on IL-6, since a reduction in IgG occurs after treatment of HIV-1-infected individuals with an anti-IL-6 monoclonal antibody (42).

The homotypic B-cell adhesion that is seen in the presence of IL-4 and CD40L-bearing HIV-1 particles is in line with a report showing the formation of homotypic aggregates upon costimulation of the B-cell receptor and CD40 on the surface of B lymphocytes from HIV-1-infected persons (17). Whether the cellular aggregation we report here depends on the LFA-1/ICAM-1 interaction after the stimulation of human B lymphocytes with the monoclonal antibody G28.5, as described by Barrett and co-workers (6), is, however, unknown.

The main transcription factor triggered by CD40 is NF- κ B (54, 55, 67, 72), which binds to the promoter region of many B-lymphocyte genes, including those involved in the synthesis of IgG (34) and the expression of IL-6 (40, 65) and ICAM-1 (71). It has been previously reported that CD40L and IL-4 act in a concerted manner to drive the human Ig heavy chain

S gamma 3 region through the induction of p50/p65, p50/c-Rel, and p50/p50 NF- κ B complexes and STAT-6 (62). We found that CD40L-bearing virions can strongly induce NF- κ B in purified B lymphocytes. Moreover, the NF- κ B activation that is seen following a contact with CD40L-bearing virions is comparable to the activation resulting from stimulation of resting tonsillar B cells with an anti-CD40 antibody (7). Our data also indicate that exposure of B cells to CD40L-bearing HIV-1 particles leads to the formation of complexes that include p50/p50 homodimers and p50/p65 heterodimers, as indicated by the supershifts in EMSA results. These observations are in agreement with the results of previous studies performed with B cells that analyzed the signal transduction events triggered by cross-linking of the CD40 receptor (7, 59). It can thus be hypothesized that the detected IgG and IL-6 production is associated with the induction of NF- κ B that is resulting from attachment of CD40L-bearing virions onto the surface of CD40-positive B lymphocytes.

Concerning the phenomenon of HIV-1 transmission within an infected individual, it is now postulated that viral particles bound to cells not considered to be natural cellular reservoirs are very efficiently transferred following a contact with more-susceptible target cells, such as CD4⁺ T cells. Interestingly, our group has demonstrated recently that, in some cases, HIV-1 transmission is enhanced upon the incorporation of host-derived ICAM-1 (11). Here, we report another situation where virus transfer from a cell type not considered to be a natural reservoir of HIV-1 (namely, B lymphocytes) is augmented by a molecule of cellular origin incorporated within HIV-1 (i.e., CD40L). Of particular interest, we used B lymphocytes and CD4⁺ T cells that were isolated from human tonsils, a lymphoid tissue where these lymphocytes normally interact with each other. The physiological significance of the higher transmission of CD40L-bearing virions is confirmed by the idea that CD40 is expressed on B cells at all stages of development (reviewed in (68)). Thus, the vast majority of B cells have the potential to capture HIV-1 particles that bear host-derived CD40L and transmit such viruses to CD4⁺ T cells once they are located in lymphoid tissues. In support of this hypothetical working model, Moir and co-workers described a model of transmission of B-cell-associated HIV-1 from chronically infected patients to activated CD4⁺ T lymphocytes from uninfected donors through an interaction between

CD21 on B cells and complement breakdown product C3 attached to the surface of HIV-1 immune complexes (49).

In conclusion, our data indicate that virus-anchored host CD40L molecules are still functional once located on virions and can account for part of the described B-cell perturbation associated with HIV-1 infection. Our results thus suggest that the host-derived cell surface protein CD40L, once incorporated within emerging HIV-1 particles, might play a previously unrecognized role in some of the demonstrated B-cell deficiencies seen in HIV-1-infected patients, such as aberrant activation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Maurice Dufour for flow cytometry analyses and Sylvie Méthot for editorial assistance. This study was made possible through a grant (HOP-14438) to M.J.T. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Research Program. This work was performed by G. Martin in partial fulfillment of a Ph.D. degree from the Microbiology-Immunology Program, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada. G.M. and J.R. each hold a CIHR Doctoral Award, C.G. holds a CIHR Fellowship, and M.J.T. is the recipient of a senior Canada research chair in human immunetrovirology.

REFERENCES

1. 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* 59:284-91.
2. Agresti, A., and D. Vercelli. 2002. c-Rel is a selective activator of a novel IL-4/CD40 responsive element in the human Ig gamma4 germline promoter. *Mol Immunol* 38:849-59.
3. Alonso, K., P. Pontiggia, R. Medenica, and S. Rizzo. 1997. Cytokine patterns in adults with AIDS. *Immunol Invest* 26:341-50.
4. Aruffo, A., M. Farrington, D. Hollenbaugh, X. Li, A. Milatovich, S. Nonoyama, J. Bajorath, L. S. Grosmaire, R. Stenkamp, M. Neubauer, and et al. 1993. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 72:291-300.
5. Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 12:881-922.
6. Barrett, T. B., G. Shu, and E. A. Clark. 1991. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J Immunol* 146:1722-9.
7. Berberich, I., G. L. Shu, and E. A. Clark. 1994. Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 153:4357-66.
8. Birx, D. L., R. R. Redfield, K. Tencer, A. Fowler, D. S. Burke, and G. Tosato. 1990. Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. *Blood* 76:2303-10.
9. Bishop, G. A., and B. S. Hostager. 2003. The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:297-309.

10. Boue, F., C. Wallon, C. Goujard, F. Barre-Sinoussi, P. Galanaud, and J. F. Delfraissy. 1992. HIV induces IL-6 production by human B lymphocytes. Role of IL-4. *J Immunol* 148:3761-7.
11. Bounou, S., J. F. Giguere, R. Cantin, C. Gilbert, M. Imbeault, G. Martin, and M. J. Tremblay. 2004. The importance of virus-associated host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 dissemination depends on the cellular context. *Faseb J* 18:1294-6.
12. Bounou, S., J. E. Leclerc, and M. J. Tremblay. 2002. Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *J Virol* 76:1004-14.
13. Breen, E. C., A. R. Rezai, K. Nakajima, G. N. Beall, R. T. Mitsuyasu, T. Hirano, T. Kishimoto, and O. Martinez-Maza. 1990. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J Immunol* 144:480-4.
14. Briere, F., C. Servet-Delprat, J. M. Bridon, J. M. Saint-Remy, and J. Banchereau. 1994. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J Exp Med* 179:757-62.
15. Clark, E. A., T. C. Yip, J. A. Ledbetter, H. Yukawa, H. Kikutani, T. Kishimoto, and M. H. Ng. 1988. CDw40 and BLCA-specific monoclonal antibodies detect two distinct molecules which transmit progression signals to human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 18:451-457.
16. Cognasse, F., S. Acquart, L. Beniguel, O. Sabido, P. Chavarin, C. Genin, and O. Garraud. 2005. Differential production of immunoglobulin classes and subclasses by mucosal-type human B-lymphocytes exposed in vitro to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Chem Lab Med* 43:22-31.

17. Conge, A. M., K. Tarte, J. Reynes, M. Segondy, J. Gerfaux, M. Zembala, and J. P. Vendrell. 1998. Impairment of B-lymphocyte differentiation induced by dual triggering of the B-cell antigen receptor and CD40 in advanced HIV-1-disease. *Aids* 12:1437-49.
18. De Boer, R. J., H. Mohri, D. D. Ho, and A. S. Perelson. 2003. Turnover rates of B cells, T cells, and NK cells in simian immunodeficiency virus-infected and uninfected rhesus macaques. *J Immunol* 170:2479-87.
19. De Milito, A., A. Nilsson, K. Titanji, R. Thorstensson, E. Reizenstein, M. Narita, S. Grutzmeier, A. Sonnerborg, and F. Chiodi. 2004. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* 103:2180-6.
20. 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.
21. Fauci, A. S., A. M. Macher, D. L. Longo, H. C. Lane, A. H. Rook, H. Masur, and E. P. Gelmann. 1984. NIH conference. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* 100:92-106.
22. Fear, D. J., N. McCloskey, B. O'Connor, G. Felsenfeld, and H. J. Gould. 2004. Transcription of Ig germline genes in single human B cells and the role of cytokines in isotype determination. *J Immunol* 173:4529-38.
23. Fortin, J. F., R. Cantin, G. Lamontagne, and M. Tremblay. 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* 71:3588-96.
24. Foy, T. M., D. M. Shepherd, F. H. Durie, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, and R. J. Noelle. 1993. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *J Exp Med* 178:1567-75.

25. Gascan, H., J. F. Gauchat, G. Aversa, P. Van Vlasselaer, and J. E. de Vries. 1991. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4⁺ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J Immunol* 147:8-13.
26. Gordon, J., M. J. Millsum, G. R. Guy, and J. A. Ledbetter. 1988. Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling. *J Immunol* 140:1425-30.
27. Gould, H. J., R. L. Beavil, and D. Vercelli. 2000. IgE isotype determination: epsilon-germline gene transcription, DNA recombination and B-cell differentiation. *Br Med Bull* 56:908-24.
28. Green, K. A., K. M. Crassi, J. D. Laman, A. Schoneveld, R. R. Strawbridge, T. M. Foy, R. J. Noelle, and W. R. Green. 1996. Antibody to the ligand for CD40 (gp39) inhibits murine AIDS-associated splenomegaly, hypergammaglobulinemia, and immunodeficiency in disease-susceptible C57BL/6 mice. *J Virol* 70:2569-75.
29. Haswell, L. E., M. J. Glennie, and A. Al-Shamkhani. 2001. Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154. *Eur J Immunol* 31:3094-100.
30. He, B., X. Qiao, P. J. Klasse, A. Chiu, A. Chadburn, D. M. Knowles, J. P. Moore, and A. Cerutti. 2006. HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol* 176:3931-41.
31. Kansas, G. S., and T. F. Tedder. 1991. Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *J Immunol* 147:4094-102.
32. Kehrl, J. H., P. Rieckmann, E. Kozlow, and A. S. Fauci. 1992. Lymphokine production by B cells from normal and HIV-infected individuals. *Ann N Y Acad Sci* 651:220-7.

33. Kekow, J., G. Hobusch, and W. L. Gross. 1988. Predominance of the IgG1 subclass in the hypergammaglobulinemia observed in pre-AIDS and AIDS. *Cancer Detect Prev* 12:211-6.
34. Kenter, A. L., R. Wuerffel, R. Sen, C. E. Jamieson, and G. V. Merkulov. 1993. Switch recombination breakpoints occur at nonrandom positions in the S gamma tandem repeat. *J Immunol* 151:4718-31.
35. Kolegraff, K., P. Bostik, and A. A. Ansari. 2006. Characterization and role of lentivirus-associated host proteins. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:252-63.
36. Kornbluth, R. S., K. Kee, and D. D. Richman. 1998. CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive beta-chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5205-10.
37. Kroczyk, R. A., D. Graf, D. Brugnani, S. Giliani, U. Korthuer, A. Ugazio, G. Senger, H. W. Mages, A. Villa, and L. D. Notarangelo. 1994. Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)". *Immunol Rev* 138:39-59.
38. Lane, H. C., H. Masur, L. C. Edgar, G. Whalen, A. H. Rook, and A. S. Fauci. 1983. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 309:453-8.
39. Lederman, S., M. J. Yellin, G. Inghirami, J. J. Lee, D. M. Knowles, and L. Chess. 1992. Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B-cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help. *J Immunol* 149:3817-26.
40. Libermann, T. A., and D. Baltimore. 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10:2327-34.
41. Malaspina, A., S. Moir, S. Kottlil, C. W. Hallahan, L. A. Ehler, S. Liu, M. A. Planta, T. W. Chun, and A. S. Fauci. 2003. Deleterious effect of HIV-1 plasma viremia on B cell costimulatory function. *J Immunol* 170:5965-72.

42. Marfaing-Koka, A., J. T. Aubin, L. Grangeot-Keros, A. Portier, C. Benattar, D. Merrien, H. Agut, P. Aucouturier, B. Autran, J. Wijdenes, and et al. 1996. In vivo role of IL-6 on the viral load and on immunological abnormalities of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 11:59-68.
43. Martin, G., Y. Beausejour, J. Thibodeau, and M. J. Tremblay. 2005. Envelope glycoproteins are dispensable for insertion of host HLA-DR molecules within nascent human immunodeficiency virus type 1 particles. *Virology* 335:286-90.
44. Martin, G., and M. J. Tremblay. 2004. HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L, and CD86 are incorporated to a similar degree into clinical human immunodeficiency virus type 1 variants expanded in natural reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured ex vivo. *Clin Immunol* 111:275-85.
45. Martinez-Maza, O., and E. C. Breen. 2002. B-cell activation and lymphoma in patients with HIV. *Curr Opin Oncol* 14:528-32.
46. Martinez-Maza, O., E. Crabb, R. T. Mitsuyasu, J. L. Fahey, and J. V. Giorgi. 1987. Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity. *J Immunol* 138:3720-4.
47. Miedema, F., A. J. Petit, F. G. Terpstra, J. K. Schattenkerk, F. de Wolf, B. J. Al, M. Roos, J. M. Lange, S. A. Danner, J. Goudsmit, and et al. 1988. Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 82:1908-14.
48. Mizuma, H., S. Zolla-Pazner, S. Litwin, W. el-Sadr, S. Sharpe, B. Zehr, S. Weiss, W. C. Saxinger, and M. Marmor. 1987. Serum IgD elevation is an early marker of B cell activation during infection with the human immunodeficiency viruses. *Clin Exp Immunol* 68:5-14.
49. Moir, S., A. Malaspina, Y. Li, T. W. Chun, T. Lowe, J. Adelsberger, M. Baseler, L. A. Ehler, S. Liu, R. T. Davey, Jr., J. A. Mican, and A. S. Fauci. 2000. B cells of HIV-1-

infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med* 192:637-46.

50. Moir, S., A. Malaspina, K. M. Ogwaro, E. T. Donoghue, C. W. Hallahan, L. A. Ehler, S. Liu, J. Adelsberger, R. Lapointe, P. Hwu, M. Baseler, J. M. Orenstein, T. W. Chun, J. A. Mican, and A. S. Fauci. 2001. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10362-7.

51. Morris, L., J. M. Binley, B. A. Clas, S. Bonhoeffer, T. P. Astill, R. Kost, A. Hurley, Y. Cao, M. Markowitz, D. D. Ho, and J. P. Moore. 1998. HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *J Exp Med* 188:233-45.

52. Nicholson, J. K., J. S. McDougal, T. J. Spira, G. D. Cross, B. M. Jones, and E. L. Reinherz. 1984. Immunoregulatory subsets of the T helper and T suppressor cell populations in homosexual men with chronic unexplained lymphadenopathy. *J Clin Invest* 73:191-201.

53. Ott, D. E., E. N. Chertova, L. K. Busch, L. V. Coren, T. D. Gagliardi, and D. G. Johnson. 1999. Mutational analysis of the hydrophobic tail of the human immunodeficiency virus type 1 p6(Gag) protein produces a mutant that fails to package its envelope protein. *J Virol* 73:19-28.

54. Pahl, H. L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-66.

55. Pullen, S. S., T. T. Dang, J. J. Crute, and M. R. Kehry. 1999. CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J Biol Chem* 274:14246-54.

56. Pullen, S. S., M. E. Labadia, R. H. Ingraham, S. M. McWhirter, D. S. Everdeen, T. Alber, J. J. Crute, and M. R. Kehry. 1999. High-affinity interactions of tumor necrosis

factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* 38:10168-77.

57. Punnonen, J., M. K. Viljanen, E. Eerola, and J. Eskola. 1988. The tonsils are superior to the peripheral blood as sources of mononuclear cells for B-cell purification. *J Clin Lab Immunol* 27:29-33.

58. Reimer, C. B., C. M. Black, R. C. Holman, T. W. Wells, R. M. Ramirez, J. A. Sa-Ferreira, J. K. Nicholson, and J. S. McDougal. 1988. Hypergammaglobulinemia associated with human immunodeficiency virus infection. *Monogr Allergy* 23:83-96.

59. Revy, P., C. Hivroz, G. Andreu, P. Graber, C. Martinache, A. Fischer, and A. Durandy. 1999. Activation of the Janus kinase 3-STAT5a pathway after CD40 triggering of human monocytes but not of resting B cells. *J Immunol* 163:787-93.

60. Rice, N. R., M. L. MacKichan, and A. Israel. 1992. The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions. *Cell* 71:243-53.

61. Rieckmann, P., G. Poli, J. H. Kehrl, and A. S. Fauci. 1991. Activated B lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals induce virus expression in infected T cells and a promonocytic cell line, U1. *J Exp Med* 173:1-5.

62. Schaffer, A., A. Cerutti, S. Shah, H. Zan, and P. Casali. 1999. The evolutionarily conserved sequence upstream of the human Ig heavy chain S gamma 3 region is an inducible promoter: synergistic activation by CD40 ligand and IL-4 via cooperative NF-kappa B and STAT-6 binding sites. *J Immunol* 162:5327-36.

63. Schnittman, S. M., H. C. Lane, S. E. Higgins, T. Folks, and A. S. Fauci. 1986. Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus. *Science* 233:1084-6.

64. Schreiber, E., P. Matthias, M. M. Muller, and W. Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17:6419.

65. Shimizu, H., K. Mitomo, T. Watanabe, S. Okamoto, and K. Yamamoto. 1990. Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol Cell Biol* 10:561-8.
66. Terpstra, F. G., B. J. Al, M. T. Roos, F. De Wolf, J. Goudsmit, P. T. Schellekens, and F. Miedema. 1989. Longitudinal study of leukocyte functions in homosexual men seroconverted for HIV: rapid and persistent loss of B cell function after HIV infection. *Eur J Immunol* 19:667-73.
67. Tsukamoto, N., N. Kobayashi, S. Azuma, T. Yamamoto, and J. Inoue. 1999. Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1234-9.
68. Van Kooten, C., and J. Banchereau. 1996. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol* 61:1-77.
69. van Kooten, C., and J. Banchereau. 1997. Functional role of CD40 and its ligand. *Int Arch Allergy Immunol* 113:393-9.
70. Werneburg, B. G., S. J. Zoog, T. T. Dang, M. R. Kehry, and J. J. Crute. 2001. Molecular characterization of CD40 signaling intermediates. *J Biol Chem* 276:43334-42.
71. Xia, Y. F., L. P. Liu, C. P. Zhong, and J. G. Geng. 2001. NF-kappaB activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289:851-6.
72. Yamamoto, Y., and R. B. Gaynor. 2004. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 29:72-9.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Env glycoproteins are dispensable for incorporation of CD40L within HIV-1. NL4-3/CD40L and NL4-3 Env-/CD40L virus stocks were incubated with streptavidin-coated magnetic beads coated with anti-CD40L antibodies (i.e., 5c8) or isotype-matched irrelevant antibodies (i.e., IgG2a). The amounts of precipitated viruses were estimated by a p24 test. The data shown are the means \pm standard deviations of triplicate samples and are representative of three independent transfections.

Figure 2. CD40L-bearing virions, but not viruses lacking host CD40L, induce IgG production. B lymphocytes purified from human tonsils were treated with IL-4 and IL-10 and incubated at 37°C either in medium alone or with G28.5 (used as a positive control) or one of the following: (A) Mock/CD40L, NL4-3/null, or NL4-3/CD40L, (B) Mock/CD40L, NL4-3balenv/null and NL4-3balenv/CD40L, or (C) NL4-3/CD40L and NL4-3 Env-/CD40L. After 5 (filled bars) and 12 (empty bars) days in culture, supernatants were harvested and the IgG content was measured using a commercial ELISA. In panels A and B, the data shown represent the means \pm standard deviations of triplicate samples for three independent experiments, whereas in panel C, the data shown represent the means \pm standard deviations of triplicate samples and are representative of three independent experiments. The asterisks indicate statistically significant differences (i.e., $P < 0.05$) between the following matched pairs: NL4-3/CD40L versus NL4-3/null (A), NL4-3balenv/CD40L versus NL4-3balenv/null (B), NL4-3/CD40L versus medium alone (C) and NL4-3 Env-/CD40L versus medium alone (C).

Figure 3. CD40L-bearing HIV-1 particles, but not viruses lacking host CD40L, induce IL-6 production. Purified B lymphocytes from human tonsils were treated with IL-4 and IL-10 and incubated for 72 h at 37°C with (A) either Mock/CD40L, the indicated virus preparations, or G28.5, (B) either medium alone, Mock/CD40L, the indicated virus stocks, or G28.5, or (C) either medium alone, the listed virus preparations, or G28.5. The amounts of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12(p70), IL-13, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, and RANTES were measured in cell-free supernatants with the Luminex technology (A). In

some studies, the levels of IL-6 were determined with a commercial ELISA test (B and C). In panel A, the data shown represent the means \pm standard deviations of triplicate samples for two independent experiments, whereas in panels B and C, the data shown represent the means \pm standard deviations of triplicate samples and are representative of three different experiments. The asterisks indicate statistically significant differences (i.e., $P < 0.05$) between the following matched pairs: NL4-3/CD40L versus NL4-3/null and NL4-3balenv/CD40L versus NL4-3balenv/null (A), NL4-3/CD40L versus medium alone (B and C), and NL4-3 Env-/CD40L versus medium alone (C).

Figure 4. CD40L-bearing virions, but not viruses lacking host CD40L, mediates homotypic B-cell adhesion. B lymphocytes purified from human tonsils were treated with IL-4 and IL-10 and were incubated for 72 h at 37°C with (A) either medium alone, Mock/CD40L, NL4-3balenv/null, NL4-3balenv/CD40L, or G28.5, or (B) medium alone, NL4-3/CD40L, NL4-3 Env-/CD40L or, G28.5. The images were observed at x100 magnification, and each is representative of three independent experiments.

