

SANDRA THIBAUT

**EFFET DE LA STIMULATION DES TLR SUR
L'INFECTION PAR LE VIH-1 DES LYMPHOCYTES
T CD4+ ET DES CELLULES DENDRITIQUES
PRIMAIRES**

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

2008

Résumé

Depuis sa découverte en 1983, le virus du SIDA ne cesse de faire des ravages. Malgré l'apparition de la thérapie HAART, qui permet de prolonger l'espérance de vie des individus atteints, aucun traitement n'est actuellement disponible pour prévenir ou éradiquer complètement l'infection. Le virus mute beaucoup ce qui lui confère rapidement une résistance à l'ensemble des traitements utilisés. L'objectif actuel du monde scientifique est donc de développer d'autres cibles qui pourraient restreindre les effets indésirables des médicaments actuels tout en diminuant l'émergence de souches virales résistantes. Afin de développer ces nouveaux traitements, il est essentiel de mieux comprendre le comportement du virus et ce, sous diverses conditions de l'organisme. Mon projet de doctorat s'inscrit dans cette thématique puisqu'il a permis d'étudier le comportement du virus suite à la stimulation du TLR2, un récepteur essentiel à la reconnaissance, entre autre, de structures spécifiques des bactéries Gram positives. L'objectif global consistait à déterminer si la stimulation de ce TLR, par un ligand synthétique, avait des effets sur l'état d'activation et le taux d'infection des lymphocytes T CD4+ naïfs et mémoires de même que celui des cellules dendritiques. Les résultats obtenus indiquent que la stimulation du TLR2 augmente l'infection de ces deux types cellulaires et favorise également le transfert du virus des cellules dendritiques aux lymphocytes T CD4+. Sachant que l'activation des cellules favorise l'infection par le VIH-1 et que les produits bactériens présents dans la circulation sanguine lors de la translocation microbienne activent les lymphocytes T CD4+ et les cellules dendritiques, toutes les conditions sont alors réunies pour mener à une hyperactivation des cellules immunes. Ces résultats démontrent que la reconnaissance des produits microbiens par les TLR participe à la dissémination de l'infection en favorisant l'activation de cellules permissives à l'infection.

Abstract

Since its discovery in 1983, HIV-1 continues to destroy many people lives and no treatment is actually available to treat or prevent infection. Despite the utilization of HAART therapy, the epidemy is still increasing and the worldwide really need new treatments. Due to his high capacity of mutations, HIV-1 rapidly develops resistance against all available treatments. The major aim of scientific community is to develop new therapeutics using different targets to try to avoid and control the resistance phenomenon. To develop these treatments, it is very important to acquire a better understanding of the HIV-1 biology. My doctorate project is tightly related to this because it permits to study the reaction of HIV-1 following TLR2 stimulation, a receptor very useful to sense pathogens. Since microbial translocation is a phenomenon frequently observed in HIV-1-patients, characterized by the presence of bacterial compounds into bloodstream, we evaluated if TLR2 stimulation, with a synthetic ligand, could modulated infection process. Our global objective was to determine if this stimulation could change the activation state and influence the infection in both CD4+ T lymphocytes and dendritic cells. Our results confirmed that TLR2 stimulation increases infection in both cell subtypes and also increases the transfer of viruses from dendritic cells to CD4+ T lymphocytes. Knowing that cell activation favors HIV-1 infection and that bacterial compounds present into bloodstream during microbial translocation stimulate TLR2 stimulation activates CD4+ T cells and dendritic cells, all conditions are put together to favors hyperactivation of the immune system. Our results demonstrate that TLR2 stimulation participates to HIV-1 dissemination by triggering activation of immune cells.

Avant-Propos

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Dr. Michel J. Tremblay pour m'avoir donné la chance d'évoluer au sein de son laboratoire. Son ouverture d'esprit et sa motivation pour tout ce qui se rapporte à la science ont fait de moi, j'en suis certaine, une meilleure scientifique. J'ai adoré travailler entourée de gens remplis de divers talents et surtout aptes à répondre à mes nombreuses questions.