Figure 5. CD40L-bearing virions, but not viruses lacking host CD40L, induce a dose-dependent nuclear translocation of NF- κ B. (A) B lymphocytes purified from human tonsils were either left untreated or treated for 30 min at 37°C with medium alone, the listed virus stocks (30 ng of p24 per 1×10^5 B cells), Mock/CD40L, or phorbol myristate acetate-ionomycin (used as a positive control). The nuclear extracts were incubated with a labeled NF- κ B probe, and the complexes were resolved on a native 4% polyacrylamide gel. Competitions were performed with a 100-fold molar excess of either specific (i.e., NF- κ B) (S) or nonspecific (Oct 2A) (NS) oligonucleotides. (B) For the supershift assays, the reactions were also conducted in the absence or presence of antibodies specific for p50 and p65. The arrows on the right indicate the positions of the specific DNA-protein complexes. (C) In some experiments, B lymphocytes purified from human tonsils were either left untreated or treated for 60 min at 37°C with medium alone, the listed virus stocks (at 10 or 30 ng of p24 per 1×10^5 B cells), Mock/CD40L, or phorbol myristate acetate-ionomycin. Competitions assays were performed with a 100-fold molar excess of either specific (S) (i.e., NF- κ B) or nonspecific (NS) (i.e., Oct 2A) oligonucleotides. The signal band

intensities are shown at the bottom of the graph and were quantified by laser densitometry scanning. The data shown are representative of three independent experiments.

Figure 6. HIV-1 attachment to B lymphocytes is increased by interactions between virus-anchored host CD40L and cell surface CD40. B lymphocytes purified from human tonsils were incubated for 1 h at 37°C with NL4-3/null or NL4-3/CD40L virions in either the absence or presence of sCD40L. Next, the virus-cell mixture was extensively washed, lysed, and tested for the p24 content. The data shown represent the means \pm standard deviations of triplicate samples and are representative of three independent experiments. The asterisk indicates statistically significant differences ($P < 0.05$) between the following matched pairs: NL4-3/CD40L versus NL4-3/null and NL4-3/CD40L versus NL4-3/CD40L+sCD40L.

Figure 7. B-cell mediated transmission of HIV-1 to autologous CD4⁺ T lymphocytes is increased with CD40L-bearing virions. B lymphocytes purified from human tonsils were incubated for 1 h at 37°C either with NL4-3/null (triangles), NL4-3/CD40L (squares), or NL4-3/CD40L used in combination with sCD40L (10 μ g/ml) (circles). Thereafter, the virus-cell mixture was extensively washed and cocultured with PHA/IL-2-treated autologous CD4⁺ T cells. The supernatants were harvested at 4, 6 and 8 days following initiation of the coculture. The data shown represent the means \pm standard deviations of triplicate samples and are representative of three independent experiments. The asterisks indicate statistically significant differences between the following matched pair: NL4-3/CD40L versus NL4-3/null.

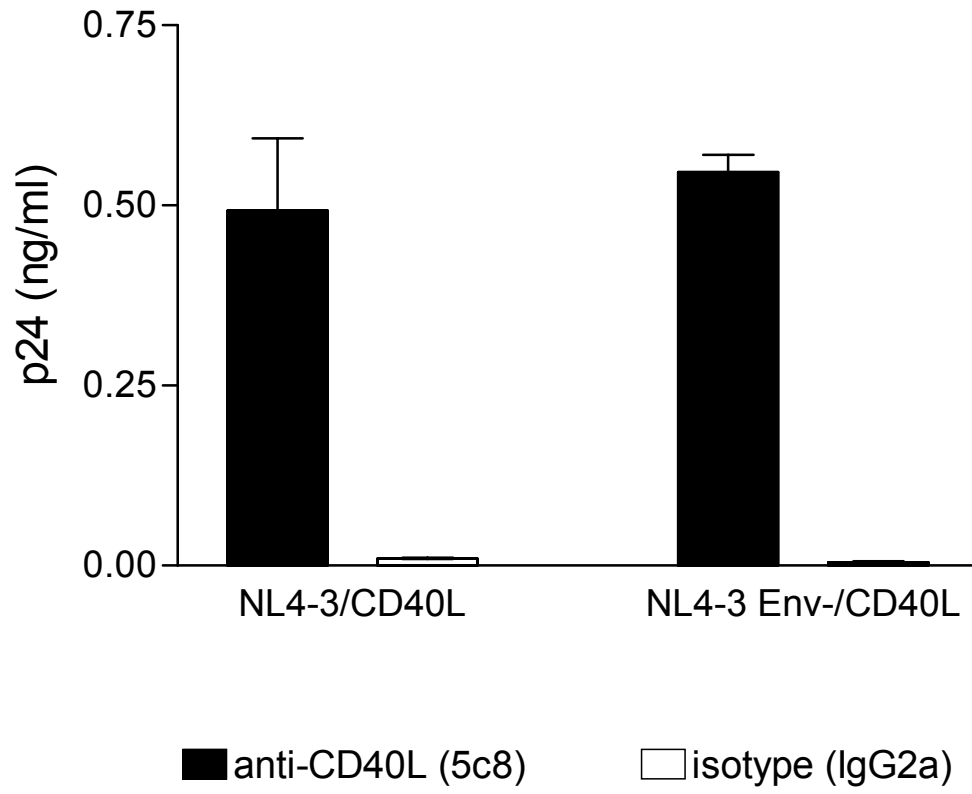


Figure 1

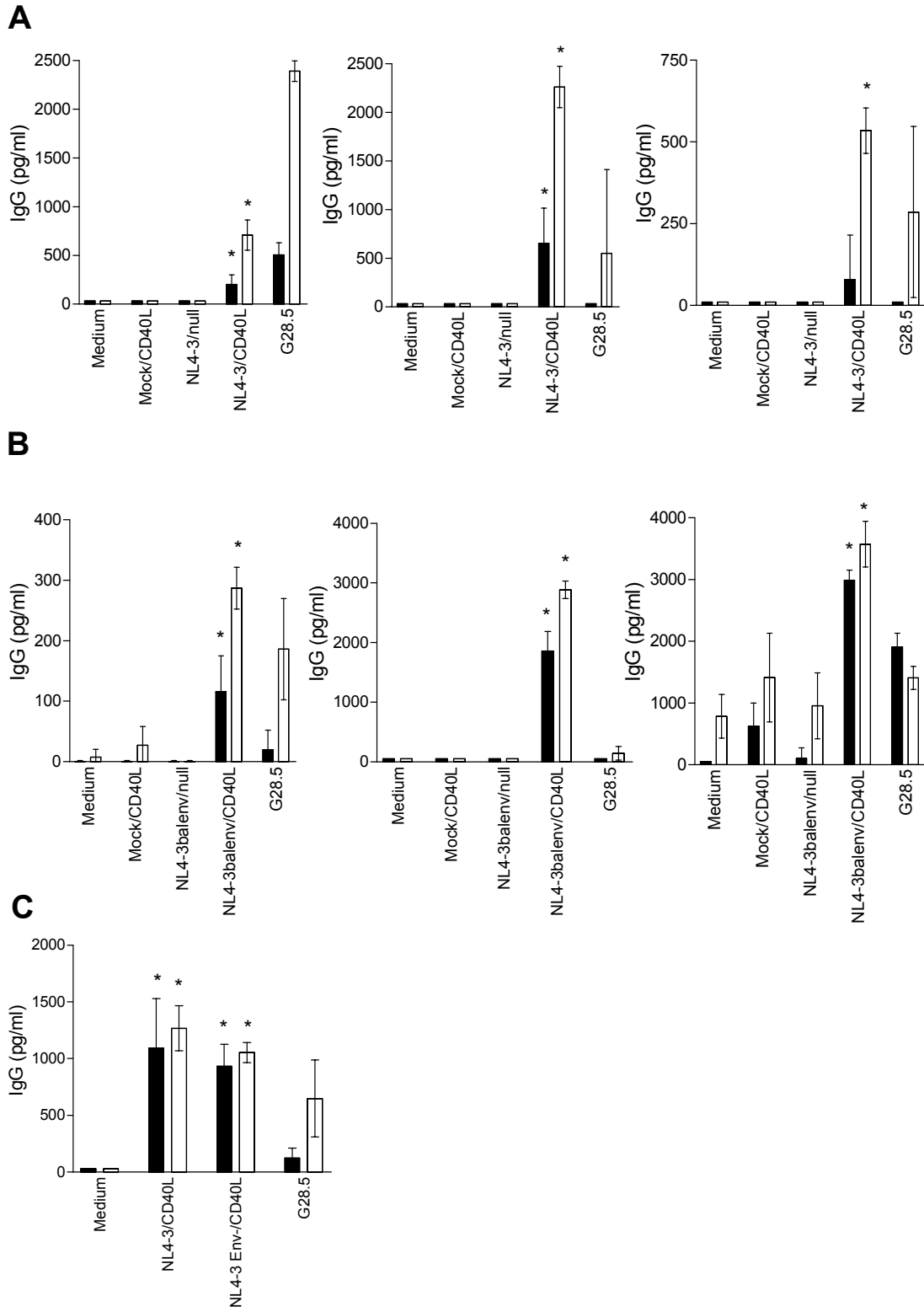


Figure 2

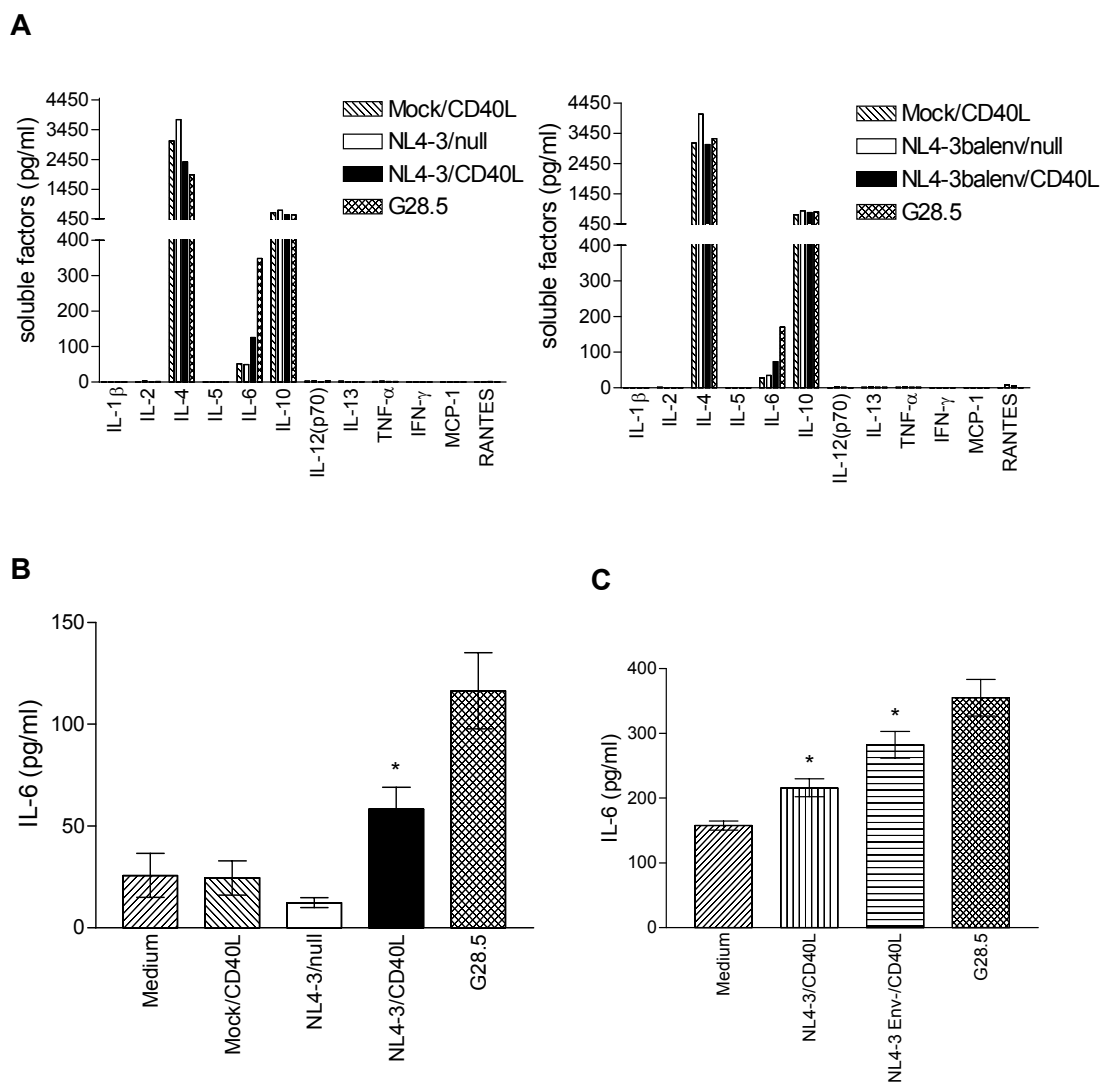


Figure 3

A

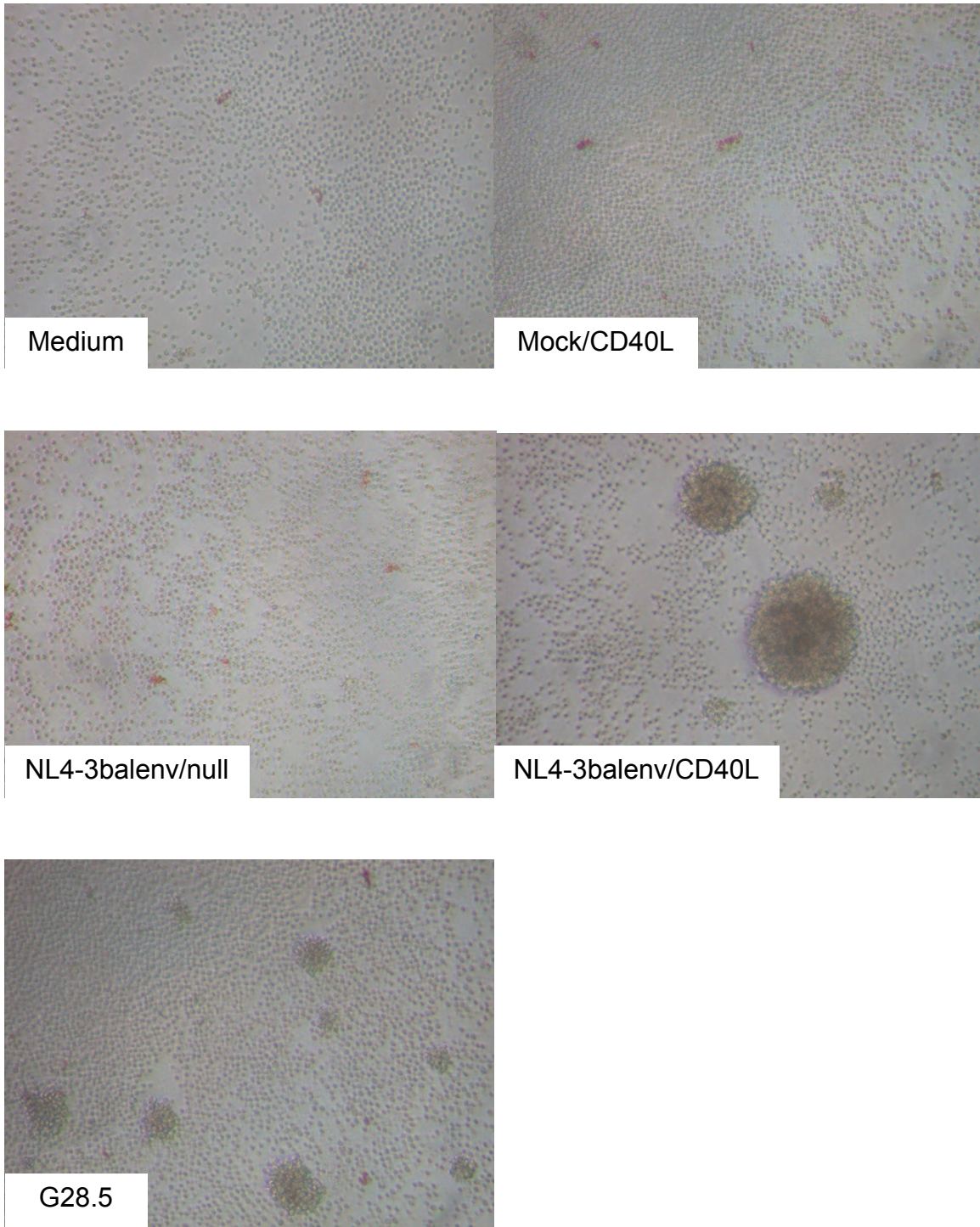


Figure 4

B

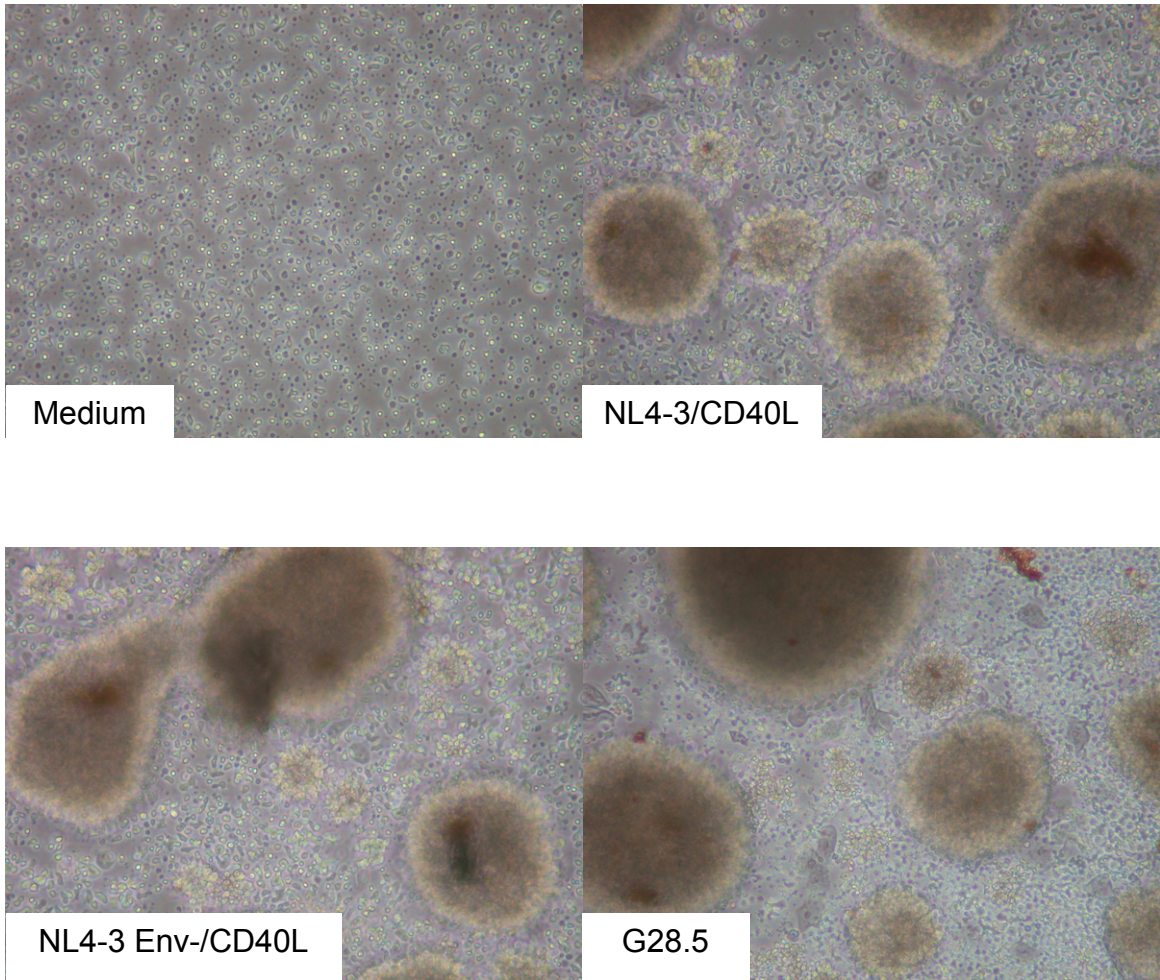


Figure 4

A

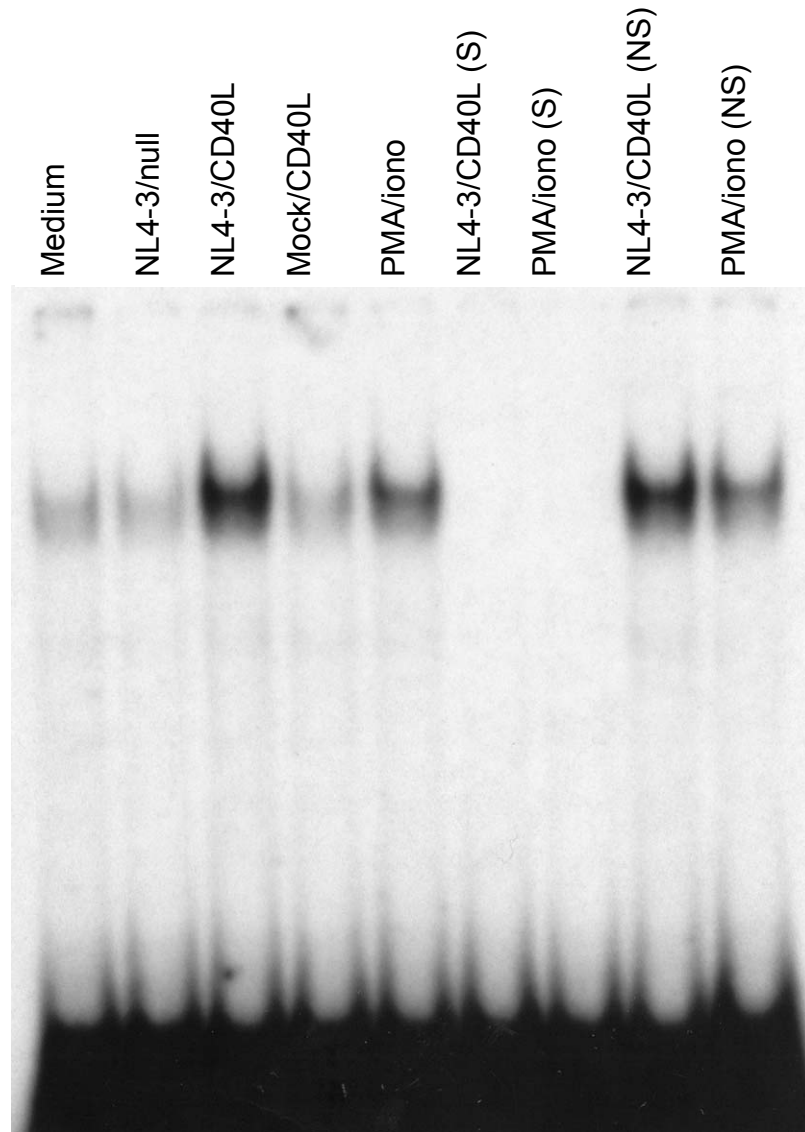


Figure 5

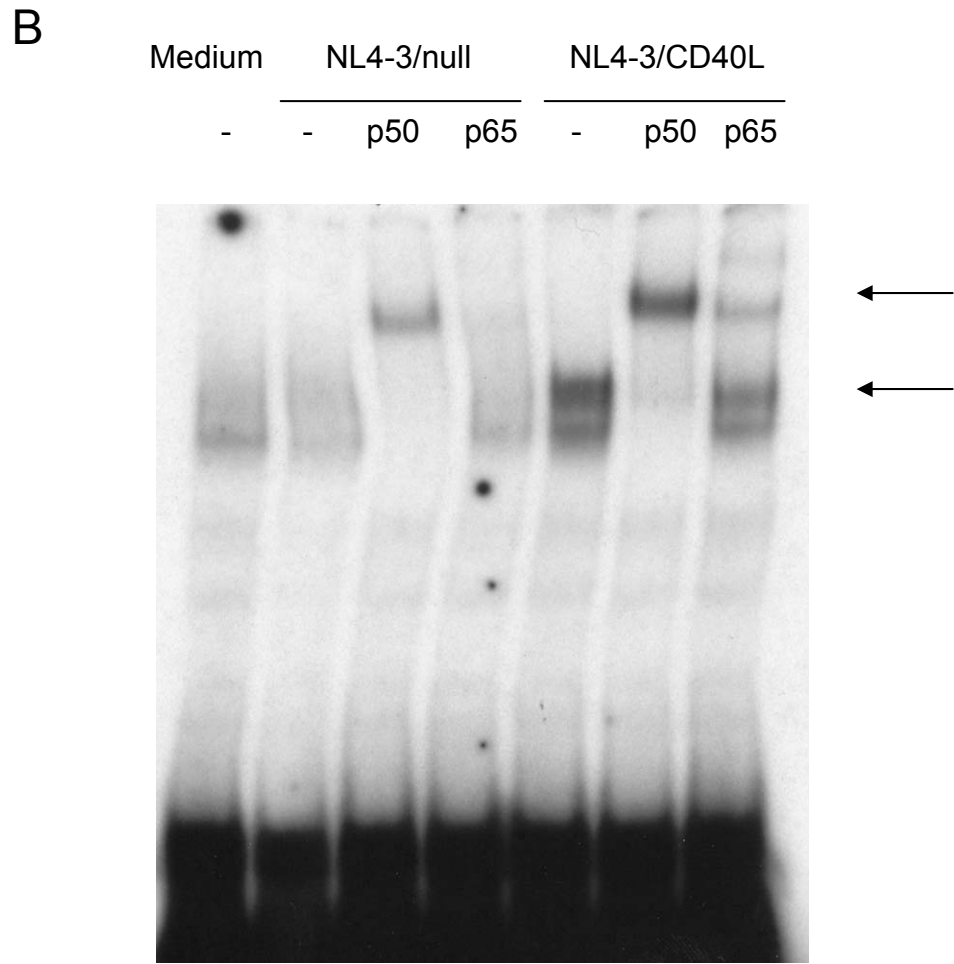


Figure 5

C

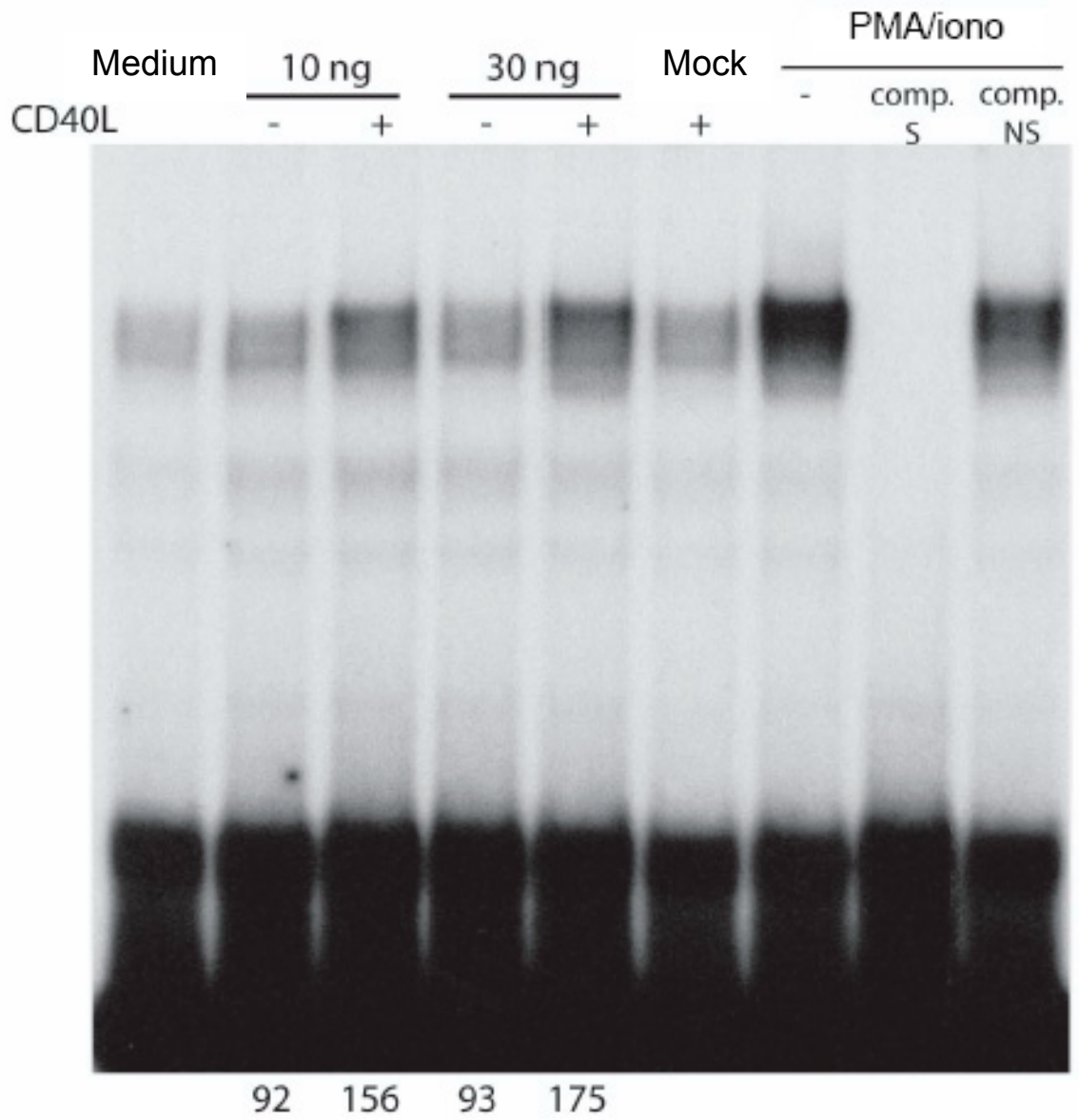


Figure 5

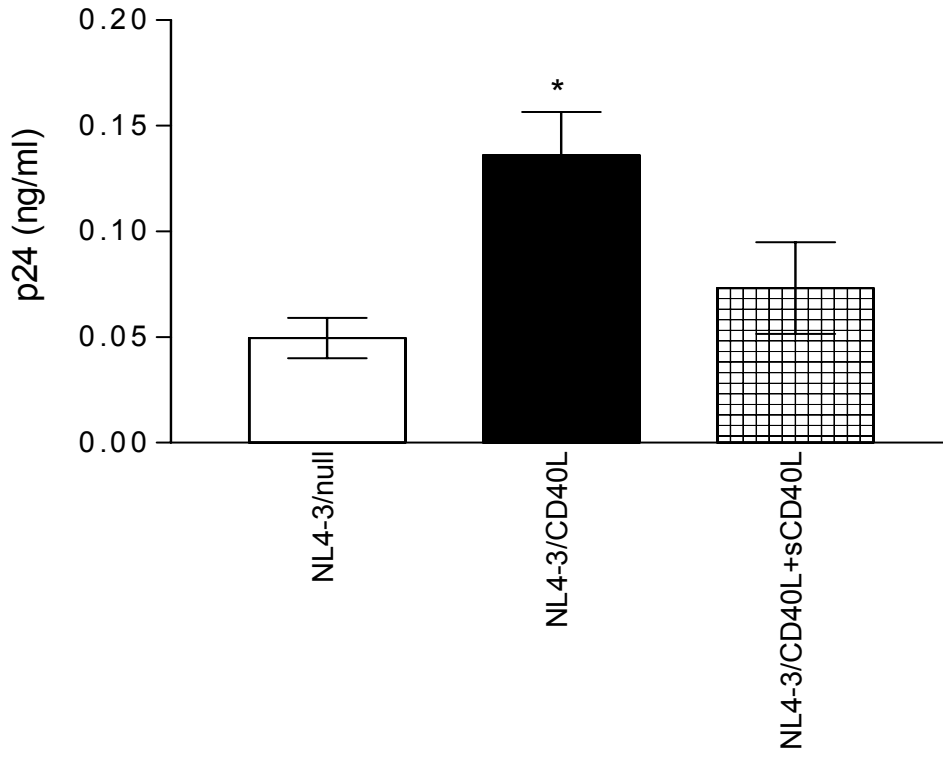


Figure 6

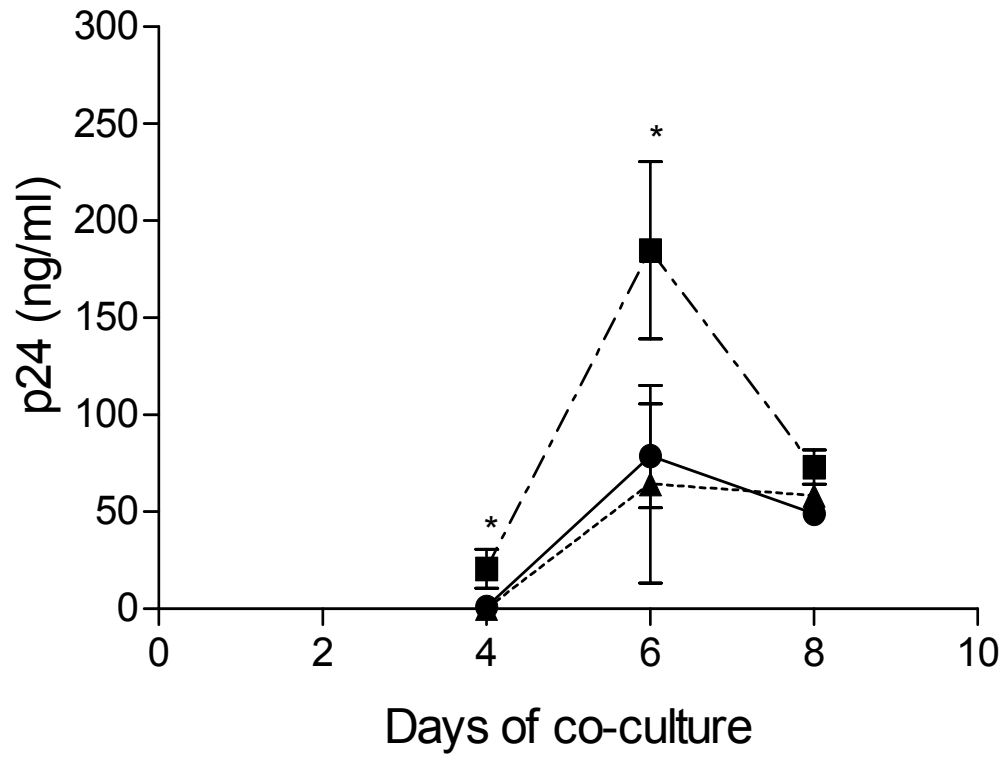


Figure 7

Chapitre 6. Discussion, contributions et avenues futures

6.1 Discussion

Tout en améliorant notre compréhension du système immunitaire humain, les efforts soutenus qui sont déployés en recherche contribuent à élucider les divers aspects structurels et fonctionnels du VIH, ainsi qu'à développer un arsenal destiné à le contrer. Le fait, par exemple, de démystifier davantage la nature des glycoprotéines de l'enveloppe virale et d'anticorps pouvant les neutraliser laisse entrevoir l'élaboration de vaccins et d'inhibiteurs de l'entrée virale (448). Or, à l'instar de l'assemblage et du bourgeonnement des particules virales de la progéniture, d'autres étapes du cycle de réplication du VIH-1 sont peu définies. Par conséquent, l'endroit précis et le processus exact du bourgeonnement et par le fait même, le phénomène d'acquisition de molécules cellulaire par appropriation de la membrane plasmique par le virus, demeurent largement inconnus.

En 1986, Henderson et collaborateurs ont dévoilé la présence de molécules du CMH de classe II, soit HLA-DR, dans des préparations de VIH (558), alors nommé HTLV-III (23). Depuis, une multitude de molécules d'origine cellulaire ont été trouvées associées à la surface de ce virus (205) (260) (261) ((262), voir chapitre 3) (263) et comme mentionné dans la section 1.5.5, certaines d'entre elles y influencent la pathogenèse de l'infection au VIH-1. Pourtant, hormis la démonstration de la présence de HLA-DR dans l'enveloppe du VIH dans le sang de tous les individus chroniquement infectés faisant partie d'une même étude (438), il n'existait pas d'évaluation exhaustive de l'incorporation des molécules de l'hôte par ce virus dans des conditions très près de la réalité *in vivo*.

Insertion de HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD86 et CD40L dans l'enveloppe d'isolats cliniques de VIH-1 issus de réservoirs cellulaires physiologiques

Pour combler le manque d'informations sur cette thématique de recherche, nous avons davantage caractérisé l'incorporation, dans l'enveloppe virale d'isolats cliniques du VIH-1, de cinq molécules cellulaires importantes dans l'activation de cellules du système immunitaire. Pour ce faire, une souche R5 et une autre X4 se sont répliquées dans des modèles de culture de cellules primaires reflétant le plus possible la physiologie du corps humain, en l'occurrence des portions d'amygdales en culture *ex vivo* et des cellules mononucléées du sang veineux. Des cinq molécules en question, seulement les fonctions de HLA-DR, ICAM-1 et CD86 avaient été caractérisées lorsque présentes à la surface du VIH-1 (se référer à la section 1.5.5). En définitive, nous savions peu de choses de l'acquisition de CD40 par quelque type de VIH que ce soit (559) et absolument rien de l'incorporation de CD40L par de tels virus, d'où l'importance d'évaluer la présence de ces deux molécules en surface du VIH-1.

Nos travaux ont permis de rapporter, pour la première fois, la présence de la molécule CD40L dans l'enveloppe virale du VIH-1. Également, nos données montrent que l'acquisition des cinq protéines à l'étude, et présentes à la surface des cellules productrices de virions du VIH-1, ne varie qu'en fonction du donneur de cellules. Considérant que plusieurs de ces molécules, lorsque présentes dans l'enveloppe virale, ont des effets qui avantagent le VIH-1, on pourrait imaginer que la progression rapide de l'infection au VIH-1 observée chez certains individus découlerait d'un nombre élevé de particules virales ayant incorporé une molécule les favorisant.

Mécanisme d'incorporation de la molécule HLA-DR dans l'enveloppe du VIH-1

Comme nous le mentionnions, la molécule HLA-DR est connue depuis un certain temps pour se retrouver dans l'enveloppe virale du VIH-1, du VIH-2 et du virus de l'immunodéficience simienne (421). De plus, parmi les différents isotypes du CMH de classe II, HLA-DR se retrouve préférentiellement en surface du VIH-1 (260) où elle est deux, trois fois (421), voire jusqu'à quatre fois (560) plus abondante que les glycoprotéines virales de l'enveloppe (421). Toutefois, le mécanisme exact de l'importante incorporation de HLA-DR dans l'enveloppe du VIH-1 demeurerait obscur.

Nous nous sommes alors penchés sur la question et avons prouvé que l'acquisition de l'antigène HLA-DR ne dépend pas des glycoprotéines de l'enveloppe virale, soit les produits du gène *env*. Aussi, en référence à l'article faisant l'objet du chapitre 3 du présent ouvrage, nous avons confirmé le fait que le type cellulaire n'influence pas le degré d'incorporation de la molécule HLA-DR et ce, en comparant des virions produits dans des macrophages dérivés de monocytes à des virions issus de lymphocytes T CD4⁺ autologues. Enfin, une expérience complémentaire nous a permis de montrer l'insertion de la molécule HLA-DR dans des pseudovirions formés uniquement par la polyprotéine Pr160^{GagPol}. Épurée la formation de particules du VIH-1 dans les cellules 293T en utilisant cette polyprotéine comme unique élément viral a confirmé que les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 ne sont aucunement responsables de ce phénomène d'insertion. La présence de HLA-DR de nature cellulaire en surface de ces pseudovirions suggère que dans les cellules transfectées (i.e., 293T), les voies de transport de la molécule HLA-DR d'une part et de la polyprotéine Pr160^{GagPol} d'autre part ont convergé et mené à l'incorporation de cet isotype du CMH dans l'enveloppe des pseudovirions.

À cet égard, certains auteurs ont constaté que les particules virales de VIH s'accumulent, chez les macrophages, dans les MIIC où les complexes HLA sont assemblés avec les peptides dérivés des endosomes tardifs (214) (230). En effet, l'invagination de la membrane limitante conduit au bourgeonnement de particules virales du VIH dans la lumière de ces compartiments endocytiques et par le fait même, à leur acquisition des molécules de cette même membrane comme CD63, CD81, CD82 et LAMP-1 (*lysosome-associated membrane glycoprotein 1*), ainsi que des déterminants du CMH de classe II (214). Il a été proposé que les MIIC fusionnent par la suite avec la membrane plasmique (212) (561) (562) et que les vésicules présentes dans leur lumière soient relâchées et alors nommées exosomes (563). Puisque que le VIH-1 utilise la machinerie intracellulaire de la voie endocytique pour son propre assemblage à la membrane plasmique des lymphocytes T (214), on peut croire que les MIIC de ce type cellulaire représentent également le lieu où les particules virales de VIH-1 incorporent l'antigène HLA-DR.

Compte tenu de ce qui précède et sachant que le VIH-1 acquiert la molécule ICAM-1 par une interaction - directe ou indirecte via le cytosquelette - entre la queue cytoplasmique de

ICAM-1 et Pr55^{Gag} (273), nous avons supposé qu'une interaction entre la molécule HLA-DR d'origine cellulaire et la polyprotéine Pr160^{GagPol} serait responsable de l'insertion de HLA-DR dans l'enveloppe du VIH-1. Des expériences sont en cours afin de vérifier cette hypothèse qui est, par ailleurs, en droite ligne avec l'interaction de la portion cytoplasmique de la molécule HLA-DR avec le cytosquelette récemment rapportée (495).

Effet de la présence de la molécule CD40L dans l'enveloppe du VIH-1 sur les lymphocytes B d'amygdales et sur le transfert du virus de ces cellules à des lymphocytes T CD4+ autologues

Rappelons que depuis bientôt 20 ans, une hypergammaglobulinémie, d'origine controversée, est connue pour caractériser l'infection au VIH *in vivo* (377) (378) (voir section 1.5.4.2). De même, il y a un certain temps que les immunologistes savent que l'interaction de la molécule CD40L des lymphocytes T CD4+ avec le récepteur CD40 des lymphocytes B est cruciale pour la différenciation et l'activation de ces derniers (564) (565) (566). Dans un article récemment publié, nous avons d'ailleurs montré que des isolats cliniques de VIH-1, s'étant répliqué dans des modèles de culture cellulaires reflétant le mieux l'environnement *in vivo*, acquièrent la molécule CD40L en leur enveloppe (262). De surcroît, de nombreuses protéines d'origine cellulaire présentes en surface du VIH-1 y demeurent fonctionnelles (révisé dans la section 1.5.5). À partir de ces prémisses, nous avons formulé, puis confirmé, l'hypothèse voulant que la molécule CD40L, à la surface des particules de VIH-1, causerait l'activation des lymphocytes B et faciliterait l'infection de lymphocytes T CD4+ provenant du même organe.