Je voudrais remercier plus particulièrement Dr. Mélanie Tardif qui m'a guidée et a été en quelque sorte mon modèle. Son intégrité, sa ténacité et ses nombreuses idées toujours bien fondées m'ont permis d'avancer rapidement et de poursuivre des études doctorales à la hauteur de mes espérances. Je voudrais aussi remercier des amis qui ont été précieux pendant toutes ces années et qui m'ont permis de libérer certaines frustrations mais également avec lesquels j'ai eu des fous rires que je n'oublierai pas. Je tiens donc à remercier Juliette Diou, Sonia Gauthier, Émilie Maurais, Rémi Fromentin et Alexandra Lambert. Un gros merci également à Marjorie Perron, Mathieu Coulombe et Virginie Gauvreau qui ont toujours été là pour m'écouter et me remonter le moral.

La recherche étant ce qu'elle est, je me dois de remercier les organismes subventionnaires qui ont financé de près ou de loin mes études doctorales et plus particulièrement les Instituts de Recherche et Santé du Canada.

Finalement, je tiens à remercier mon compagnon de tous les jours, qui me supporte depuis si longtemps et avec qui chaque jour est comme le premier et ma mère car sans elle je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui.

Merci à tous,

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Résumé..... | i |
| Abstract..... | ii |
| Avant-Propos | iii |
| Table des matières | iv |
| Liste des tableaux..... | ix |
| Liste des figures..... | 10 |
| Liste des abréviations..... | 11 |
| Chapitre 1. Le virus de l'immunodéficience humaine..... | 14 |
| 1.1 L'épidémie du SIDA..... | 14 |
| <i>1.1.1 L'épidémiologie</i> | <i>14</i> |
| <i>1.1.2 La découverte du VIH.....</i> | <i>14</i> |
| <i>1.1.3 Les origines du VIH</i> | <i>16</i> |
| 1.2 Le VIH..... | 17 |
| <i>1.2.1 Les Lentivirus.....</i> | <i>18</i> |
| <i>1.2.2 Les différents groupes, types et sous-types</i> | <i>18</i> |
| <i>1.2.3 L'organisation génomique du VIH-1.....</i> | <i>19</i> |
| <i>1.2.4 La morphologie du VIH-1.....</i> | <i>21</i> |
| 1.3 Le tropisme | 26 |

| | |
|---|----|
| 1.3.1 Le récepteur primaire et les différents co-récepteurs..... | 26 |
| 1.3.2 Les types cellulaires infectés par le VIH-1 | 28 |
| 1.4 Le cycle réplicatif | 36 |
| 1.4.1 L'attachement | 37 |
| 1.4.2 L'entrée | 39 |
| 1.4.3 La décapsidation, la rétro-transcription et le transport de l'ADN viral au noyau | 43 |
| 1.4.4 L'intégration..... | 44 |
| 1.4.5 L'expression génique | 45 |
| 1.4.6 L'assemblage et le bourgeonnement..... | 47 |
| 1.4.7 La maturation des particules virales | 50 |
| 1.5 La défense de l'hôte face à l'infection..... | 50 |
| 1.6 La pathogenèse | 52 |
| 1.6.1 La transmission..... | 53 |
| 1.6.2 La primo-infection | 53 |
| 1.6.3 La phase chronique..... | 54 |
| 1.6.4 Le stade SIDA | 57 |
| 1.7 Les traitements..... | 57 |
| 1.7.1 Les antirétroviraux | 58 |

| | |
|--|----|
| 1.7.2 <i>Les nouveaux traitements</i> | 62 |
| 1.7.3 <i>L'immunothérapie</i> | 62 |
| 1.8 <i>Conclusion</i> | 63 |
| Chapitre 2. Les récepteurs Toll-like | 64 |
| 2.1 La découverte des récepteurs Toll | 64 |
| 2.2 La structure des récepteurs Toll-like | 65 |
| 2.3 L'expression des différents récepteurs Toll-like | 66 |
| 2.3.1 <i>Les TLR exprimés selon les types cellulaires</i> | 66 |
| 2.4 Les différents ligands..... | 71 |
| 2.4.1 <i>La reconnaissance des bactéries</i> | 71 |
| 2.4.2 <i>La reconnaissance des mycobactéries</i> | 75 |
| 2.4.3 <i>La reconnaissance fongique</i> | 76 |
| 2.4.4 <i>La reconnaissance des protozoaires et parasites</i> | 77 |
| 2.4.5 <i>La reconnaissance des virus</i> | 77 |
| 2.5 Les différentes voies de signalisation | 79 |
| 2.5.1 <i>Les voies MyD88-dépendantes</i> | 80 |
| 2.5.2 <i>Les voies MyD88-indépendantes</i> | 83 |
| 2.6 Les TLR et le VIH-1 | 84 |
| Chapitre III. Hypothèse et objectifs de recherche..... | 88 |