Lors de contacts entre cellules, la liaison de la molécule CD40L au récepteur CD40 est stabilisée par l'interaction de résidus basiques du ligand avec des résidus acides du récepteur. Aussi, la transmission de signaux par le récepteur CD40 est potentialisée par la formation, à la surface des cellules, de trimères de CD40L car ces derniers induisent à leur tour la trimérisation de CD40 (567) (568) (569) (figure 22). La nature de cette transmission de signaux est d'ailleurs variable non seulement parmi les différents types de cellules, mais aussi d'un stade de différenciation à l'autre pour un même type cellulaire (570).

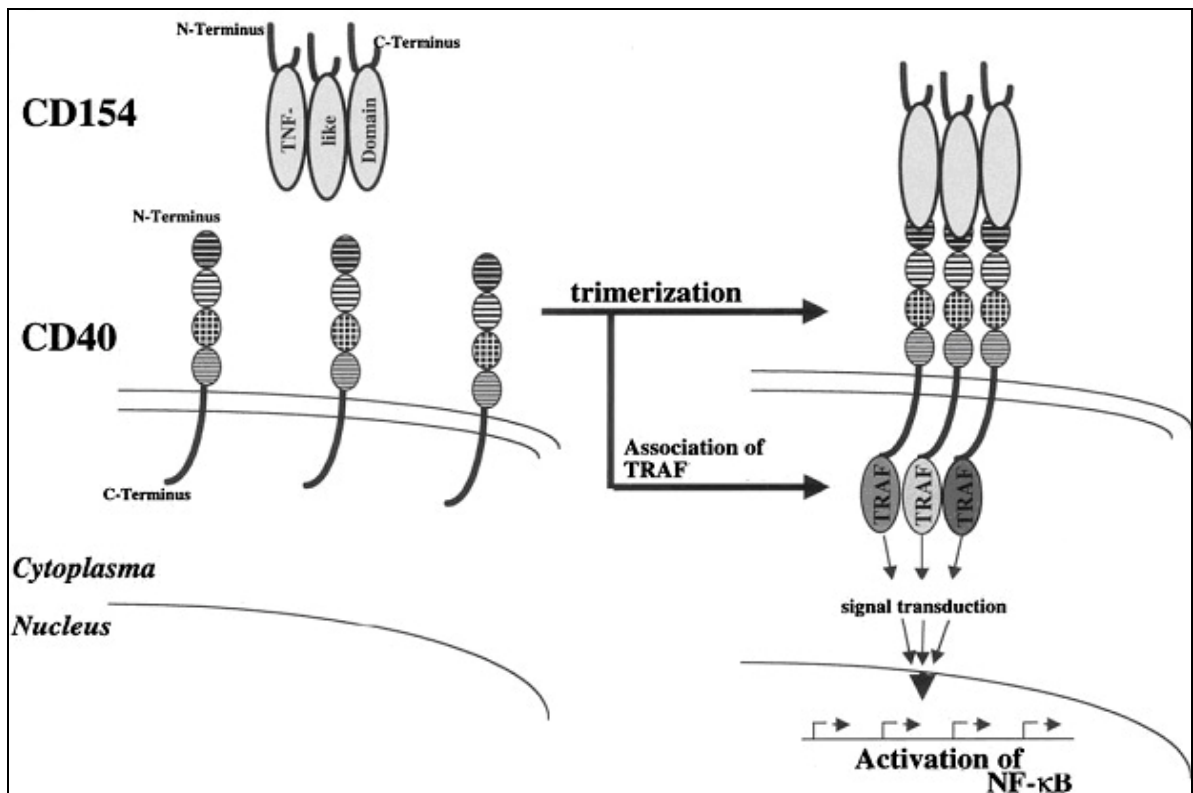


Figure 22. La molécule CD40L (CD154) induit la formation de trimères du récepteur CD40. L'association de facteurs TRAF avec la portion cytoplasmique de CD40 engendre la transmission de signaux intracellulaires et donc la translocation de NF- κ B au noyau (497).

La queue cytoplasmique du récepteur CD40 est dépourvue d'activité kinase intrinsèque (571) et la sollicitation du récepteur CD40 en surface induit, à l'intérieur de la cellule, l'association de la queue cytoplasmique de CD40 avec des protéines désignées facteurs associés au récepteur TNF (*TNF receptor-associated factor* (TRAF)) (figure 22) et/ou l'activation de kinases. L'interaction de TRAF avec CD40 initierait d'ailleurs l'activation de la plupart des voies de signalisation dépendantes de ce récepteur (572).

Chez les lymphocytes B, plus précisément, la liaison du récepteur CD40 engendre l'association de TRAF-2, -5 ou -6 avec sa queue cytoplasmique, des facteurs connus pour conduire à la phosphorylation de NF- κ B (573) (574) (575) et donc à la translocation de ce facteur au noyau, comme révisé dans la section 1.4.3.1. Du côté des kinases activées par la sollicitation du récepteur CD40, on retrouve les tyrosine kinases de type Src comme Lyn

(576), la phospholipase C γ 2 et la phosphatidylinositol-3-kinase (577), ainsi que des protéines sérine/thréonine kinases, dont celles activées par le stress (*stress-activated protein kinase* (SAPK)) (578). Une autre protéine tyrosine kinase nommée Janus kinase 3 (*Janus-activated kinase 3* (JAK3)) - d'ailleurs essentielle à la commutation de classe des immunoglobulines - est associée de manière constitutive à la queue cytoplasmique de CD40 et active, c'est-à-dire phosphoryle, des facteurs de transcription de type STAT (*signal transducer and activator of transcription*) (579) (580).

L'action de NF- κ B sur l'ADN résulte, entre autres, en la transcription du gène de l'intégrine ICAM-1 (581) (582) et en la prévention de l'apoptose des lymphocytes B des centres germinaux (583). De plus, NF- κ B joue aussi un rôle dans la commutation de classe des immunoglobulines, un événement qui comprend la transcription des gènes de la région constante de la chaîne lourde des immunoglobulines et la recombinaison de l'ADN (*class switch recombination* (CSR)) (figure 11). Dans le cas de la synthèse d'IgG3, la sollicitation des récepteurs de l'IL-4 et CD40 induisent en synergie, par l'intermédiaire des facteurs de transcription STAT-6 et NF- κ B, le promoteur appelé *evolutionary conserved sequence* (ECS) de la région S (*switch*) γ 3 de la chaîne lourde des immunoglobulines, ce qui active la transcription de la région constante γ 3 (584) (585). L'IL-4 (586) et l'IL-10 (587) sont d'ailleurs connues pour conduire à la synthèse des IgG1 en plus des IgG3.

Ainsi, à la lumière de nos expériences portant sur l'activation des lymphocytes B par la molécule CD40L présente en surface du VIH-1, nous associons l'augmentation de la sécrétion d'IgG totaux et d'IL-6 détectées à la translocation de NF- κ B au noyau que nous avons notée dans de telles cellules. Quant au mécanisme d'insertion de la molécule CD40L dans l'enveloppe du VIH-1, nous concluons de nos expériences que les glycoprotéines issues du gène *env* n'y jouent aucun rôle, comme nous l'avons affirmé dans le cas de la molécule HLA-DR. D'ailleurs, ni la production d'IgG, ni la sécrétion d'IL-6 ou l'adhésion homotypique des lymphocytes B que nous avons observées ne s'est avérée dépendre des glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1. Enfin, nous déclarons que la présence de CD40L sur le VIH-1 lui permet de mieux se lier aux lymphocytes B et d'être transmis aux lymphocytes T CD4+, des cellules que ce virus cible plus particulièrement. C'est dire que chez un individu porteur du VIH-1, le virus incorporerait la molécule CD40L dans son

enveloppe et pourrait lier le récepteur CD40 des lymphocytes B des amygdales et ainsi les activer. Cette activation expliquerait l'hypergammaglobulinémie et possiblement la production d'anticorps présentant une affinité inadéquate observées chez les individus infectés par le VIH-1, puisque la production des immunoglobulines et l'induction de mutations somatiques régissant leur affinité sont des événements induits par la liaison du récepteur CD40 des lymphocytes B par la molécule CD40L (565) (564) (588). De plus, le virus lié aux lymphocytes B par la molécule CD40L de son enveloppe serait transféré à des lymphocytes T CD4⁺ présents dans l'environnement desdits lymphocytes B des organes lymphatiques, contribuant par le fait même à sa propagation. Considérant qu'une augmentation de l'expression de CD40L d'un facteur de 1,1 à 2 augmente de 4 à 5 fois la production d'anticorps (589), on peut imaginer qu'une hausse dans l'expression de CD40L, aussi modeste soit-elle, puisse faire en sorte qu'un plus grand nombre de virions du VIH-1 incorporeraient cette molécule dans leur enveloppe et contribueraient à juste titre à la sécrétion d'anticorps.

Le(s) type(s) de cellules desquelles le VIH-1 s'approprierait la molécule CD40L chez une personne infectée demeure(ent) néanmoins l'objet de spéculations du fait que nous ne disposons que de peu de données - qui de surcroît sont ponctuelles - sur l'expression de CD40L dans le contexte *in vivo* de l'infection au VIH-1. Malgré tout, nous savons qu'un plus fort pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ et de lymphocytes T CD8⁺ exprimant CD40L a été mesuré chez des personnes infectées au VIH-1, en comparaison à des individus non infectés (590). De plus, Subauste et collaborateurs ont récemment précisé que même chez des individus ayant un faible compte en lymphocytes T CD4⁺ (en dessous de 200/ μ l) ou une forte charge virale (au dessus de 10 000 copies/ml), l'induction de CD40L - en absence de cellules présentatrices d'antigène exprimant le récepteur CD40 - est normale chez les lymphocytes T CD4⁺ isolés de porteurs du VIH-1 (591). À cet égard, il est important de préciser que nos résultats faisant l'objet du chapitre 3 montrent que le VIH-1 incorpore, dans son enveloppe, la molécule CD40L exprimée par des cellules du sang et de portions d'amygdales. Ainsi, nos résultats prouvent que le VIH-1 acquiert CD40L même en présence de cellules qui ont le pouvoir de réduire l'expression de cette molécule et ce, de par le récepteur CD40 qui en provoque l'endocytose (541). Enfin, dans un modèle de macaques rhésus infectés par le SIV_{mac251}, un modèle de physiopathologie

très proche de celle retrouvée chez l'humain, l'expression de CD40L était augmentée sur les lymphocytes TCD4⁺ en circulation deux semaines après inoculation du virus (592). Parallèlement aux lymphocytes T CD4⁺, le VIH-1 peut infecter des cellules dendritiques du sang (593) (594), ce qui porte à croire que le virus pourrait également s'appropriier la molécule CD40L en surface de ces cellules puisqu'elles expriment fortement CD40L après stimulation de leur récepteur CD40 (527). De surcroît, le virus ayant CD40L dans son enveloppe pourrait lier le récepteur CD40 de cellules dendritiques infectées, ce qui les pousserait à exprimer un plus grand nombre de molécules CD40L qui pourraient être acquises en retour par le VIH bourgeonnant desdites cellules.

Nous savons aussi que chez les humains en santé, l'expression de CD40L peut être induite en surface des lymphocytes T CD4⁺ CD45RA⁺ et des lymphocytes T CD4⁺ CD45RO⁺ (520). Rappelons simplement que les lymphocytes T naïfs expriment de façon prédominante l'isoforme CD45RA (595) et que leur activation et différenciation en lymphocytes effecteurs et mémoires sont associées à un changement dans l'expression de cette molécule au profit de l'isotype CD45RO (596) (597). Notamment, les cellules endothéliales augmentent largement l'expression de CD40L des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, mais ont un effet plus modeste sur les lymphocytes T mémoires (535). Cette différence s'explique par la mobilisation du calcium diminuée dans les lymphocytes T mémoires activés par le TCR (598) (599) (600). Malgré tout, il a été montré que dans les amygdales humaines, la molécule CD40L est exprimée par 40% des lymphocytes T CD4⁺ CD45RO⁺ de la zone riche en lymphocytes T (390), que nous rappelons être le site d'arrivée dans ces organes du VIH-1 libre ou associé à des cellules. Si les lymphocytes en question sont alors infectés par le VIH-1, on peut penser qu'ils produisent des virions qui s'approprient, en bourgeonnant, la molécule CD40L de la cellule. Par ailleurs, puisque l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire induit d'une part, l'expression de CD40L (601) et provoque d'autre part, l'accumulation de Pr55^{Gag} dans les corps multivésiculaires et résulte en la relâche d'un plus grand nombre de pseudovirions (213) (209), on peut penser que l'acquisition de CD40L par le VIH-1 serait elle aussi favorisée par une fluctuation à la hausse des ions calciques.

D'un point de vue technique, soulignons que dans les expériences ci-haut mentionnées, les préparations virales soumises à notre technique d'immunocapture pouvaient être contaminées par des microvésicules. Non seulement ces microvésicules arborent aussi des protéines de l'hôte (560), mais elles sont également de densité similaire à celle des virions et présentes même dans des préparations hautement purifiées sur gradient de sucrose (238) (237) ou sur gradient OptiPrep (560). Il serait donc possible que des microvésicules soient entrées en compétition avec les virions pour les sites de liaison des anticorps au sein de l'immunocapture et que les concentrations réelles de virions ayant une molécule donnée dans leur enveloppe soient en fait plus élevées que celles que nous avons observées et présentées dans cette thèse.

6.2 Contributions

Nos travaux ont montré que, dans des modèles de culture de cellules reflétant au mieux la réalité du corps humain (i.e., cultures de cellules du sang veineux et cultures *ex vivo* de portions d'amygdales), des isolats cliniques du VIH-1 acquièrent les molécules HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD86 et CD40L des cellules qu'ils infectent et ce, d'une manière qui ne varie qu'en fonction du donneur de cellules. Ainsi, l'origine anatomique (i.e., sang veineux vs amygdales) n'influence pas plus le processus que le type de cellules produisant les virions (i.e., macrophages dérivés de monocytes vs lymphocytes T CD4+) ne dicte l'insertion de HLA-DR dans l'enveloppe du virus.

Ainsi, nous sommes les premiers à dévoiler la présence de la molécule CD40L, tant dans l'enveloppe d'un isolat clinique R5, que d'une souche X4, de surcroît issus de modèles de culture des plus réalistes. Ensuite, des virions d'une souche de laboratoire, ne différant entre eux que par la présence ou non de la molécule CD40L, nous ont permis de montrer que la liaison du récepteur CD40 par la molécule CD40L de l'enveloppe virale résulte en l'activation de lymphocytes B d'amygdales. Nous avons observé cette activation sous la forme d'une augmentation de la sécrétion d'IgG et d'IL-6 et de l'induction de leur adhésion homotypique. En parallèle, nous avons détecté la translocation de NF- κ B au noyau de tels

lymphocytes. Puis, nous avons remarqué que la molécule CD40L permet au VIH-1 de mieux se lier à ce type cellulaire et d'être transmis aux lymphocytes T CD4⁺ environnants. À notre connaissance, nos travaux sont les premiers à relier la présence d'une molécule d'origine cellulaire dans l'enveloppe du VIH-1 à quelques-unes des anomalies des lymphocytes B couramment observées chez les individus porteurs de ce virus.

Nous nous sommes également penchés sur le mécanisme par lequel le VIH-1 acquiert les protéines HLA-DR et CD40L de la membrane cellulaire qu'il infecte. Le fruit de nos recherches prouve que ces deux molécules sont insérées dans l'enveloppe virale par un processus indépendant des glycoprotéines de l'enveloppe.

6.3 Avenues futures

Nous l'avons dit, CD40L est une molécule retrouvée de façon transitoire en surface des cellules. C'est pourquoi une évaluation exhaustive de l'expression de CD40L tout au long de l'infection au VIH-1 nous permettrait de mieux juger de la portée de nos résultats. Plus particulièrement, la présence de CD40L mériterait d'être évaluée en surface des lymphocytes T CD4⁺ activés retournés au repos et formant le réservoir qui persiste durant l'infection au VIH-1. Le défi que pose cette avenue réside dans la disponibilité d'échantillons reflétant les différents stades de l'infection, d'autant plus que les sites anatomiques renfermant les lymphocytes en question sont encore mal définis. De surcroît, la vérification de la présence de la molécule CD40L dans l'enveloppe du VIH-1 d'individus infectés serait souhaitable.

Pouvoir étudier, dans une population cellulaire donnée, les cellules directement touchées par le VIH-1 permettrait d'évaluer certains autres effets probables de la présence de CD40L dans l'enveloppe du virus, comme l'induction de l'expression de molécules chez ces cellules. Pour cela, il faudrait que le signal issu des cellules affectées ne soit pas dilué dans la masse de cellules non atteintes. La technique de cytométrie à balayage laser (*laser scanning cytometry*) pourrait d'ailleurs être utilisée à cette fin. En effet, un tel équipement

permettrait de mesurer la fluorescence - issue de l'excitation par de multiples lasers - émise par les cellules individuelles (par exemple, via le marquage de leur molécule ICAM-1) et par les particules du VIH-1 également marquées. Considérant que d'une part, l'activation de la transcription du gène de l'intégrine ICAM-1 par NF- κ B - elle-même due à l'action de TRAF-2 - induit l'expression de la molécule ICAM-1 sur les lymphocytes B (581) (582) et que d'autre part, nous avons montré que la molécule CD40L en surface du VIH-1 active ce facteur de transcription, on pourrait croire qu'une éventuelle induction de l'expression de ICAM-1 par un virus arborant CD40L serait à l'origine de l'adhésion des lymphocytes B que nous avons observée. En effet, la paire de molécules d'adhésion ICAM-1/LFA-1 est connue pour être responsable de l'adhésion cellulaire chez de tels lymphocytes (602). Enfin, la technique utilisée servirait non seulement à l'analyse de lymphocytes B, mais aussi de cellules dendritiques et de macrophages.

Ce dernier type cellulaire est d'ailleurs actuellement à l'étude dans notre laboratoire. Les expériences portent, entre autres, sur la probable induction de la sécrétion de cytokines et de métalloprotéinases de la matrice (*matrix metalloproteinase* (MMP)) par les macrophages, suite à la stimulation de leur récepteur CD40 par la molécule CD40L présente sur le VIH-1. L'hypothèse de recherche découle d'une part, du fait que l'expression de la MMP12 est augmentée par la signalisation issue du récepteur CD40 des monocytes/macrophages (603) et d'autre part, de l'observation que la sécrétion de la MMP1, par des macrophages humains, est augmentée en réponse au CD40L recombinant (604). Les MMP pouvant compromettre l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et permettre la migration de monocytes au cerveau (605), on peut imaginer que la molécule CD40L, en surface du VIH-1, induirait la production de MMP par les monocytes ou les macrophages et favoriserait ainsi la dissémination virale au cerveau.

Afin de mieux définir l'étendue de nos résultats, il faudrait aussi déterminer la nature et la proportion des lymphocytes B des amygdales que le VIH-1 arborant CD40L induit à sécréter des IgG. Cinq populations de lymphocytes B, reflétant différents stages de différenciation, ont été identifiées dans les amygdales de par leur phénotype (606). Parmi ces populations, on retrouve les lymphocytes B mémoires pouvant, comme leur précurseurs venant de rencontrer un antigène (révisé dans la section 1.5.4.2), subir la recombinaison de

l'ADN de la commutation de classe (606). Cet événement est, comme nous l'avons mentionné, tributaire de l'enzyme AID, d'ailleurs spécifiquement exprimée dans les lymphocytes B des centres germinaux (607) et ce, par la synergie des signaux provenant du récepteur d'IL-4 et de CD40 (608). L'impact du virus ayant CD40L dans son enveloppe serait d'autant plus grand que le nombre de lymphocytes B qu'il touche dans les amygdales est élevé.

De plus il serait intéressant de décortiquer davantage les événements de signalisation régissant les diverses facettes de l'activation des lymphocytes B d'amygdales par la molécule CD40L en surface du VIH-1 que nous avons observées. On pourrait par exemple vérifier si la translocation de NF- κ B au noyau détectée dépend de TRAF-2, -5 -6 et plus particulièrement, étudier les acteurs de la voie JAK/STAT liés au récepteur de l'IL-4 dans le contexte de la production des IgG. En matière de signalisation intracellulaire chez de tels lymphocytes, des expériences avec des micropuces à ADN sont d'ailleurs en cours pour établir le patron d'activation ou de suppression de gènes que la stimulation du récepteur CD40 par la molécule CD40L en surface du VIH-1 engendre. Caractériser ainsi la transmission de signaux dévoilera peut-être des molécules pouvant être ciblées par de nouvelles thérapies visant à contrer les effets de la liaison de CD40L à CD40, ce qui présenterait une alternative à l'utilisation d'anticorps dirigés contre CD40L. Ces anticorps sont en effet connus pour produire des effets secondaires non négligeables car ils activent les plaquettes exprimant CD40L, ce qui cause leur agrégation, en plus de stimuler les cellules endothéliales arborant CD40L à exprimer davantage de molécules d'adhésion, le tout favorisant le développement de complications thrombotiques (553).