| | |
|--|---------|
| 3.1 Hypothèse de recherche | 88 |
| 3.2 Objectifs de recherche | 88 |
| 3.3 Aperçu des résultats et contributions scientifiques..... | 89 |
| Chapitre IV. La signalisation engendrée par la stimulation du TLR2 rend les cellules T CD4+ quiescentes, naïves et mémoires, susceptibles à l'infection par le VIH-1 de type X4 ou R5..... | 91 |
| 4.1 Résumé..... | 91 |
| 4.2 Article | 92 |
| Chapitre V. La stimulation des TLR2 et TLR4 exerce des effets contraires sur l'infection par le VIH-1 des cellules dendritiques humaines et le transfert subséquent aux lymphocytes T CD4+ | 146 |
| 5.1 Résumé..... | 146 |
| 5.2 Article | 147 |
| Chapitre VI. La stimulation du TLR5 est suffisante pour activer NF-κB et réactiver les provirus VIH-1 latents dans les lymphocytes T CD4+..... | 195 |
| 6.1 Résumé..... | 195 |
| 6.2 Article | 196 |
| Chapitre VII. Discussion générale..... | 215 |
| 7.1 Pourquoi le choix du TLR2?..... | 217 |
| 7.2 Les ligands du TLR2..... | 217 |

| | |
|--|-----|
| 7.3 La latence et le TLR2..... | 219 |
| 7.4 Les variations dans l'expression du TLR2 pendant une infection VIH-1 | 219 |
| 7.5 L'utilisation des ligands des récepteurs Toll-like comme adjuvants..... | 221 |
| 7.6 Tirer profit des récepteurs Toll-like solubles..... | 223 |
| 7.7 Autres perspectives | 225 |
| Chapitre VIII. Conclusions générales..... | 230 |
| Bibliographie | 231 |
| Annexe 1. Article supplémentaire | 280 |
| Résumé..... | 280 |
| Article | 281 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1. Rôles des protéines régulatrices et accessoires du VIH-1 | 25 |
| Tableau 2. Expression des différents TLR selon le type cellulaire | 68 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Répartition des personnes vivant avec le virus du SIDA dans le monde | 15 |
| Figure 2. Organisation génomique du VIH-1 | 20 |
| Figure 3. Représentation du LTR du VIH-1 | 21 |
| Figure 4. Structure du VIH-1 | 22 |
| Figure 5. Cycle réplicatif du VIH | 36 |
| Figure 6. Cycle réplicatif chez les lymphocytes T CD4+ et les macrophages | 41 |
| Figure 7. Les cibles thérapeutiques..... | 59 |
| Figure 8. La structure des TLR..... | 65 |
| Figure 9. Les différents ligands des TLR | 71 |
| Figure 10. Structure des parois de bactéries Gram positives et négatives..... | 73 |
| Figure 11. Principales voies de signalisation des TLR..... | 84 |

Liste des abréviations

| | |
|----------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| ADNv | Acide désoxyribonucléique viral |
| ALT | Asymptomatique à long terme |
| AP-1 | Protéine activatrice 1 |
| APOBEC3G | de l'anglais <i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G</i> |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ARNt | Acide ribonucléique de transfert |
| ARNv | Acide ribonucléique viral |
| ARV | de l'anglais <i>AIDS-associated retrovirus</i> |
| AZT | Azidothymidine |
| Btk | de l'anglais <i>Bruton's tyrosine kinase</i> |
| CA | Capside |
| CD | Cellule dendritique |
| CDm | Cellule dendritique myéloïde |
| CDp | Cellule dendritique plasmacytoïde |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CTL | Cellule T CD8+ cytotoxique |
| CPA | Cellule présentatrice d'antigène |
| CPI | Complexe de pré-intégration |
| DCIR | de l'anglais <i>Dendritic cell immunoreceptor</i> |
| DC-SIGN | de l'anglais <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin</i> |
| HAART | de l'anglais <i>Highly active antiretroviral therapy</i> |
| HTLV-III | de l'anglais <i>Human T-cell lymphotropic virus type III</i> |