En définitive, la perspective la plus prometteuse de l'étude de l'incorporation de molécules de l'hôte par le VIH demeure probablement l'établissement d'une alloimmunisation en guise de vaccin prophylactique et dont les assises remontent à 1933. À cette époque, Gye et Purdy avaient utilisé des essais de neutralisation de virus pour montrer qu'un antisérum contre des antigènes cellulaires pouvait neutraliser une infection causée par un « *filtrable fowl tumor agent* », indiquant que des antigènes cellulaires étaient physiquement associés à des virus (609). Plus tard, Arthur et collaborateurs ont montré que des macaques immunisés avec des protéines HLA-DR étaient protégés du SIV propagé dans des cellules humaines et

portant cette molécule en leur surface (610). Par ailleurs, au sein d'un groupe de douze femmes traitées pour contrer des avortements spontanés récurrents, une femme montrait un taux d'anticorps sériques dirigés contre des lymphocytes anormalement élevé et fait intéressant, capables de neutraliser une souche de laboratoire de VIH-1 *in vitro* (611).

Cette avenue est d'autant plus intéressante que la réponse allogénique est bien développée chez le nourrisson, ne requiert pas une pré-immunisation et offre une mémoire immunologique à long terme (612). Elle provoque d'ailleurs une forte immunité, tant cellulaire qu'humorale, et représente la réponse immune spécifique à un antigène la plus forte que l'on connaisse (612). Ainsi, les cellules allogéniques infectées, comme les particules libres de VIH exprimant les antigènes HLA ciblés, pourraient être détruites (612). Cible de choix, la molécule HLA-DR est certainement la plus abondante sur les virions (205) (263), sans compter qu'elle est acquise par une forte proportion de virions (jusqu'à 94%), qu'ils soient issus d'un modèle reflétant l'environnement du sang périphérique chez l'humain ou de portions d'amygdales en culture, comme l'illustre l'article du chapitre 3 du présent ouvrage. De plus, vacciner une population avec les protéines des allèles de HLA les plus représentées dans cette même population contournerait le problème que pose la constante variation antigénique des protéines virales.

Enfin, la suite des travaux permettra de caractériser davantage d'une part, le mécanisme par lequel le VIH-1 insère l'isotype HLA-DR du CMH dans son enveloppe et d'autre part, l'impact, au sein de cellules du système immunitaire, de la liaison du récepteur cellulaire CD40 par la molécule CD40L présente dans l'enveloppe du VIH-1. Ainsi, nous espérons mieux comprendre les étapes d'assemblage et de bourgeonnement de ce virus, ainsi que la pathogenèse associée à l'infection qu'il cause, et être plus aptes à concevoir de nouveaux outils pour le combattre.

Bibliographie

1. Rapport sur l'épidémie mondiale de SIDA (2006). Genève, Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA). 629 p.
2. Agence de santé publique du Canada. *Populations à risque*, [En ligne]. http://www.phac-aspc.gc.ca/aids-sida/populations_f.html (Page consultée le 1 avril 2007).
3. Organisation Mondiale de la Santé. *Thérapie antirétrovirale contre l'infection par le VIH*, [En ligne]. http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241546344_fre_chap11.pdf#search=%22taha%20arv%20vih%22 (Page consultée le 1 avril 2007).
4. Organisation mondiale de la Santé. *Accélérer la prévention du VIH dans le cadre de l'initiative «3 millions d'ici 2005»*, [En ligne]. <http://www.who.int/3by5/publications/briefs/en/OMS%2003%20-%20Prevention.pdf> (Page consultée le 1 avril 2007).
5. Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology of HIV/AIDS---United States, 1981--2005*, [En ligne]. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5521a2.htm?s_cid=mm5521a2_e (Page consultée le 1 avril 2007).
6. Romieu, I., R. Marlink, et al. (1990). "HIV-2 link to AIDS in West Africa." *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**(3): 220.
7. Flint, S. J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R., Skalka, A.M. (2004). *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses*. Washington, DC, US, ASM Press. 918 p.
8. Gao, F., E. Bailes, et al. (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes." *Nature* **397**(6718): 436.
9. Hahn, B. H., G. M. Shaw, et al. (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." *Science* **287**(5453): 607.
10. Salemi, M., K. Strimmer, et al. (2001). "Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution." *Faseb J* **15**(2): 276.
11. Sharp, P. M. (2006). "Where AIDS came from." 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, CO, US.
12. Bailes, E., F. Gao, et al. (2003). "Hybrid origin of SIV in chimpanzees." *Science* **300**(5626): 1713.

13. Chen, Z., P. Telfier, et al. (1996). "Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop." *J Virol* **70**(6): 3617.
14. Vidal, N., M. Peeters, et al. (2000). "Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa." *J Virol* **74**(22): 10498.
15. Kandathil, A. J., S. Ramalingam, et al. (2005). "Molecular epidemiology of HIV." *Indian J Med Res* **121**(4): 333.
16. Perrin, L., L. Kaiser, et al. (2003). "Travel and the spread of HIV-1 genetic variants." *Lancet Infect Dis* **3**(1): 22.
17. Gupta, R. M., Seth, P., Prasad, V.V.S.P., Sahn,i A.K., Jena, J. (2006). "Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) A/AE Circulating Recombinant Form (CRF) in India: Possible Implications." *MJAFI* **62**(4): 316.
18. Heeney, J. L., A. G. Dalgleish, et al. (2006). "Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS." *Science* **313**(5786): 462.
19. Centers for Disease control and Prevention. *Pneumocystis Pneumonia---Los Angeles*, [En ligne]. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm (Page consultée le 1 avril 2007).
20. Centers for Disease Control and Prevention. *CDC Commemorates 25 Years of HIV/AIDS*, [En ligne]. <http://www.cdc.gov/hiv/resources/other/PDF/MMWR%2025%20Year.pdf> (Page consultée le 1 avril 2007).
21. University of California, San Francisco. *History of the AIDS Epidemic in the United States*, [En ligne]. <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-01-03#S1X> (Page consultée le 1 avril 2007).
22. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868.
23. Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, et al. (1984). "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS." *Science* **224**(4648): 500.
24. Levy, J. A., A. D. Hoffman, et al. (1984). "Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS." *Science* **225**(4664): 840.

25. Guyader, M., M. Emerman, et al. (1987). "Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2." *Nature* **326**(6114): 662.
26. National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program. *AIDS Graphics*, [En ligne]. <http://www.aidsreagent.org/techlib/default.cfm?Action=HIVGraphics> (Page consultée le 1 avril 2007).
27. Freed, E. O. (2001). "HIV-1 replication." *Somat Cell Mol Genet* **26**(1-6): 13.
28. Poignard, P., E. O. Saphire, et al. (2001). "gp120: Biologic aspects of structural features." *Annu Rev Immunol* **19**: 253.
29. Clapham, P. R. and A. McKnight (2002). "Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses." *J Gen Virol* **83**(Pt 8): 1809.
30. Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." *Nature* **312**(5996): 763.
31. Klatzmann, D., E. Champagne, et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." *Nature* **312**(5996): 767.
32. Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, et al. (1986). "The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain." *Cell* **47**(3): 333.
33. Marrack, P., R. Endres, et al. (1983). "The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. II. Role of the L3T4 product." *J Exp Med* **158**(4): 1077.
34. Janeway, C. A., Jr. (1992). "The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation." *Annu Rev Immunol* **10**: 645.
35. Curtis, B. M., S. Scharnowske, et al. (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**(17): 8356.
36. Fantini, J., D. G. Cook, et al. (1993). "Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7): 2700.
37. Harouse, J. M., S. Bhat, et al. (1991). "Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide." *Science* **253**(5017): 320.

38. Moulard, M., H. Lortat-Jacob, et al. (2000). "Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120." *J Virol* **74**(4): 1948.
39. Argyris, E. G., E. Acheampong, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts." *J Virol* **77**(22): 12140.
40. Marechal, V., F. Clavel, et al. (1998). "Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **72**(3): 2208.
41. Schaeffer, E., V. B. Soros, et al. (2004). "Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes." *J Virol* **78**(3): 1375.
42. Schwartz, O., V. Marechal, et al. (1998). "Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **72**(5): 3845.
43. Kwon, D. S., G. Gregorio, et al. (2002). "DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection." *Immunity* **16**(1): 135.
44. Fortin, J. F., B. Barbeau, et al. (1999). "Role of the leukocyte function antigen-1 conformational state in the process of human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and virus infection." *Virology* **257**(1): 228.
45. Cantin, R., J. F. Fortin, et al. (1997). "The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity." *J Virol* **71**(3): 1922.
46. Berger, E. A. (1997). "HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection." *Aids* **11 Suppl A**: S3.
47. Mackay, C. R. (1993). "Immunological memory." *Adv Immunol* **53**: 217.
48. Bleul, C. C., L. Wu, et al. (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1925.
49. Lathey, J. L., D. Brambilla, et al. (2000). "Co-receptor usage was more predictive than NSI/SI phenotype for HIV replication in macrophages: is NSI/SI phenotyping sufficient?" *J Leukoc Biol* **68**(3): 324.
50. Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." *Annu Rev Immunol* **18**: 217.

51. Berger, E. A., R. W. Doms, et al. (1998). "A new classification for HIV-1." *Nature* **391**(6664): 240.
52. Berger, E. A., P. M. Murphy, et al. (1999). "Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease." *Annu Rev Immunol* **17**: 657.
53. Martensson, U. E., E. M. Fenyo, et al. (2006). "Characterization of the human chemerin receptor--ChemR23/CMKLR1--as co-receptor for human and simian immunodeficiency virus infection, and identification of virus-binding receptor domains." *Virology* **355**(1): 6.
54. Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, et al. (1987). "Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins." *Virology* **156**(1): 171.
55. Ozel, M., G. Pauli, et al. (1988). "The organization of the envelope projections on the surface of HIV." *Arch Virol* **100**(3-4): 255.
56. Nermut, M. V., C. Grief, et al. (1993). "Further evidence of icosahedral symmetry in human and simian immunodeficiency virus." *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**(10): 929.
57. Kowalski, M., J. Potz, et al. (1987). "Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1." *Science* **237**(4820): 1351.
58. Lu, M., S. C. Blacklow, et al. (1995). "A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein." *Nat Struct Biol* **2**(12): 1075.
59. Leonard, C. K., M. W. Spellman, et al. (1990). "Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* **265**(18): 10373.
60. Starcich, B. R., B. H. Hahn, et al. (1986). "Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS." *Cell* **45**(5): 637.
61. Iyengar, S., J. E. Hildreth, et al. (1998). "Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells." *J Virol* **72**(6): 5251.
62. Nguyen, D. H., B. Giri, et al. (2005). "Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement." *Exp Cell Res* **304**(2): 559.
63. Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569.

64. Davis, D. M. (2002). "Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells." *Trends Immunol* **23**(7): 356.
65. Davis, D. M., T. Igakura, et al. (2003). "The protean immune cell synapse: a supramolecular structure with many functions." *Semin Immunol* **15**(6): 317.
66. Bangham, C. R. (2003). "Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): persistence and immune control." *Int J Hematol* **78**(4): 297.
67. Igakura, T., J. C. Stinchcombe, et al. (2003). "Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton." *Science* **299**(5613): 1713.
68. Jolly, C., K. Kashefi, et al. (2004). "HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse." *J Exp Med* **199**(2): 283.
69. Kwong, P. D., R. Wyatt, et al. (1998). "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody." *Nature* **393**(6686): 648.
70. Kwong, P. D., R. Wyatt, et al. (2000). "Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates." *Structure* **8**(12): 1329.
71. Sattentau, Q. J. and J. P. Moore (1991). "Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding." *J Exp Med* **174**(2): 407.
72. Sattentau, Q. J., J. P. Moore, et al. (1993). "Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding." *J Virol* **67**(12): 7383.
73. Wyatt, R., P. D. Kwong, et al. (1998). "The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein." *Nature* **393**(6686): 705.
74. Salzwedel, K. and E. A. Berger (2000). "Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12794.
75. Ryser, H. J., E. M. Levy, et al. (1994). "Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10): 4559.
76. Fenouillet, E., R. Barbouche, et al. (2001). "The catalytic activity of protein disulfide isomerase is involved in human immunodeficiency virus envelope-mediated membrane fusion after CD4 cell binding." *J Infect Dis* **183**(5): 744.

77. Gallina, A., T. M. Hanley, et al. (2002). "Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry." *J Biol Chem* **277**(52): 50579.
78. Barbouche, R., R. Miquelis, et al. (2003). "Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion." *J Biol Chem* **278**(5): 3131.
79. Markovic, I., T. S. Stantchev, et al. (2004). "Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry." *Blood* **103**(5): 1586.
80. Dragic, T. (2001). "An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function." *J Gen Virol* **82**(Pt 8): 1807.
81. Cormier, E. G., M. Persuh, et al. (2000). "Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 5762.
82. Cormier, E. G., D. N. Tran, et al. (2001). "Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complexes." *J Virol* **75**(12): 5541.
83. Ryser, H. J. and R. Fluckiger (2005). "Progress in targeting HIV-1 entry." *Drug Discov Today* **10**(16): 1085.
84. Weissenhorn, W., A. Dessen, et al. (1997). "Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41." *Nature* **387**(6631): 426.
85. Gomez, C. and T. J. Hope (2005). "The ins and outs of HIV replication." *Cell Microbiol* **7**(5): 621.
86. Chan, D. C. and P. S. Kim (1998). "HIV entry and its inhibition." *Cell* **93**(5): 681.
87. Chan, D. C., D. Fass, et al. (1997). "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein." *Cell* **89**(2): 263.
88. Luban, J. (1996). "Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions." *Cell* **87**(7): 1157.
89. Braaten, D., E. K. Franke, et al. (1996). "Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription." *J Virol* **70**(6): 3551.
90. Franke, E. K., H. E. Yuan, et al. (1994). "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions." *Nature* **372**(6504): 359.

91. Thali, M., A. Bukovsky, et al. (1994). "Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions." *Nature* **372**(6504): 363.
92. Karageorgos, L., P. Li, et al. (1993). "Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection." *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**(9): 817.
93. Bukrinskaya, A., B. Brichacek, et al. (1998). "Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton." *J Exp Med* **188**(11): 2113.
94. Institut Pasteur. *Cytosquelette: transport viral et alterations viro-induites*, [En ligne]. <http://virologie.free.fr/02-cytosquelette/cytosquelette.htm> (Page consultée le 1 avril 2007).
95. Greene, W. C. and B. M. Peterlin (2002). "Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy." *Nat Med* **8**(7): 673.
96. McDonald, D., M. A. Vodicka, et al. (2002). "Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells." *J Cell Biol* **159**(3): 441.
97. Watts, N. R., D. L. Sackett, et al. (2000). "HIV-1 rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings." *J Cell Biol* **150**(2): 349.
98. Strebel, K. and S. Bour (1999). "Molecular interactions of HIV with host factors." *Aids* **13 Suppl A**: S13.
99. Khan, M. A., C. Aberham, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA." *J Virol* **75**(16): 7252.
100. Mariani, R., D. Chen, et al. (2003). "Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif." *Cell* **114**(1): 21.
101. Stopak, K., C. de Noronha, et al. (2003). "HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability." *Mol Cell* **12**(3): 591.
102. Cantin, R., S. Methot, et al. (2005). "Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses." *J Virol* **79**(11): 6577.
103. Nisole, S. and A. Saib (2004). "Early steps of retrovirus replicative cycle." *Retrovirology* **1**(1): 9.
104. Lecossier, D., F. Bouchonnet, et al. (2003). "Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein." *Science* **300**(5622): 1112.

105. Mangeat, B., P. Turelli, et al. (2003). "Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts." *Nature* **424**(6944): 99.
106. Zhang, H., R. J. Pomerantz, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging process." *J Virol* **74**(18): 8252.
107. Katz, R. A. and A. M. Skalka (1994). "The retroviral enzymes." *Annu Rev Biochem* **63**: 133.
108. Mak, J. and L. Kleiman (1997). "Primer tRNAs for reverse transcription." *J Virol* **71**(11): 8087.
109. Preston, B. D., B. J. Poiesz, et al. (1988). "Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase." *Science* **242**(4882): 1168.
110. Hu, W. S. and H. M. Temin (1990). "Retroviral recombination and reverse transcription." *Science* **250**(4985): 1227.
111. Malim, M. H. and M. Emerman (2001). "HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation." *Cell* **104**(4): 469.
112. Singh, M. (2006). "No vaccine against HIV yet--are we not perfectly equipped?" *Virol J* **3**: 60.
113. Miller, M. D., C. M. Farnet, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition." *J Virol* **71**(7): 5382.
114. Sherman, M. P. and W. C. Greene (2002). "Slipping through the door: HIV entry into the nucleus." *Microbes Infect* **4**(1): 67.
115. Roe, T., T. C. Reynolds, et al. (1993). "Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis." *Embo J* **12**(5): 2099.
116. Lewis, P. F. and M. Emerman (1994). "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus." *J Virol* **68**(1): 510.
117. Bukrinsky, M. I., N. Sharova, et al. (1992). "Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(14): 6580.
118. von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, et al. (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**(15): 6992.
119. Gallay, P., T. Hope, et al. (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**(18): 9825.
 120. Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, et al. (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 U S A* **91**(15): 7311.
 121. Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, et al. (1993). "A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells." *Nature* **365**(6447): 666.
 122. Weinberg, J. B., T. J. Matthews, et al. (1991). "Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes." *J Exp Med* **174**(6): 1477.
 123. Cullen, B. R. (2001). "Journey to the center of the cell." *Cell* **105**(6): 697.
 124. Gorlich, D., F. Vogel, et al. (1995). "Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import." *Nature* **377**(6546): 246.
 125. Popov, S., M. Rexach, et al. (1998). "Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." *Embo J* **17**(4): 909.
 126. Vodicka, M. A., D. M. Koepp, et al. (1998). "HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection." *Genes Dev* **12**(2): 175.
 127. Brown, P. O., B. Bowerman, et al. (1987). "Correct integration of retroviral DNA in vitro." *Cell* **49**(3): 347.
 128. Lobel, L. I., J. E. Murphy, et al. (1989). "The palindromic LTR-LTR junction of Moloney murine leukemia virus is not an efficient substrate for proviral integration." *J Virol* **63**(6): 2629.
 129. Ellis, J. and A. Bernstein (1989). "Retrovirus vectors containing an internal attachment site: evidence that circles are not intermediates to murine retrovirus integration." *J Virol* **63**(6): 2844.
 130. Yedavalli, V. S., M. Benkirane, et al. (2003). "Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1." *J Biol Chem* **278**(8): 6404.
 131. Wu, Y. (2004). "HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA." *Retrovirology* **1**(1): 13.

132. Bowerman, B., P. O. Brown, et al. (1989). "A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA." *Genes Dev* **3**(4): 469.
133. Roth, M. J., P. L. Schwartzberg, et al. (1989). "Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: dependence on IN function and terminal DNA sequence." *Cell* **58**(1): 47.
134. Brown, P. O., B. Bowerman, et al. (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**(8): 2525.
135. Fujiwara, T. and K. Mizuuchi (1988). "Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate." *Cell* **54**(4): 497.
136. Schroder, A. R., P. Shinn, et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." *Cell* **110**(4): 521.
137. Kulkosky, J. and A. M. Skalka (1994). "Molecular mechanism of retroviral DNA integration." *Pharmacol Ther* **61**(1-2): 185.
138. Garcia, J. A., F. K. Wu, et al. (1987). "Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus." *Embo J* **6**(12): 3761.
139. Ross, E. K., A. J. Buckler-White, et al. (1991). "Contribution of NF-kappa B and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1: distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types." *J Virol* **65**(8): 4350.
140. Kawakami, K., C. Scheidereit, et al. (1988). "Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(13): 4700.
141. Nabel, G. and D. Baltimore (1987). "An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells." *Nature* **326**(6114): 711.
142. Li, C., C. F. Lai, et al. (1991). "Cloning of a cellular factor, interleukin binding factor, that binds to NFAT-like motifs in the human immunodeficiency virus long terminal repeat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17): 7739.
143. Arendt, C. W. and D. R. Littman (2001). "HIV: master of the host cell." *Genome Biol* **2**(11): REVIEWS1030.
144. Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." *Annu Rev Immunol* **18**: 621.

145. Barboric, M., R. M. Nissen, et al. (2001). "NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell* **8**(2): 327.
146. El Kharroubi, A., G. Piras, et al. (1998). "Transcriptional activation of the integrated chromatin-associated human immunodeficiency virus type 1 promoter." *Mol Cell Biol* **18**(5): 2535.
147. Finzi, D., M. Hermankova, et al. (1997). "Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy." *Science* **278**(5341): 1295.
148. Wong, J. K., C. C. Ignacio, et al. (1997). "In vivo compartmentalization of human immunodeficiency virus: evidence from the examination of pol sequences from autopsy tissues." *J Virol* **71**(3): 2059.
149. Pierson, T., J. McArthur, et al. (2000). "Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy." *Annu Rev Immunol* **18**: 665.
150. Dayton, A. I., J. G. Sodroski, et al. (1986). "The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication." *Cell* **44**(6): 941.
151. Fisher, A. G., M. B. Feinberg, et al. (1986). "The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication." *Nature* **320**(6060): 367.
152. Berkhout, B., R. H. Silverman, et al. (1989). "Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target." *Cell* **59**(2): 273.
153. Marcello, A., M. Lusic, et al. (2004). "Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription." *Gene* **326**: 1.
154. Price, D. H. (2000). "P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell Biol* **20**(8): 2629.
155. Zhou, M., L. Deng, et al. (2003). "The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12666.
156. Purcell, D. F. and M. A. Martin (1993). "Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity." *J Virol* **67**(11): 6365.
157. Lever, A. M. and K. T. Jeang (2006). "Replication of human immunodeficiency virus type 1 from entry to exit." *Int J Hematol* **84**(1): 23.
158. Neville, M., F. Stutz, et al. (1997). "The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export." *Curr Biol* **7**(10): 767.

159. Askjaer, P., T. H. Jensen, et al. (1998). "The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP." *J Biol Chem* **273**(50): 33414.
160. Schwartz, S., B. K. Felber, et al. (1992). "Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs." *Mol Cell Biol* **12**(1): 207.
161. Shatkin, A. J. (1976). "Capping of eucaryotic mRNAs." *Cell* **9**(4 PT 2): 645.
162. Shatkin, A. J. (1985). "mRNA cap binding proteins: essential factors for initiating translation." *Cell* **40**(2): 223.
163. Kozak, M. (1986). "Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes." *Cell* **47**(4): 481.
164. Kozak, M. (1989). "The scanning model for translation: an update." *J Cell Biol* **108**(2): 229.
165. Buck, C. B., X. Shen, et al. (2001). "The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site." *J Virol* **75**(1): 181.
166. Schwartz, S., B. K. Felber, et al. (1990). "Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **64**(6): 2519.
167. Schwartz, S., B. K. Felber, et al. (1990). "Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs." *J Virol* **64**(11): 5448.
168. Brierley, I. (1995). "Ribosomal frameshifting viral RNAs." *J Gen Virol* **76** (Pt 8): 1885.
169. Geyer, M., C. E. Munte, et al. (1999). "Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein." *J Mol Biol* **289**(1): 123.
170. Levesque, K., Y. S. Zhao, et al. (2003). "Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells." *J Biol Chem* **278**(30): 28346.
171. Blagoveshchenskaya, A. D., L. Thomas, et al. (2002). "HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway." *Cell* **111**(6): 853.
172. Ross, T. M., A. E. Oran, et al. (1999). "Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein." *Curr Biol* **9**(12): 613.

173. Bour, S., F. Boulerice, et al. (1991). "Inhibition of gp160 and CD4 maturation in U937 cells after both defective and productive infections by human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **65**(12): 6387.
174. Stumptner-Cuvelette, P. and P. Benaroch (2002). "Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function." *Biochim Biophys Acta* **1542**(1-3): 1.
175. Marsh, J. W. (1999). "The numerous effector functions of Nef." *Arch Biochem Biophys* **365**(2): 192.
176. Le Rouzic, E. and S. Benichou (2005). "The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle." *Retrovirology* **2**(1): 11.
177. Accola, M. A., A. Ohagen, et al. (2000). "Isolation of human immunodeficiency virus type 1 cores: retention of Vpr in the absence of p6(gag)." *J Virol* **74**(13): 6198.
178. Welker, R., H. Hohenberg, et al. (2000). "Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **74**(3): 1168.
179. Zhang, S., D. Pointer, et al. (1998). "Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1." *Gene* **212**(2): 157.
180. de Rocquigny, H., A. Caneparo, et al. (2000). "Interactions of the C-terminus of viral protein R with nucleic acids are modulated by its N-terminus." *Eur J Biochem* **267**(12): 3654.
181. Hrimech, M., X. J. Yao, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G(2) cell cycle arrest: Vpr interferes with cell cycle signaling cascades by interacting with the B subunit of serine/threonine protein phosphatase 2A." *Embo J* **19**(15): 3956.
182. Earl, P. L., B. Moss, et al. (1991). "Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein." *J Virol* **65**(4): 2047.
183. Otteken, A., P. L. Earl, et al. (1996). "Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates." *J Virol* **70**(6): 3407.
184. Otteken, A. and B. Moss (1996). "Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin." *J Biol Chem* **271**(1): 97.

185. Pinter, A., W. J. Honnen, et al. (1989). "Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **63**(6): 2674.
186. Kozarsky, K., M. Penman, et al. (1989). "Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein." *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**(2): 163.
187. Hallenberger, S., V. Bosch, et al. (1992). "Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160." *Nature* **360**(6402): 358.
188. Miranda, L. R., B. C. Schaefer, et al. (2002). "Cell surface expression of the HIV-1 envelope glycoproteins is directed from intracellular CTLA-4-containing regulated secretory granules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8031.
189. Blott, E. J., G. Bossi, et al. (2001). "Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail." *J Cell Sci* **114**(Pt 13): 2405.
190. Egan, M. A., L. M. Carruth, et al. (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein." *J Virol* **70**(10): 6547.
191. Rowell, J. F., P. E. Stanhope, et al. (1995). "Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC." *J Immunol* **155**(1): 473.
192. Sauter, M. M., A. Pelchen-Matthews, et al. (1996). "An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface." *J Cell Biol* **132**(5): 795.
193. Marsh, M. and A. Pelchen-Matthews (2000). "Endocytosis in viral replication." *Traffic* **1**(7): 525.
194. Orzech, E., L. Livshits, et al. (2001). "Interactions between adaptor protein-1 of the clathrin coat and microtubules via type 1a microtubule-associated proteins." *J Biol Chem* **276**(33): 31340.
195. Wyss, S., C. Berlioz-Torrent, et al. (2001). "The highly conserved C-terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adaptor [correction of adapter]." *J Virol* **75**(6): 2982.
196. Berlioz-Torrent, C., B. L. Shacklett, et al. (1999). "Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components

- of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins." *J Virol* **73**(2): 1350.
197. Boge, M., S. Wyss, et al. (1998). "A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor." *J Biol Chem* **273**(25): 15773.
198. Ohno, H., R. C. Aguilar, et al. (1997). "Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family." *Virology* **238**(2): 305.
199. Dong, X., H. Li, et al. (2005). "AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly." *Cell* **120**(5): 663.
200. Crise, B., L. Buonocore, et al. (1990). "CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor." *J Virol* **64**(11): 5585.
201. Margottin, F., S. P. Bour, et al. (1998). "A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif." *Mol Cell* **1**(4): 565.
202. Adamson, C. S. and I. M. Jones (2004). "The molecular basis of HIV capsid assembly-five years of progress." *Rev Med Virol* **14**(2): 107.
203. Freed, E. O. (1998). "HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle." *Virology* **251**(1): 1.
204. Rey, O., J. Canon, et al. (1996). "HIV-1 Gag protein associates with F-actin present in microfilaments." *Virology* **220**(2): 530.
205. Ott, D. E. (1997). "Cellular proteins in HIV virions." *Rev Med Virol* **7**(3): 167.
206. Gottlinger, H. G. (2001). "The HIV-1 assembly machine." *Aids* **15 Suppl 5**: S13.
207. Zhou, W., L. J. Parent, et al. (1994). "Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids." *J Virol* **68**(4): 2556.
208. Bukrinskaya, A. G. (2004). "HIV-1 assembly and maturation." *Arch Virol* **149**(6): 1067.
209. Perlman, M. and M. D. Resh (2006). "Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag." *Traffic* **7**(6): 731.
210. Gruenberg, J. (2001). "The endocytic pathway: a mosaic of domains." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(10): 721.

211. Stoorvogel, W., M. J. Kleijmeer, et al. (2002). "The biogenesis and functions of exosomes." *Traffic* **3**(5): 321.
212. Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." *J Exp Med* **183**(3): 1161.
213. Resh, M. D. (2005). "Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles." *AIDS Rev* **7**(2): 84.
214. Raposo, G., M. Moore, et al. (2002). "Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments." *Traffic* **3**(10): 718.
215. Hermida-Matsumoto, L. and M. D. Resh (2000). "Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging." *J Virol* **74**(18): 8670.
216. McDonald, D., L. Wu, et al. (2003). "Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions." *Science* **300**(5623): 1295.
217. Amara, A. and D. R. Littman (2003). "After Hrs with HIV." *J Cell Biol* **162**(3): 371.
218. Booth, A. M., Y. Fang, et al. (2006). "Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane." *J Cell Biol* **172**(6): 923.
219. Sherer, N. M., M. J. Lehmann, et al. (2003). "Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies." *Traffic* **4**(11): 785.
220. Demirov, D. G., J. M. Orenstein, et al. (2002). "The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner." *J Virol* **76**(1): 105.
221. Gottwein, E. and H. G. Krausslich (2005). "Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination." *J Virol* **79**(14): 9134.
222. Vogt, V. M. (2000). "Ubiquitin in retrovirus assembly: actor or bystander?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 12945.
223. Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* **67**: 425.
224. Ott, D. E., L. V. Coren, et al. (1998). "Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus." *J Virol* **72**(4): 2962.

225. VerPlank, L., F. Bouamr, et al. (2001). "Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14): 7724.
226. Martin-Serrano, J., T. Zang, et al. (2001). "HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress." *Nat Med* **7**(12): 1313.
227. Licata, J. M., M. Simpson-Holley, et al. (2003). "Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4." *J Virol* **77**(3): 1812.
228. Saad, J. S., J. Miller, et al. (2006). "Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(30): 11364.
229. Ono, A., S. D. Ablan, et al. (2004). "Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(41): 14889.
230. Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, et al. (2003). "Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages." *J Cell Biol* **162**(3): 443.
231. Finzi, A., A. Brunet, et al. (2006). "Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments." *J Virol* **80**(19): 9789.
232. Gluschankof, P. and M. Suzan (2002). "HIV-1 gag polyprotein rescues HLA-DR intracellular transport in a human CD4+ cell line." *Virology* **300**(1): 160.
233. Denzer, K., M. J. Kleijmeer, et al. (2000). "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device." *J Cell Sci* **113 Pt 19**: 3365.
234. Demirov, D. G. and E. O. Freed (2004). "Retrovirus budding." *Virus Res* **106**(2): 87.
235. Gould, S. J., A. M. Booth, et al. (2003). "The Trojan exosome hypothesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10592.
236. Nguyen, D. G., A. Booth, et al. (2003). "Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway." *J Biol Chem* **278**(52): 52347.
237. Gluschankof, P., I. Mondor, et al. (1997). "Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations." *Virology* **230**(1): 125.

238. Bess, J. W., Jr., R. J. Gorelick, et al. (1997). "Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations." *Virology* **230**(1): 134.
239. Blot, V., F. Perugi, et al. (2004). "Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding." *J Cell Sci* **117**(Pt 11): 2357.
240. Basyuk, E., T. Galli, et al. (2003). "Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles." *Dev Cell* **5**(1): 161.
241. Sfakianos, J. N. and E. Hunter (2003). "M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome." *Traffic* **4**(10): 671.
242. Kolesnikova, L., B. Berghofer, et al. (2004). "Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope." *J Virol* **78**(22): 12277.
243. Lee, Y. M., B. Liu, et al. (1999). "Formation of virus assembly intermediate complexes in the cytoplasm by wild-type and assembly-defective mutant human immunodeficiency virus type 1 and their association with membranes." *J Virol* **73**(7): 5654.
244. Simons, K. and E. Ikonen (2000). "How cells handle cholesterol." *Science* **290**(5497): 1721.
245. Fivaz, M., F. Vilbois, et al. (2002). "Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins." *Embo J* **21**(15): 3989.
246. Grigorov, B., F. Arcanger, et al. (2006). "Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines." *J Mol Biol* **359**(4): 848.
247. Aronoff, R. and M. Linial (1991). "Specificity of retroviral RNA packaging." *J Virol* **65**(1): 71.
248. Cimarelli, A. and J. L. Darlix (2002). "Assembling the human immunodeficiency virus type 1." *Cell Mol Life Sci* **59**(7): 1166.
249. Bachand, F., X. J. Yao, et al. (1999). "Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor." *J Biol Chem* **274**(13): 9083.
250. Selig, L., J. C. Pages, et al. (1999). "Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses." *J Virol* **73**(1): 592.

251. Barat, C., O. Schatz, et al. (1993). "Analysis of the interactions of HIV1 replication primer tRNA(Lys,3) with nucleocapsid protein and reverse transcriptase." *J Mol Biol* **231**(2): 185.
252. Marassi, F. M., C. Ma, et al. (1999). "Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14336.
253. Babiychuk, E. B. and A. Draeger (2000). "Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains." *J Cell Biol* **150**(5): 1113.
254. Lindwasser, O. W. and M. D. Resh (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies." *J Virol* **78**(11): 6013.
255. Nguyen, D. H. and J. E. Hildreth (2000). "Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts." *J Virol* **74**(7): 3264.
256. Scheiffele, P., A. Rietveld, et al. (1999). "Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane." *J Biol Chem* **274**(4): 2038.
257. Zhang, J., A. Pekosz, et al. (2000). "Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins." *J Virol* **74**(10): 4634.
258. Bavari, S., C. M. Bosio, et al. (2002). "Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses." *J Exp Med* **195**(5): 593.
259. Suomalainen, M. (2002). "Lipid rafts and assembly of enveloped viruses." *Traffic* **3**(10): 705.
260. Ott, D. E. (2002). "Potential roles of cellular proteins in HIV-1." *Rev Med Virol* **12**(6): 359.
261. Kolegraff, K., P. Bostik, et al. (2006). "Characterization and role of lentivirus-associated host proteins." *Exp Biol Med (Maywood)* **231**(3): 252.
262. Martin, G. and M. J. Tremblay (2004). "HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L, and CD86 are incorporated to a similar degree into clinical human immunodeficiency virus type 1 variants expanded in natural reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured ex vivo." *Clin Immunol* **111**(3): 275.
263. Tremblay, M. J., J. F. Fortin, et al. (1998). "The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1." *Immunol Today* **19**(8): 346.

264. Roberts, B. D. and S. T. Butera (1999). "Host protein incorporation is conserved among diverse HIV-1 subtypes." *Aids* **13**(3): 425.
265. Meerloo, T., M. A. Sheikh, et al. (1993). "Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after in vitro infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immuno-electron microscopic study." *J Gen Virol* **74** (Pt 1): 129.
266. Cantin, R., G. Martin, et al. (2001). "A novel virus capture assay reveals a differential acquisition of host HLA-DR by clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 expanded in primary human cells depending on the nature of producing cells and the donor source." *J Gen Virol* **82**(Pt 12): 2979.
267. Schols, D., R. Pauwels, et al. (1992). "Presence of class II histocompatibility DR proteins on the envelope of human immunodeficiency virus demonstrated by FACS analysis." *Virology* **189**(1): 374.
268. Beausejour, Y. and M. J. Tremblay (2004). "Envelope glycoproteins are not required for insertion of host ICAM-1 into human immunodeficiency virus type 1 and ICAM-1-bearing viruses are still infectious despite a suboptimal level of trimeric envelope proteins." *Virology* **324**(1): 165.
269. Martin, G., Y. Beausejour, et al. (2005). "Envelope glycoproteins are dispensable for insertion of host HLA-DR molecules within nascent human immunodeficiency virus type 1 particles." *Virology* **335**(2): 286.
270. Martin, G., J. Roy, et al. (2007). "Human immunodeficiency virus type 1-associated CD40 ligand transactivates B lymphocytes and promotes infection of CD4+ T cells." *J Virol* **81**(11): 5872.
271. Carpen, O., P. Pallai, et al. (1992). "Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin." *J Cell Biol* **118**(5): 1223.
272. Ott, D. E., L. V. Coren, et al. (1996). "Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions." *J Virol* **70**(11): 7734.
273. Beausejour, Y. and M. J. Tremblay (2004). "Interaction between the cytoplasmic domain of ICAM-1 and Pr55Gag leads to acquisition of host ICAM-1 by human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **78**(21): 11916.
274. 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**(24): 13925.
275. Henriksson, P. and V. Bosch (1998). "Inhibition of cellular glycoprotein incorporation into human immunodeficiency virus-like particles by coexpression of additional cellular interaction partner." *Virology* **251**(1): 16.

276. Oroszlan, S. and R. B. Luftig (1990). "Retroviral proteinases." *Curr Top Microbiol Immunol* **157**: 153.
277. Resh, M. D. (2004). "A myristoyl switch regulates membrane binding of HIV-1 Gag." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(2): 417.
278. Tang, C., E. Loeliger, et al. (2004). "Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(2): 517.
279. Wu, Z., J. Alexandratos, et al. (2004). "Total chemical synthesis of N-myristoylated HIV-1 matrix protein p17: structural and mechanistic implications of p17 myristoylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11587.
280. Zhou, W. and M. D. Resh (1996). "Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein." *J Virol* **70**(12): 8540.
281. Pantaleo, G. and A. S. Fauci (1996). "Immunopathogenesis of HIV infection." *Annu Rev Microbiol* **50**: 825.
282. Milman, G. and O. Sharma (1994). "Mechanisms of HIV/SIV mucosal transmission." *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(10): 1305.
283. Smith, P. D., G. Meng, et al. (2003). "Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir." *J Leukoc Biol* **74**(5): 642.
284. Alfsen, A., P. Iniguez, et al. (2001). "Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1." *J Immunol* **166**(10): 6257.
285. Yeaman, G. R., H. D. White, et al. (1998). "The mucosal immune system in the human female reproductive tract: potential insights into the heterosexual transmission of HIV." *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 1**: S57.
286. Hocini, H. and M. Bomsel (1999). "Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins." *J Infect Dis* **179 Suppl 3**: S448.
287. Alfsen, A. and M. Bomsel (2002). "HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide." *J Biol Chem* **277**(28): 25649.
288. Zhu, T., N. Wang, et al. (1996). "Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission." *J Virol* **70**(5): 3098.

289. Bobardt, M. D., U. Chatterji, et al. (2007). "Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells." *J Virol* **81**(1): 395.
290. Amerongen, H. M., R. Weltzin, et al. (1991). "Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS." *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**(8): 760.
291. Winther, B. and D. J. Innes (1994). "The human adenoid. A morphologic study." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **120**(2): 144.
292. Nave, H., A. Gebert, et al. (2001). "Morphology and immunology of the human palatine tonsil." *Anat Embryol (Berl)* **204**(5): 367.
293. Sanders, R. W., E. C. de Jong, et al. (2002). "Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells." *J Virol* **76**(15): 7812.
294. Lore, K. and M. Larsson (2003). "The role of dendritic cells in the pathogenesis of HIV-1 infection." *Apmis* **111**(7-8): 776.
295. Kilby, J. M. (2001). "Human immunodeficiency virus pathogenesis: insights from studies of lymphoid cells and tissues." *Clin Infect Dis* **33**(6): 873.
296. Morris, H. H., K. C. Gatter, et al. (1983). "Langerhans' cells in human cervical epithelium: an immunohistological study." *Br J Obstet Gynaecol* **90**(5): 400.
297. Bjercke, S., H. Scott, et al. (1983). "HLA-DR-expressing Langerhans'-like cells in vaginal and cervical epithelium." *Acta Obstet Gynecol Scand* **62**(6): 585.
298. Miller, C. J. (1998). "Host and viral factors influencing heterosexual HIV transmission." *Rev Reprod* **3**(1): 42.
299. Soilleux, E. J. and N. Coleman (2001). "Langerhans cells and the cells of Langerhans cell histiocytosis do not express DC-SIGN." *Blood* **98**(6): 1987.
300. Condominet, B., J. Peguet-Navarro, et al. (1998). "Human epidermal Langerhans cells express the mannose-fucose binding receptor." *Eur J Immunol* **28**(11): 3541.
301. Haase, A. T., K. Henry, et al. (1996). "Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue." *Science* **274**(5289): 985.
302. Dieu, M. C., B. Vanbervliet, et al. (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." *J Exp Med* **188**(2): 373.

303. Jameson, B., F. Baribaud, et al. (2002). "Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques." *J Virol* **76**(4): 1866.
304. Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, et al. (2000). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses." *Cell* **100**(5): 575.
305. Hussain, L. A. and T. Lehner (1995). "Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia." *Immunology* **85**(3): 475.
306. Kavanagh, D. G. and N. Bhardwaj (2002). "A division of labor: DC subsets and HIV receptor diversity." *Nat Immunol* **3**(10): 891.
307. Margolick, J. B., D. J. Volkman, et al. (1987). "Amplification of HTLV-III/LAV infection by antigen-induced activation of T cells and direct suppression by virus of lymphocyte blastogenic responses." *J Immunol* **138**(6): 1719.
308. Zhang, Z., T. Schuler, et al. (1999). "Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells." *Science* **286**(5443): 1353.
309. Daar, E. S., T. Moudgil, et al. (1991). "Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection." *N Engl J Med* **324**(14): 961.
310. Spira, A. I., P. A. Marx, et al. (1996). "Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques." *J Exp Med* **183**(1): 215.
311. Herbeuval, J. P., J. Nilsson, et al. (2006). "Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18): 7000.
312. Frankel, S. S., K. Tenner-Racz, et al. (1997). "Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil." *Am J Pathol* **151**(1): 89.
313. Heath, S. L., J. G. Tew, et al. (1995). "Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity." *Nature* **377**(6551): 740.
314. Schragar, L. K. and M. P. D'Souza (1998). "Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy." *Jama* **280**(1): 67.
315. Frankel, S. S., B. M. Wenig, et al. (1996). "Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid." *Science* **272**(5258): 115.

316. Brandtzaeg, P. (1989). "Overview of the mucosal immune system." *Curr Top Microbiol Immunol* **146**: 13.
317. Rugtveit, J., P. Brandtzaeg, et al. (1994). "Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes." *Gut* **35**(5): 669.
318. Grimm, M. C., W. E. Pullman, et al. (1995). "Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa." *J Gastroenterol Hepatol* **10**(4): 387.
319. Burgio, V. L., S. Fais, et al. (1995). "Peripheral monocyte and naive T-cell recruitment and activation in Crohn's disease." *Gastroenterology* **109**(4): 1029.
320. Veazey, R. S., M. DeMaria, et al. (1998). "Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection." *Science* **280**(5362): 427.
321. Stahl-Hennig, C., R. M. Steinman, et al. (1999). "Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus." *Science* **285**(5431): 1261.
322. van der Ende, M. E., M. Schutten, et al. (1999). "CD4 T cells remain the major source of HIV-1 during end stage disease." *Aids* **13**(9): 1015.
323. Rosenberg, E. S., A. M. Caliendo, et al. (1999). "Acute HIV infection among patients tested for mononucleosis." *N Engl J Med* **340**(12): 969.
324. Chun, T. W., D. Finzi, et al. (1995). "In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency." *Nat Med* **1**(12): 1284.
325. Chun, T. W., L. Carruth, et al. (1997). "Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection." *Nature* **387**(6629): 183.
326. Yamashita, M. and M. Emerman (2006). "Retroviral infection of non-dividing cells: old and new perspectives." *Virology* **344**(1): 88.
327. Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1994). "Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection." *Immunol Rev* **140**: 105.
328. Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1991). "Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(21): 9838.
329. Orenstein, J. M., C. Fox, et al. (1997). "Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections." *Science* **276**(5320): 1857.