| | |
|----------------|--|
| ICAM-1 | Molécule d'adhésion intercellulaire 1 |
| IN | Intégrase |
| IFN α | Interféron α |
| IFN β | Interféron β |
| IFN γ | Interféron γ |
| IRF | de l'anglais <i>IFN regulatory factor</i> |
| ISRE | de l'anglais <i>IFN-stimulated response element</i> |
| kDa | KiloDalton |
| LAV | de l'anglais <i>lymphadenopathy-associated virus</i> |
| LM | Lipomannane |
| LAM | Lipoarabinomannane |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LTA | de l'anglais <i>Lipotechoic acid</i> |
| LTR | de l'anglais <i>Long terminal repeat</i> |
| MA | Matrice |
| MVB | de l'anglais <i>Multivesicular bodies</i> |
| MAPK | de l'anglais <i>Mitogen activated protein kinase</i> |
| NC | Nucléocapside |
| NEMO | de l'anglais <i>NF-κB essential modulator</i> |
| NFAT | de l'anglais <i>Nuclear factor of activated T cells</i> |
| NF- κ B | de l'anglais <i>Nuclear factor of kappa B</i> |
| NK | de l'anglais <i>Natural killer</i> |
| NKT | de l'anglais <i>Natural killer T cells</i> |
| NRE | de l'anglais <i>Negative regulatory element</i> |
| NRTI | de l'anglais <i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i> |
| NNRTI | de l'anglais <i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i> |
| PAMP | de l'anglais <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> |
| PBS | de l'anglais <i>Primer binding site</i> |

| | |
|----------------|---|
| PDI | de l'anglais <i>Protein disulfide isomerase</i> |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate |
| PG | Peptidoglycan |
| PHA | Phytohémagglutinine |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-kinase |
| PLL | Protéine liant le LPS |
| PRR | de l'anglais <i>Pattern recognition receptor</i> |
| RCT | Récepteur des cellules T |
| RRE | de l'anglais <i>Rev responsive element</i> |
| RRL | Répétition riche en leucines |
| RT | Rétro-transcription |
| SIDA | Syndrome de l'immunodéficience acquise |
| SLN | Signal de localisation nucléaire |
| TAB | de l'anglais <i>TAK-1-binding protein</i> |
| TAK1 | de l'anglais <i>TGF-β-activated kinase 1</i> |
| TAR | de l'anglais <i>Transactivation response region</i> |
| TBK1 | de l'anglais <i>TRAF-family member associated NF-κB activator (TANK)-binding kinase 1</i> |
| TI | Transcriptase inverse |
| TLR | de l'anglais <i>Toll-like receptor</i> |
| Tmc | Cellule T mémoire centrale |
| Tme | Cellule T mémoire effectrice |
| TRIM5 α | de l'anglais <i>Tripartite motif 5α</i> |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |
| VIS | Virus de l'immunodéficience simienne |
| VSV | Virus de la stomatite vésiculaire |
| VRS | Virus respiratoire syncitial |

Chapitre 1. Le virus de l'immunodéficience humaine

1.1 L'épidémie du SIDA

Depuis maintenant vingt-cinq ans, le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie qui ne cesse de gagner du terrain et ce, dans le monde entier. Causée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), cette maladie demeure une des principales causes de mortalité dans le monde entier. Bien que certains pays soient peu touchés par cette infection, les pays en voie de développement demeurent toujours les plus atteints. Certes, beaucoup de progrès ont été faits depuis l'avènement des antirétroviraux et de la trithérapie mais il reste beaucoup à faire pour trouver des solutions qui permettront d'améliorer la qualité de vie des gens infectés et ultimement d'éradiquer ce pathogène de la surface de la planète.

1.1.1 L'épidémiologie

Selon les plus récentes statistiques de l'ONUSIDA, près de 33 millions de personnes vivent actuellement avec le virus du SIDA. Les régions les plus touchées demeurent l'Afrique Sub-saharienne et l'Asie du Sud-est (figure 1). Malheureusement, malgré le fait que la prévalence se stabilise, en partie grâce à la prévention, le nombre total de personnes vivant avec le virus du SIDA dans le monde ne cesse d'augmenter.

1.1.2 La découverte du VIH

C'est au cours de l'année 1983 que le VIH fut identifié pour la première fois suite à l'isolement d'un rétrovirus isolé de ganglions d'un patient souffrant d'une

lymphoadénopathie à l'Institut Pasteur de Paris, dans les laboratoires du Dr. Montagnier (1). Cette information fut par la suite confirmée par l'équipe du Dr. Gallo dans un laboratoire de Baltimore (1-3). Comme c'est souvent le cas lors de nouvelles découvertes, plusieurs noms lui furent attribués: LAV (de l'anglais *lymphadenopathy-associated virus*); HTLV-III (de l'anglais *human T-cell lymphotropic virus type III*); et ARV (de l'anglais *AIDS-associated retrovirus*). Ce n'est qu'en 1986 que le Comité International de Taxonomie des virus a recommandé le nom qu'on lui connaît aujourd'hui, VIH.

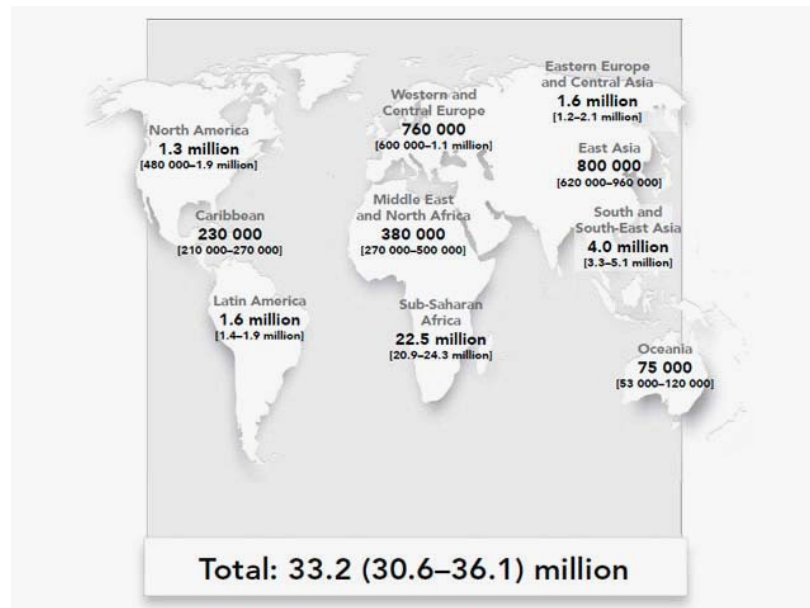


Figure 1. Répartition des personnes vivant avec le virus du SIDA dans le monde (4)

Dès le début des années 80, la communauté scientifique s'était déjà attardée à certaines conditions physiques retrouvées presque exclusivement chez les membres de la communauté homosexuelle. En fait, ces personnes étaient plus susceptibles aux infections opportunistes ou à l'apparition d'une forme agressive du sarcome de Kaposi ou de lymphomes des cellules B, le tout accompagné d'une diminution accrue du nombre de lymphocytes T CD4+ (5, 6). Les scientifiques ont d'abord cru que cette maladie était véhiculée et présente exclusivement chez les individus homosexuels (7), mais rapidement ils se sont aperçus que certains utilisateurs de drogues intraveineuses ou receveurs de transfusions sanguines

présentaient aussi les mêmes symptômes. Du coup, ils conclurent que ce virus pouvait se transmettre par les liquides biologiques.

En remontant dans la littérature, on s'aperçoit rapidement que les premiers cas de VIH identifiés remontent bien avant le début des années 1980. En fait, des analyses génétiques de séquences d'isolats cliniques obtenus de 1971 à 1976 des membres d'une famille Norvégienne possiblement infectée au début de l'année 1971, ont démontré que ces gens étaient bel et bien porteurs du VIH-1 (8, 9). Il semble que le plus vieux cas connu soit celui d'un marin de Manchester qui serait mort d'une maladie aux symptômes très similaires à ceux du SIDA en 1959, cependant la véracité de ce cas n'a jamais été confirmée (10-12). Quoiqu'il en soit, plusieurs articles retracent l'infection d'un Africain de Kinshasa en 1959 comme étant le cas le plus ancien répertorié (13, 14). L'ensemble de ces informations confirme que le virus n'était pas confiné en un seul endroit, mais plutôt dispersé sur différents continents.