330. Rossio, J. L., J. Bess, Jr., et al. (1995). "HLA class II on HIV particles is functional in superantigen presentation to human T cells: implications for HIV pathogenesis." *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(12): 1433.
331. Embretson, J., M. Zupancic, et al. (1993). "Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS." *Nature* **362**(6418): 359.
332. Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1993). "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease." *Nature* **362**(6418): 355.
333. Centers for Disease Control and Prevention. *1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults*, [En ligne]. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00018871.htm> (Page consultée le 1 avril 2007).
334. Roos, M. T., J. M. Lange, et al. (1992). "Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Infect Dis* **165**(3): 427.
335. Clark, S. J., M. S. Saag, et al. (1991). "High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection." *N Engl J Med* **324**(14): 954.
336. Nielsen, C., C. Pedersen, et al. (1993). "Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection." *Aids* **7**(8): 1035.
337. Mattapallil, J. J., D. C. Douek, et al. (2005). "Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection." *Nature* **434**(7037): 1093.
338. Scarlatti, G., E. Tresoldi, et al. (1997). "In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression." *Nat Med* **3**(11): 1259.
339. Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." *Cell* **86**(3): 367.
340. Martinson, J. J., N. H. Chapman, et al. (1997). "Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion." *Nat Genet* **16**(1): 100.
341. Gorry, P. R., C. Zhang, et al. (2002). "Persistence of dual-tropic HIV-1 in an individual homozygous for the CCR5 Delta 32 allele." *Lancet* **359**(9320): 1832.

342. Paxton, W. A., S. R. Martin, et al. (1996). "Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure." *Nat Med* **2**(4): 412.
343. Schuitemaker, H., N. A. Kootstra, et al. (1991). "Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture." *J Virol* **65**(1): 356.
344. Schuitemaker, H., M. Koot, et al. (1992). "Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population." *J Virol* **66**(3): 1354.
345. Richman, D. D. and S. A. Bozzette (1994). "The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression." *J Infect Dis* **169**(5): 968.
346. Connor, R. I., K. E. Sheridan, et al. (1997). "Change in coreceptor use coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals." *J Exp Med* **185**(4): 621.
347. Koot, M., A. B. van 't Wout, et al. (1996). "Relation between changes in cellular load, evolution of viral phenotype, and the clonal composition of virus populations in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Infect Dis* **173**(2): 349.
348. Koot, M., I. P. Keet, et al. (1993). "Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS." *Ann Intern Med* **118**(9): 681.
349. Ribeiro, R. M., M. D. Hazenberg, et al. (2006). "Naive and memory cell turnover as drivers of CCR5-to-CXCR4 tropism switch in human immunodeficiency virus type 1: implications for therapy." *J Virol* **80**(2): 802.
350. Fouchier, R. A., M. Groenink, et al. (1992). "Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule." *J Virol* **66**(5): 3183.
351. De Jong, J. J., A. De Ronde, et al. (1992). "Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution." *J Virol* **66**(11): 6777.
352. Resch, W., N. Hoffman, et al. (2001). "Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks." *Virology* **288**(1): 51.

353. Roberts, J. D., K. Bebenek, et al. (1988). "The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1." *Science* **242**(4882): 1171.
354. Brenchley, J. M., T. W. Schacker, et al. (2004). "CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract." *J Exp Med* **200**(6): 749.
355. Rohr, O., C. Marban, et al. (2003). "Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells." *J Leukoc Biol* **74**(5): 736.
356. Somasundaran, M. and H. L. Robinson (1988). "Unexpectedly high levels of HIV-1 RNA and protein synthesis in a cytotoxic infection." *Science* **242**(4885): 1554.
357. Mehandru, S., M. A. Poles, et al. (2007). "Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Virol* **81**(2): 599.
358. Barbeau, B., J. F. Fortin, et al. (1998). "Modulation of human immunodeficiency virus type 1-induced syncytium formation by the conformational state of LFA-1 determined by a new luciferase-based syncytium quantitative assay." *J Virol* **72**(9): 7125.
359. Scheller, C. and C. Jassoy (2001). "Syncytium formation amplifies apoptotic signals: a new view on apoptosis in HIV infection in vitro." *Virology* **282**(1): 48.
360. Gelderblom, H. R., H. Reupke, et al. (1985). "Loss of envelope antigens of HTLV-III/LAV, a factor in AIDS pathogenesis?" *Lancet* **2**(8462): 1016.
361. Herbeuval, J. P. and G. M. Shearer (2007). "HIV-1 immunopathogenesis: How good interferon turns bad." *Clin Immunol* **123**(2): 121.
362. Katsikis, P. D., M. E. Garcia-Ojeda, et al. (1997). "HIV type 1 Tat protein enhances activation-but not Fas (CD95)-induced peripheral blood T cell apoptosis in healthy individuals." *Int Immunol* **9**(6): 835.
363. Mogil, R. J., L. Radvanyi, et al. (1995). "Fas (CD95) participates in peripheral T cell deletion and associated apoptosis in vivo." *Int Immunol* **7**(9): 1451.
364. Yang, Y., I. Tikhonov, et al. (2003). "Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism." *J Virol* **77**(12): 6700.
365. Livingstone, W. J., M. Moore, et al. (1996). "Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group." *Lancet* **348**(9028): 649.

366. Semenzato, G., C. Agostini, et al. (1995). "CD8+ T lymphocytes in the lung of acquired immunodeficiency syndrome patients harbor human immunodeficiency virus type 1." *Blood* **85**(9): 2308.
367. Valentin, A., M. Rosati, et al. (2002). "Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 7015.
368. Kitchen, S. G., Y. D. Korin, et al. (1998). "Costimulation of naive CD8(+) lymphocytes induces CD4 expression and allows human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Virol* **72**(11): 9054.
369. Brenchley, J. M., B. J. Hill, et al. (2004). "T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis." *J Virol* **78**(3): 1160.
370. Azuma, M., M. Cayabyab, et al. (1992). "CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes." *J Exp Med* **175**(2): 353.
371. Fehniger, T. A., M. A. Cooper, et al. (2003). "CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity." *Blood* **101**(8): 3052.
372. Burton, G. F., A. Masuda, et al. (1997). "Follicular dendritic cells (FDC) in retroviral infection: host/pathogen perspectives." *Immunol Rev* **156**: 185.
373. Grouard, G. and E. A. Clark (1997). "Role of dendritic and follicular dendritic cells in HIV infection and pathogenesis." *Curr Opin Immunol* **9**(4): 563.
374. Moir, S., A. Malaspina, et al. (2000). "B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells." *J Exp Med* **192**(5): 637.
375. Blankson, J. N., D. Persaud, et al. (2002). "The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection." *Annu Rev Med* **53**: 557.
376. Pommier, J. P., L. Gauthier, et al. (1997). "Immunosenescence in HIV pathogenesis." *Virology* **231**(1): 148.
377. Reimer, C. B., C. M. Black, et al. (1988). "Hypergammaglobulinemia associated with human immunodeficiency virus infection." *Monogr Allergy* **23**: 83.
378. Kekow, J., G. Hobusch, et al. (1988). "Predominance of the IgG1 subclass in the hypergammaglobulinemia observed in pre-AIDS and AIDS." *Cancer Detect Prev* **12**(1-6): 211.

379. Fauci, A. S., A. M. Macher, et al. (1984). "NIH conference. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations." *Ann Intern Med* **100**(1): 92.
380. Nicholson, J. K., J. S. McDougal, et al. (1984). "Immunoregulatory subsets of the T helper and T suppressor cell populations in homosexual men with chronic unexplained lymphadenopathy." *J Clin Invest* **73**(1): 191.
381. De Milito, A., A. Nilsson, et al. (2004). "Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection." *Blood* **103**(6): 2180.
382. Schnittman, S. M., H. C. Lane, et al. (1986). "Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus." *Science* **233**(4768): 1084.
383. Moir, S., A. Malaspina, et al. (2001). "HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10362.
384. Morris, L., J. M. Binley, et al. (1998). "HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy." *J Exp Med* **188**(2): 233.
385. Butcher, E. C. and L. J. Picker (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." *Science* **272**(5258): 60.
386. Muller, G., U. E. Hopken, et al. (2003). "The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity." *Immunol Rev* **195**: 117.
387. Cyster, J. G. (2005). "Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs." *Annu Rev Immunol* **23**: 127.
388. Miller, M. J., S. H. Wei, et al. (2002). "Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node." *Science* **296**(5574): 1869.
389. Reif, K., E. H. Ekland, et al. (2002). "Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position." *Nature* **416**(6876): 94.
390. Casamayor-Palleja, M., M. Khan, et al. (1995). "A subset of CD4⁺ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex." *J Exp Med* **181**(4): 1293.
391. Beyer, T., M. Meyer-Hermann, et al. (2002). "A possible role of chemotaxis in germinal center formation." *Int Immunol* **14**(12): 1369.

392. van Eijk, M., T. Defrance, et al. (2001). "Death-receptor contribution to the germinal-center reaction." *Trends Immunol* **22**(12): 677.
393. Lindhout, E., G. Koopman, et al. (1997). "Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions." *Immunol Today* **18**(12): 573.
394. Cyster, J. G. (2003). "Homing of antibody secreting cells." *Immunol Rev* **194**: 48.
395. Okada, T. and J. G. Cyster (2006). "B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses." *Curr Opin Immunol* **18**(3): 278.
396. Zhang, K. (2003). "Accessibility control and machinery of immunoglobulin class switch recombination." *J Leukoc Biol* **73**(3): 323.
397. Green, N. S., M. M. Lin, et al. (1998). "Somatic hypermutation of antibody genes: a hot spot warms up." *Bioessays* **20**(3): 227.
398. Liu, Y. J., D. E. Joshua, et al. (1989). "Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres." *Nature* **342**(6252): 929.
399. Sonza, S., A. Maerz, et al. (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes." *J Virol* **70**(6): 3863.
400. Biggs, B. A., M. Hewish, et al. (1995). "HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*." *J Immunol* **154**(11): 6132.
401. Kedzierska, K. and S. M. Crowe (2001). "Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications." *Antivir Chem Chemother* **12**(3): 133.
402. An, S. F., M. Groves, et al. (1999). "Early entry and widespread cellular involvement of HIV-1 DNA in brains of HIV-1 positive asymptomatic individuals." *J Neuropathol Exp Neurol* **58**(11): 1156.
403. Persidsky, Y., H. S. Nottet, et al. (1995). "The development of animal model systems for HIV-1 encephalitis and its associated dementia." *J Neurovirol* **1**(3-4): 229.
404. Resnick, L., J. R. Berger, et al. (1988). "Early penetration of the blood-brain-barrier by HIV." *Neurology* **38**(1): 9.
405. Nottet, H. S., Y. Persidsky, et al. (1996). "Mechanisms for the transendothelial migration of HIV-1-infected monocytes into brain." *J Immunol* **156**(3): 1284.
406. Rowland-Jones, S. L. (1999). "HIV: The deadly passenger in dendritic cells." *Curr Biol* **9**(7): R248.

407. Clark, E. A. (1996). "HIV: dendritic cells as embers for the infectious fire." *Curr Biol* **6**(6): 655.
408. Granelli-Piperno, A., E. Delgado, et al. (1998). "Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells." *J Virol* **72**(4): 2733.
409. Burleigh, L., P. Y. Lozach, et al. (2006). "Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells." *J Virol* **80**(6): 2949.
410. Guo, M. M. and J. E. Hildreth (1995). "HIV acquires functional adhesion receptors from host cells." *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(9): 1007.
411. Fortin, J. F. C., R., Tremblay, M.J. (2001). "Présence des protéines de la cellule hôte sur les particules virales: influences sur le cycle de vie du VIH-1." *Médecine sciences* **17**(2): 186.
412. Fortin, J. F., R. Cantin, et al. (2000). "Interaction between virion-bound host intercellular adhesion molecule-1 and the high-affinity state of lymphocyte function-associated antigen-1 on target cells renders R5 and X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1 more refractory to neutralization." *Virology* **268**(2): 493.
413. Hioe, C. E., L. Bastiani, et al. (1998). "Role of cellular adhesion molecules in HIV type 1 infection and their impact on virus neutralization." *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 3**: S247.
414. Losier, M., J. F. Fortin, et al. (2003). "Virion-bound ICAM-1 and activated LFA-1: a combination of factors conferring resistance to neutralization by sera from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals independently of the disease status and phase." *Clin Immunol* **108**(2): 111.
415. Rizzuto, C. D. and J. G. Sodroski (1997). "Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization." *J Virol* **71**(6): 4847.
416. Beausejour, Y. and M. J. Tremblay (2004). "Susceptibility of HIV type 1 to the fusion inhibitor T-20 is reduced on insertion of host intercellular adhesion molecule 1 in the virus membrane." *J Infect Dis* **190**(5): 894.
417. Saifuddin, M., M. Ghassemi, et al. (1994). "Host cell components affect the sensitivity of HIV type 1 to complement-mediated virolysis." *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(7): 829.

418. Saifuddin, M., C. J. Parker, et al. (1995). "Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1." *J Exp Med* **182**(2): 501.
419. Saifuddin, M., T. Hedayati, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction." *J Gen Virol* **78 (Pt 8)**: 1907.
420. Roy, J., G. Martin, et al. (2005). "HIV type 1 can act as an APC upon acquisition from the host cell of peptide-loaded HLA-DR and CD86 molecules." *J Immunol* **174**(8): 4779.
421. Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., et al. (1992). "Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines." *Science* **258**(5090): 1935.
422. Bounou, S., N. Dumais, et al. (2001). "Attachment of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) particles bearing host-encoded B7-2 proteins leads to nuclear factor-kappa B- and nuclear factor of activated T cells-dependent activation of HIV-1 long terminal repeat transcription." *J Biol Chem* **276**(9): 6359.
423. Giguere, J. F., S. Bounou, et al. (2004). "Insertion of host-derived costimulatory molecules CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) into human immunodeficiency virus type 1 affects the virus life cycle." *J Virol* **78**(12): 6222.
424. Dimitrov, D. S., R. L. Willey, et al. (1993). "Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics." *J Virol* **67**(4): 2182.
425. Layne, S. P., M. J. Merges, et al. (1992). "Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus." *Virology* **189**(2): 695.
426. Piatak, M., Jr., M. S. Saag, et al. (1993). "High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR." *Science* **259**(5102): 1749.
427. Cantin, R., J. F. Fortin, et al. (1997). "The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells." *Blood* **90**(3): 1091.
428. Fortin, J. F., R. Cantin, et al. (1997). "Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity." *J Virol* **71**(5): 3588.

429. Bounou, S., J. E. Leclerc, et al. (2002). "Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo." *J Virol* **76**(3): 1004.
430. Fortin, J. F., R. Cantin, et al. (1998). "T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1." *J Virol* **72**(3): 2105.
431. Tardif, M. R. and M. J. Tremblay (2003). "Presence of host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 virions increases productive infection of CD4+ T lymphocytes by favoring cytosolic delivery of viral material." *J Virol* **77**(22): 12299.
432. Sanders, M. E., M. W. Makgoba, et al. (1988). "Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production." *J Immunol* **140**(5): 1401.
433. Schnittman, S. M., H. C. Lane, et al. (1990). "Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16): 6058.
434. Liao, Z., J. W. Roos, et al. (2000). "Increased infectivity of HIV type 1 particles bound to cell surface and solid-phase ICAM-1 and VCAM-1 through acquired adhesion molecules LFA-1 and VLA-4." *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(4): 355.
435. Bounou, S., J. F. Giguere, et al. (2004). "The importance of virus-associated host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 dissemination depends on the cellular context." *Faseb J* **18**(11): 1294.
436. Lawn, S. D., B. D. Roberts, et al. (2000). "Cellular compartments of human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo: determination by presence of virion-associated host proteins and impact of opportunistic infection." *J Virol* **74**(1): 139.
437. Jalkanen, S. T., R. F. Bargatze, et al. (1986). "A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man." *Eur J Immunol* **16**(10): 1195.
438. Lawn, S. D. and S. T. Butera (2000). "Incorporation of HLA-DR into the envelope of human immunodeficiency virus type 1 in vivo: correlation with stage of disease and presence of opportunistic infection." *J Virol* **74**(21): 10256.

439. Centre de Recherche en Infectiologie. *Réalisations pratiques et transferts technologiques*, [En ligne]. <http://www.cri.ulaval.ca/?473> (Page consultée le 1 avril 2007).
440. Letvin, N. L. (2006). "Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine." *Nat Rev Immunol* **6**(12): 930.
441. Phillips, D. M., V. R. Zacharopoulos, et al. (1994). "Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia?" *Trends Microbiol* **2**(11): 454.
442. International AIDS Vaccine Initiative. *Ongoing Trials of Preventive AIDS Vaccines*, [En ligne]. http://www.iavireport.org/vax/english/VAX_Jan07_Table.pdf (Page consultée le 1 avril 2007).
443. Young, K. R., S. P. McBurney, et al. (2006). "Virus-like particles: designing an effective AIDS vaccine." *Methods* **40**(1): 98.
444. Bachmann, M. F., M. B. Lutz, et al. (1996). "Dendritic cells process exogenous viral proteins and virus-like particles for class I presentation to CD8+ cytotoxic T lymphocytes." *Eur J Immunol* **26**(11): 2595.
445. Deml, L., G. Kratochwil, et al. (1997). "Increased incorporation of chimeric human immunodeficiency virus type 1 gp120 proteins into Pr55gag virus-like particles by an Epstein-Barr virus gp220/350-derived transmembrane domain." *Virology* **235**(1): 10.
446. Reimann, J. and R. Schirmbeck (1999). "Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation." *Immunol Rev* **172**: 131.
447. Skountzou, I., F. S. Quan, et al. (2006). "Transcutaneous immunization with inactivated influenza virus induces protective immune responses." *Vaccine* **24**(35-36): 6110.
448. Zhou, T., L. Xu, et al. (2007). "Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120." *Nature* **445**(7129): 732.
449. HIV Medicine. *Drug classe and overview of antiretroviral agents*, [En ligne]. <http://www.hivmedicine.com/textbook/haart/classes.htm> (Page consultée le 1 avril 2007).
450. Beck, E. J., M. Vitoria, et al. (2006). "National adult antiretroviral therapy guidelines in resource-limited countries: concordance with 2003 WHO guidelines?" *Aids* **20**(11): 1497.

451. Organisation Mondiale de la Santé/ONUSIDA. *Progress on Global Access to HIV Antiretroviral Therapy: an update on «3 by 5»*, [En ligne]. <http://www.who.int/3by5/fullreportJune2005.pdf> (Page consultée le 1 avril 2007).
452. HIV Medicine. *Nucleoside analogs ("nukes", NRTIs)*, [En ligne]. <http://www.hivmedicine.com/textbook/haart/nrti.htm> (Page consultée le 1 avril 2007).
453. HIV Medicine. *Non-Nucleoside reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)*, [En ligne]. <http://www.hivmedicine.com/textbook/haart/nnrti.htm> (Page consultée le 1 avril 2007).
454. Gallant, J. E., E. DeJesus, et al. (2006). "Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV." *N Eng J Med* **354**(3): 251.
455. Ewart, G. D., N. Nasr, et al. (2004). "Potential new anti-human immunodeficiency virus type 1 compounds depress virus replication in cultured human macrophages." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2325.
456. Kaiser, G. E. *Activation of a Naive T4-Lymphocyte by an Antigen-Presenting Cell*, [En ligne]. <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguid/unit5/humoral/abyproduction/t4act1.html> (Page consultée le 1 avril 2007).
457. Amos, C., I. A. Romero, et al. (2001). "Cross-linking of brain endothelial intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 induces association of ICAM-1 with detergent-insoluble cytoskeletal fraction." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(5): 810.
458. Tilghman, R. W. and R. L. Hoover (2002). "E-selectin and ICAM-1 are incorporated into detergent-insoluble membrane domains following clustering in endothelial cells." *FEBS Lett* **525**(1-3): 83.
459. Staunton, D. E., M. L. Dustin, et al. (1990). "The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus." *Cell* **61**(2): 243.
460. Vonderheide, R. H., T. F. Tedder, et al. (1994). "Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding to VLA-4." *J Cell Biol* **125**(1): 215.
461. Freeman, G. J., A. S. Freedman, et al. (1989). "B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells." *J Immunol* **143**(8): 2714.
462. Azuma, M., H. Yssel, et al. (1993). "Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes." *J Exp Med* **177**(3): 845.