Depuis la découverte du VIH, les scientifiques ont mis tous leurs efforts en commun afin de mieux comprendre et démystifier ce virus complexe. Malgré le fait que beaucoup de progrès ont été réalisés et que l'espérance de vie des patients est de beaucoup supérieure, il n'en demeure pas moins qu'aucun traitement n'est actuellement disponible pour prévenir ou guérir complètement de cette infection.

1.1.3 Les origines du VIH

Plusieurs théories ont été évoquées pour tenter d'expliquer l'origine véritable du VIH. Ce sont surtout les études phylogénétiques qui ont permis de découvrir que ce virus provenait possiblement du virus d'immunodéficience simienne (VIS) (15, 16). En fait, il semble que le VIS se serait retrouvé fréquemment chez l'humain, suite aux multiples contacts des hommes avec les singes, hôtes naturels du VIS, et qu'il serait parvenu à franchir la barrière

de l'espèce (17). Distincts d'un point de vue génétique, ce serait l'accumulation de mutations au cours du temps qui aurait permis au SIV de s'adapter aux humains.

Malgré que le VIH semble provenir du VIS, on ne peut pas véritablement parler de zoonose en ce qui a trait au SIDA. Pour être une zoonose, une maladie doit également affecter son hôte, ce qui n'est pas réellement le cas ici avec le SIDA. En fait, des expériences ont démontré que la transmission inter-espèce du SIV chez différentes espèces de singes résultait en un virus non pathogène et qui était éliminé rapidement par l'hôte. Aussi, la presque totalité des singes infectés par le VIH ne développent jamais la maladie. Malgré les nombreuses expositions aux singes infectés par le SIV, seulement onze cas de transmission inter-espèce ont été répertoriés durant les cinquante dernières années (18).

Aussi, les infections par le SIV chez les singes sont généralement asymptomatiques malgré des charges virales élevées sans compter que l'immunodéficience est très rare (19, 20). Ces découvertes renforcent le fait que le SIV doit nécessairement subir des changements pour devenir aussi pathogène chez l'humain. Finalement, bien que les humains côtoient les singes depuis des siècles, l'épidémie du SIDA n'a émergée que récemment ce qui suggère l'intervention d'autres facteurs favorisant du coup l'émergence du VIH. Ces facteurs peuvent être la déforestation, l'augmentation de l'urbanisation et la croissance de la fréquence des voyages. De plus, il est probable que l'épidémie ait été favorisée par les grandes campagnes de vaccination utilisant des aiguilles et seringues non stériles et les pratiques de transfusions sanguines non contrôlées (18, 21, 22).

1.2 Le VIH

Le VIH fait partie de la famille des *retroviridae*. Des membres de cette famille ont été retrouvés chez tous les vertébrés. Ce virus, enveloppé, possède un génome d'acide ribonucléique (ARN) simple brin qui est rétrotranscrit en acide désoxyribonucléique (ADN) double brin suite à son entrée dans la cellule hôte. Cet ADN est ensuite intégré au

génomique de la cellule. Les transcrits d'ARN produits servent à la synthèse de protéines structurales et accessoires qui forment les nouvelles particules virales, lesquelles sortent de la cellule infectée par bourgeonnement. Le VIH fait partie d'un groupe de rétrovirus appelés lentivirus, du latin *lentus* signifiant lent, dû au développement de la maladie qui peut être très long. Ces virus persistent dans les cellules infectées et continuent de se répliquer pendant plusieurs années avant que les personnes infectées ne démontrent des signes cliniques du SIDA.

1.2.1 Les Lentivirus

La famille des *Retroviridae* se divise en deux sous-familles soient les *Orthoretrovirinae* et les *Spumavirinae*. Les lentivirus, qui font partie des *Orthoretrovirinae* sont des virus dits complexes, puisqu'en plus des gènes *gag*, *pol* et *env* qui sont communs à tous les rétrovirus, ils possèdent des gènes codant pour des protéines accessoires à multiples fonctions (23). Puisque ces virus s'attaquent principalement aux cellules du système immunitaire, ils mènent fréquemment à des immunosuppressions.