463. Wolthers, K. C., S. A. Otto, et al. (1996). "Increased expression of CD80, CD86 and CD70 on T cells from HIV-infected individuals upon activation in vitro: regulation by CD4+ T cells." *Eur J Immunol* **26**(8): 1700.
464. Chambers, C. A. (2001). "The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited." *Trends Immunol* **22**(4): 217.
465. Damle, N. K., K. Klussman, et al. (1992). "Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes." *J Immunol* **148**(7): 1985.
466. Little, C. C., Tyzzer, E.E. (1916). "Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumor of the Japanese waltzing mouse." *J Med Res* **33**: 393.
467. Dausset, J. and A. Nenna (1952). "[Presence of leuko-agglutinin in the serum of a case of chronic agranulocytosis.]" *C R Seances Soc Biol Fil* **146**(19-20): 1539.
468. Dausset, J. (1958). "[Iso-leuko-antibodies.]" *Acta Haematol* **20**(1-4): 156.
469. Payne, R. and M. R. Rolfs (1958). "Fetomaternal leukocyte incompatibility." *J Clin Invest* **37**(12): 1756.
470. Van Rood, J. J., J. G. Eernisse, et al. (1958). "Leucocyte antibodies in sera from pregnant women." *Nature* **181**(4625): 1735.
471. Cresswell, P. (1994). "Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules." *Curr Biol* **4**(6): 541.
472. Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." *Cell* **76**(2): 287.
473. Watts, C. (1997). "Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules." *Annu Rev Immunol* **15**: 821.
474. Taneja, V. and C. S. David (1998). "HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity." *J Clin Invest* **101**(5): 921.
475. Roche, P. A., M. S. Marks, et al. (1991). "Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain." *Nature* **354**(6352): 392.
476. Lamb, C. A. and P. Cresswell (1992). "Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes." *J Immunol* **148**(11): 3478.
477. Bikoff, E. K., L. Y. Huang, et al. (1993). "Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression." *J Exp Med* **177**(6): 1699.

478. Viville, S., J. Neefjes, et al. (1993). "Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain." *Cell* **72**(4): 635.
479. Elliott, E. A., J. R. Drake, et al. (1994). "The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules." *J Exp Med* **179**(2): 681.
480. Pieters, J., O. Bakke, et al. (1993). "The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail." *J Cell Sci* **106** (Pt 3): 831.
481. Odorizzi, C. G., I. S. Trowbridge, et al. (1994). "Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment." *J Cell Biol* **126**(2): 317.
482. Peters, P. J., J. J. Neefjes, et al. (1991). "Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments." *Nature* **349**(6311): 669.
483. Tulp, A., D. Verwoerd, et al. (1994). "Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment." *Nature* **369**(6476): 120.
484. West, M. A., J. M. Lucocq, et al. (1994). "Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells." *Nature* **369**(6476): 147.
485. van Niel, G., R. Wubbolts, et al. (2006). "Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination." *Immunity* **25**(6): 885.
486. Dugast, M., H. Toussaint, et al. (2005). "AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes." *J Biol Chem* **280**(20): 19656.
487. Hiltbold, E. M. and P. A. Roche (2002). "Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway." *Curr Opin Immunol* **14**(1): 30.
488. Riberdy, J. M., J. R. Newcomb, et al. (1992). "HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides." *Nature* **360**(6403): 474.
489. Alfonso, C. and L. Karlsson (2000). "Nonclassical MHC class II molecules." *Annu Rev Immunol* **18**: 113.
490. Alfonso, C., M. Liljedahl, et al. (1999). "The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation." *Immunol Rev* **172**: 255.

491. Kropshofer, H., G. J. Hammerling, et al. (1999). "The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules." *Immunol Rev* **172**: 267.
492. Schmid, D. and C. Munz (2005). "Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy." *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1519.
493. Fernandez, E. M., P. J. O'Toole, et al. (2003). "Interaction of HLA-DR with actin microfilaments." *Hum Immunol* **64**(3): 327.
494. Kaufman, J. F., C. Auffray, et al. (1984). "The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex." *Cell* **36**(1): 1.
495. El Fakhry, Y., M. Bouillon, et al. (2004). "Delineation of the HLA-DR region and the residues involved in the association with the cytoskeleton." *J Biol Chem* **279**(18): 18472.
496. Columbia University. *MHC Molecules: Structure and Genetics*, [En ligne]. http://healthsciences.columbia.edu/dept/ps/2007/immuno/2006/transcript_02_immuno09.pdf (Page consultée 1 avril 2007).
497. Schonbeck, U. and P. Libby (2001). "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad." *Cell Mol Life Sci* **58**(1): 4.
498. Stamenkovic, I., E. A. Clark, et al. (1989). "A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas." *Embo J* **8**(5): 1403.
499. Valle, A., C. E. Zuber, et al. (1989). "Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4." *Eur J Immunol* **19**(8): 1463.
500. Clark, E. A. (1990). "CD40: a cytokine receptor in search of a ligand." *Tissue Antigens* **36**(1): 33.
501. Uckun, F. M., K. Gajl-Peczalska, et al. (1990). "Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human B-cell ontogeny and the efficacy of anti-CD40 immunotoxins against clonogenic B-lineage acute lymphoblastic leukemia as well as B-lineage non-Hodgkin's lymphoma cells." *Blood* **76**(12): 2449.
502. Ware, C. F., P. D. Crowe, et al. (1991). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells." *J Immunol* **147**(12): 4229.
503. Indzhia, L. V., L. A. Yakovleva, et al. (1992). "Baboon T cell lymphomas expressing the B cell-associated surface proteins CD40 and Bgp95." *J Clin Immunol* **12**(3): 225.

504. Alderson, M. R., R. J. Armitage, et al. (1993). "CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40." *J Exp Med* **178**(2): 669.
505. van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." *J Leukoc Biol* **67**(1): 2.
506. Gerritse, K., J. D. Laman, et al. (1996). "CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6): 2499.
507. Freudenthal, P. S. and R. M. Steinman (1990). "The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19): 7698.
508. Inwald, D. P., A. McDowall, et al. (2003). "CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation." *Circ Res* **92**(9): 1041.
509. Ruggiero, G., E. M. Caceres, et al. (1996). "CD40 expressed on thymic epithelial cells provides costimulation for proliferation but not for apoptosis of human thymocytes." *J Immunol* **156**(10): 3737.
510. Yellin, M. J., S. Winikoff, et al. (1995). "Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation." *J Leukoc Biol* **58**(2): 209.
511. Clark, E. A. and J. A. Ledbetter (1986). "Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(12): 4494.
512. Braesch-Andersen, S., S. Paulie, et al. (1989). "Biochemical characteristics and partial amino acid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CDw40." *J Immunol* **142**(2): 562.
513. Van Den Berg, T. K., J. Hasbold, et al. (1996). "Properties of mouse CD40: differential expression of CD40 epitopes on dendritic cells and epithelial cells." *Immunology* **88**(2): 294.
514. Kaykas, A., K. Worringer, et al. (2001). "CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex." *Embo J* **20**(11): 2641.
515. Pham, L. V., A. T. Tamayo, et al. (2002). "A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas." *Immunity* **16**(1): 37.

516. Nguyen, V. T., W. S. Walker, et al. (1998). "Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor-beta." *Eur J Immunol* **28**(8): 2537.
517. Andre, P., K. S. Prasad, et al. (2002). "CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism." *Nat Med* **8**(3): 247.
518. Leveille, C., M. Bouillon, et al. (2007). "CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling." *J Biol Chem* **282**(8): 5143.
519. Lane, P., A. Traunecker, et al. (1992). "Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes." *Eur J Immunol* **22**(10): 2573.
520. Gauchat, J. F., J. P. Aubry, et al. (1993). "Human CD40-ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production." *FEBS Lett* **315**(3): 259.
521. Carbone, E., G. Ruggiero, et al. (1997). "A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction." *J Exp Med* **185**(12): 2053.
522. Grammer, A. C., M. C. Bergman, et al. (1995). "The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses." *J Immunol* **154**(10): 4996.
523. Gauchat, J. F., S. Henchoz, et al. (1993). "Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils." *Nature* **365**(6444): 340.
524. Gauchat, J. F., S. Henchoz, et al. (1995). "CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils." *Eur J Immunol* **25**(3): 863.
525. Mach, F., U. Schonbeck, et al. (1997). "Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1931.
526. Salgado, C. G., K. Nakamura, et al. (1999). "Functional CD40 ligand is expressed on epidermal Langerhans cells." *J Leukoc Biol* **66**(2): 281.
527. Pinchuk, L. M., S. J. Klaus, et al. (1996). "Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation." *J Immunol* **157**(10): 4363.
528. Henn, V., J. R. Slupsky, et al. (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." *Nature* **391**(6667): 591.
529. Lederman, S., M. J. Yellin, et al. (1992). "Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B-cell-

- activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help." *J Immunol* **149**(12): 3817.
530. Ehrenstein, M. R., E. C. Jury, et al. (2005). "Statins for atherosclerosis--as good as it gets?" *N Engl J Med* **352**(1): 73.
531. Graf, D., S. Muller, et al. (1995). "A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation." *Eur J Immunol* **25**(6): 1749.
532. Ludewig, B., V. Henn, et al. (1996). "Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4⁺ CD45RA⁺ T cells with dendritic cells." *Eur J Immunol* **26**(12): 3137.
533. Wykes, M., J. Poudrier, et al. (1998). "Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells." *Eur J Immunol* **28**(2): 548.
534. Hsu, Y. M., J. Lucci, et al. (1997). "Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes." *J Biol Chem* **272**(2): 911.
535. Wingett, D. and C. P. Nielson (2002). "Cyclic AMP differentially modulates CD40L expression on human naive and memory CD4(+) T cells." *Biochem Pharmacol* **64**(7): 1169.
536. van Rijen, M. M., M. L. Kuijf, et al. (2002). "CD154 is expressed during treatment with calcineurin inhibitors after organ transplantation." *Transplantation* **73**(10): 1666.
537. Tsytsykova, A. V., E. N. Tsitsikov, et al. (1996). "The CD40L promoter contains nuclear factor of activated T cells-binding motifs which require AP-1 binding for activation of transcription." *J Biol Chem* **271**(7): 3763.
538. Crow, M. K. and K. A. Kirou (2001). "Regulation of CD40 ligand expression in systemic lupus erythematosus." *Curr Opin Rheumatol* **13**(5): 361.
539. Subauste, C. S., M. Wessendarp, et al. (2001). "Role of CD40 ligand signaling in defective type 1 cytokine response in human immunodeficiency virus infection." *J Infect Dis* **183**(12): 1722.
540. Subauste, C. S., M. Wessendarp, et al. (2004). "Pathogen-specific induction of CD154 is impaired in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected patients." *J Infect Dis* **189**(1): 61.
541. Yellin, M. J., K. Sippel, et al. (1994). "CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function." *J Immunol* **152**(2): 598.

542. Roy, M., T. Waldschmidt, et al. (1993). "The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells." *J Immunol* **151**(5): 2497.
543. Castle, B. E., K. Kishimoto, et al. (1993). "Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes." *J Immunol* **151**(4): 1777.
544. de Boer, M., A. Kasran, et al. (1993). "Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells." *Eur J Immunol* **23**(12): 3120.
545. Klaus, S. J., L. M. Pinchuk, et al. (1994). "Costimulation through CD28 enhances T cell-dependent B cell activation via CD40-CD40L interaction." *J Immunol* **152**(12): 5643.
546. Johnson-Leger, C., J. Christensen, et al. (1998). "CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells." *Int Immunol* **10**(8): 1083.
547. Shibuya, H., T. Nagai, et al. (2003). "Differential regulation of Th1 responses and CD154 expression in human CD4+ T cells by IFN-alpha." *Clin Exp Immunol* **132**(2): 216.
548. Kytтарыs, V. C., Y. Wang, et al. (2007). "Increased levels of NF-ATc2 differentially regulate CD154 and IL-2 genes in T cells from patients with systemic lupus erythematosus." *J Immunol* **178**(3): 1960.
549. Wang, C. R. and M. F. Liu (2003). "Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis." *Clin Exp Immunol* **132**(2): 371.
550. Koshy, M., D. Berger, et al. (1996). "Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes." *J Clin Invest* **98**(3): 826.
551. Filion, L. G., D. Matusевичius, et al. (2003). "Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis." *Clin Immunol* **106**(2): 127.
552. Lederer, S. R., N. Friedrich, et al. (2004). "Reduced CD40L expression on ex vivo activated CD4+ T-lymphocytes from patients with excellent renal allograft function measured with a rapid whole blood flow cytometry procedure." *Int Arch Allergy Immunol* **133**(3): 276.
553. Toubi, E. and Y. Shoenfeld (2004). "The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway." *Autoimmunity* **37**(6-7): 457.
554. Glushakova, S., B. Baibakov, et al. (1995). "Infection of human tonsil histocultures: a model for HIV pathogenesis." *Nat Med* **1**(12): 1320.

555. Merck. *Tonsils and Adenoids (Enlarged)*, [En ligne]. <http://www.merck.com/mmhe/sec23/ch276/ch276e.html> (Page consultée le 1 avril 2007).
556. Boss, J. M. (1999). "A common set of factors control the expression of the MHC class II, invariant chain, and HLA-DM genes." *Microbes Infect* **1**(11): 847.
557. Mach, B., V. Steimle, et al. (1996). "Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease." *Annu Rev Immunol* **14**: 301.
558. Henderson, D. K., A. J. Saah, et al. (1986). "Risk of nosocomial infection with human T-cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in a large cohort of intensively exposed health care workers." *Ann Intern Med* **104**(5): 644.
559. Frank, I., L. Kacani, et al. (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 derived from cocultures of immature dendritic cells with autologous T cells carries T-cell-specific molecules on its surface and is highly infectious." *J Virol* **73**(4): 3449.
560. Trubey, C. M., E. Chertova, et al. (2003). "Quantitation of HLA class II protein incorporated into human immunodeficiency type 1 virions purified by anti-CD45 immunoaffinity depletion of microvesicles." *J Virol* **77**(23): 12699.
561. Boes, M., J. Cerny, et al. (2002). "T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport." *Nature* **418**(6901): 983.
562. Chow, A., D. Toomre, et al. (2002). "Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane." *Nature* **418**(6901): 988.
563. Thery, C., L. Zitvogel, et al. (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." *Nat Rev Immunol* **2**(8): 569.
564. Foy, T. M., D. M. Shepherd, et al. (1993). "In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39." *J Exp Med* **178**(5): 1567.
565. Van den Eertwegh, A. J., R. J. Noelle, et al. (1993). "In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions." *J Exp Med* **178**(5): 1555.
566. Foy, T. M., J. D. Laman, et al. (1994). "gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory." *J Exp Med* **180**(1): 157.

567. Peitsch, M. C. and C. V. Jongeneel (1993). "A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors." *Int Immunol* **5**(2): 233.
568. Fanslow, W. C., S. Srinivasan, et al. (1994). "Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function." *Semin Immunol* **6**(5): 267.
569. Pullen, S. S., M. E. Labadia, et al. (1999). "High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization." *Biochemistry* **38**(31): 10168.
570. Kehry, M. R. (1996). "CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death." *J Immunol* **156**(7): 2345.
571. Graf, D., U. Korthauer, et al. (1992). "Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells." *Eur J Immunol* **22**(12): 3191.
572. Pullen, S. S., T. T. Dang, et al. (1999). "CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs." *J Biol Chem* **274**(20): 14246.
573. Ishida, T. K., T. Tojo, et al. (1996). "TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9437.
574. Nakano, H., H. Oshima, et al. (1996). "TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor." *J Biol Chem* **271**(25): 14661.
575. Rothe, M., M. G. Pan, et al. (1995). "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." *Cell* **83**(7): 1243.
576. Faris, M., F. Gaskin, et al. (1994). "CD40 signaling pathway: anti-CD40 monoclonal antibody induces rapid dephosphorylation and phosphorylation of tyrosine-phosphorylated proteins including protein tyrosine kinase Lyn, Fyn, and Syk and the appearance of a 28-kD tyrosine phosphorylated protein." *J Exp Med* **179**(6): 1923.
577. Ren, C. L., T. Morio, et al. (1994). "Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2." *J Exp Med* **179**(2): 673.
578. Berberich, I., G. Shu, et al. (1996). "Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases." *Embo J* **15**(1): 92.

579. Hanissian, S. H. and R. S. Geha (1997). "Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells." *Immunity* **6**(4): 379.
580. Karras, J. G., Z. Wang, et al. (1997). "Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) is constitutively activated in normal, self-renewing B-1 cells but only inducibly expressed in conventional B lymphocytes." *J Exp Med* **185**(6): 1035.
581. Lee, H. H., P. W. Dempsey, et al. (1999). "Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1421.
582. Xia, Y. F., L. P. Liu, et al. (2001). "NF-kappaB activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells." *Biochem Biophys Res Commun* **289**(4): 851.
583. Sarma, V., Z. Lin, et al. (1995). "Activation of the B-cell surface receptor CD40 induces A20, a novel zinc finger protein that inhibits apoptosis." *J Biol Chem* **270**(21): 12343.
584. Schaffer, A., A. Cerutti, et al. (1999). "The evolutionarily conserved sequence upstream of the human Ig heavy chain S gamma 3 region is an inducible promoter: synergistic activation by CD40 ligand and IL-4 via cooperative NF-kappa B and STAT-6 binding sites." *J Immunol* **162**(9): 5327.
585. Agresti, A. and D. Vercelli (2002). "c-Rel is a selective activator of a novel IL-4/CD40 responsive element in the human Ig gamma4 germline promoter." *Mol Immunol* **38**(11): 849.
586. Fujieda, S., K. Zhang, et al. (1995). "IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells gamma subclass-specific isotype switch: switching to gamma 1, gamma 3, and gamma 4, but not gamma 2." *J Immunol* **155**(5): 2318.
587. Defrance, T., B. Vanbervliet, et al. (1992). "Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A." *J Exp Med* **175**(3): 671.
588. Chu, Y. W., E. Marin, et al. (1995). "Somatic mutation of human immunoglobulin V genes in the X-linked HyperIgM syndrome." *J Clin Invest* **95**(3): 1389.
589. Perez-Melgosa, M., D. Hollenbaugh, et al. (1999). "Cutting edge: CD40 ligand is a limiting factor in the humoral response to T cell-dependent antigens." *J Immunol* **163**(3): 1123.
590. Muller, F., P. Aukrust, et al. (1998). "Possible role of interleukin-10 (IL-10) and CD40 ligand expression in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in human immunodeficiency virus infection: modulation of IL-10 and Ig production after intravenous Ig infusion." *Blood* **92**(10): 3721.

591. Subauste, C. S., A. Subauste, et al. (2007). "Role of CD40-dependent down-regulation of CD154 in impaired induction of CD154 in CD4(+) T cells from HIV-1-infected patients." *J Immunol* **178**(3): 1645.
592. Giavedoni, L. D., M. C. Velasquillo, et al. (2000). "Cytokine expression, natural killer cell activation, and phenotypic changes in lymphoid cells from rhesus macaques during acute infection with pathogenic simian immunodeficiency virus." *J Virol* **74**(4): 1648.
593. Langhoff, E., E. F. Terwilliger, et al. (1991). "Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary dendritic cell cultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(18): 7998.
594. Granelli-Piperno, A., I. Shimeliovich, et al. (2006). "HIV-1 selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood." *J Immunol* **176**(2): 991.
595. Young, J. L., J. M. Ramage, et al. (1997). "In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells." *Eur J Immunol* **27**(9): 2383.
596. Akbar, A. N., L. Terry, et al. (1988). "Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells." *J Immunol* **140**(7): 2171.
597. Smith, S. H., M. H. Brown, et al. (1986). "Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1." *Immunology* **58**(1): 63.
598. Hall, S. R., B. M. Heffernan, et al. (1999). "CD4+ CD45RA+ and CD4+ CD45RO+ T cells differ in their TCR-associated signaling responses." *Eur J Immunol* **29**(7): 2098.
599. Sigova, A., E. Dedkova, et al. (1999). "A comparative study of the calcium system in memory T cells and naive T cells." *FEBS Lett* **447**(1): 34.
600. Nagelkerken, L. and A. Hertogh-Huijbregts (1992). "The acquisition of a memory phenotype by murine CD4+ T cells is accompanied by a loss in their capacity to increase intracellular calcium." *Dev Immunol* **3**(1): 25.
601. Nusslein, H. G., K. H. Frosch, et al. (1996). "Increase of intracellular calcium is the essential signal for the expression of CD40 ligand." *Eur J Immunol* **26**(4): 846.
602. Barrett, T. B., G. Shu, et al. (1991). "CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells." *J Immunol* **146**(6): 1722.
603. Wu, L., J. Fan, et al. (2000). "Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages." *Biochem Biophys Res Commun* **269**(3): 808.

604. Chase, A. J., M. Bond, et al. (2002). "Role of nuclear factor-kappa B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(5): 765.
605. Ghorpade, A., R. Persidskaia, et al. (2001). "Mononuclear phagocyte differentiation, activation, and viral infection regulate matrix metalloproteinase expression: implications for human immunodeficiency virus type 1-associated dementia." *J Virol* **75**(14): 6572.
606. Pascual, V., Y. J. Liu, et al. (1994). "Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil." *J Exp Med* **180**(1): 329.
607. Litinskiy, M. B., B. Nardelli, et al. (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL." *Nat Immunol* **3**(9): 822.
608. Dedeoglu, F., B. Horwitz, et al. (2004). "Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB." *Int Immunol* **16**(3): 395.
609. Gye, W. E., Purdy, W.J. (1933). "The infective agent in tumor filtrates: a further investigation by means of antisera to normal tissues." *Brit. J. Exp. Path.* **14**: 250.
610. Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., et al. (1995). "Macaques immunized with HLA-DR are protected from challenge with simian immunodeficiency virus." *J Virol* **69**(5): 3117.
611. Kiprov, D. D., H. W. Sheppard, et al. (1994). "Alloimmunization to prevent AIDS?" *Science* **263**(5148): 737.
612. Shearer, G. M., M. Clerici, et al. (1993). "Alloimmunization as an AIDS vaccine?" *Science* **262**(5131): 161.