1.2.2 Les différents groupes, types et sous-types

Il existe deux types de VIH soient les types 1 et 2. Chacun d'eux se différencie de l'autre par son origine géographique, son lien de parenté avec le VIS et sa pathogénicité. Alors que le VIH-2 origine du singe *Cercocebus atys*, celle du VIH-1 est plutôt incertaine (16, 24-26). En fait, des virus reliés au VIH-1 ont été isolés du chimpanzé *Pan troglodytes* (27, 28). Du coup, *P. troglodytes* a été identifié comme étant le réservoir primaire du VIH-1 et aurait été la source d'au moins 3 introductions indépendantes du VIScpz dans la population humaine (15).

Depuis que le VIH-2 a été identifié en Afrique de l'Ouest en 1986, les similarités avec le VIH-1 ont été largement investiguées (29). Les VIH-1 et -2 partagent des propriétés génétiques et biologiques telles que la structure de leur génome, les mécanismes de

transactivation et la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ (30, 31). Bien que les deux types provoquent l'immunodéficience et le SIDA, les personnes infectées par le VIH-2 ont généralement des périodes de latence beaucoup plus longues, une progression plus lente de la maladie et une charge virale plus faible lors de la phase asymptomatique (32-34).

L'analyse des séquences nucléotidiques a permis d'identifier trois groupes pour le VIH-1; M, N et O. Le groupe M a été subdivisé en 11 sous-groupes (A à K) selon leurs régions endémiques. Par exemple, les infections en Amérique du Nord et en Europe sont surtout dues au sous-groupe B alors que le sous-groupe C est extrêmement commun en Inde et en Afrique du Sud. Aucun sous-groupe n'a été identifié pour les groupes N et O (35).

1.2.3 L'organisation génomique du VIH-1

Le génome du VIH-1 est présent en deux copies d'ARN identiques de 9200 nucléotides. Ce génome contient trois gènes principaux, *gag*, *pol*, *env*, qui mènent ensuite à la formation de diverses autres protéines. Le gène *gag* mène à la production du précurseur Gag (Pr55) qui, suite à son clivage, produit la matrice (MA) (p17), la capsid (CA) (p24), la nucléocapsid (NC) (p7) et une petite protéine p6. Ces protéines structurales sont essentielles pour obtenir une particule virale complète. De son côté, le gène *pol* code pour les enzymes telles que la transcriptase inverse (TI) (rétrotranscription (RT) de l'ARN en ADN), l'intégrase (IN) (intégration de l'ADN viral au génome cellulaire) et la protéase (maturation des particules virales). Finalement, le gène *env* permet la production des protéines qui constituent l'enveloppe soient la glycoprotéine gp120 et la protéine transmembranaire gp41 (figure 2).

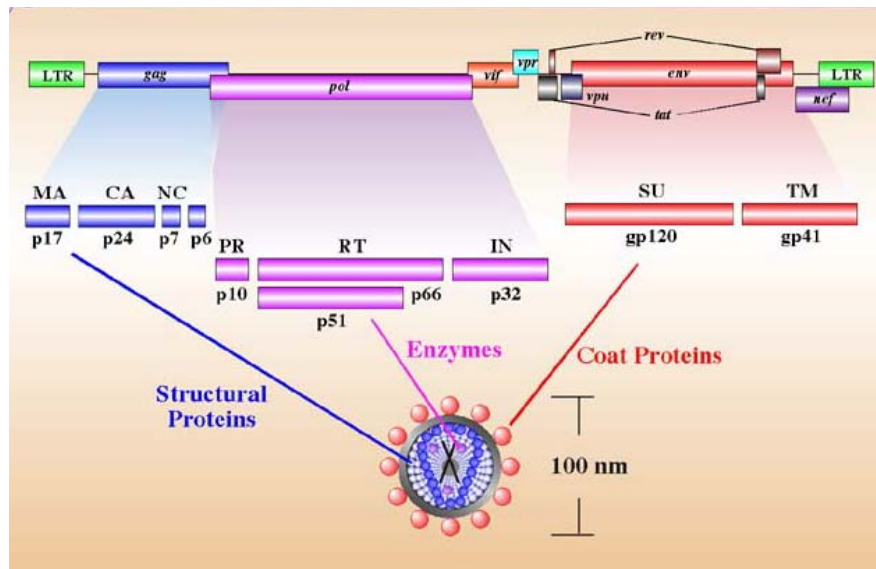


Figure 2. Organisation génomique du VIH-1 (36)

Outre les protéines structurales, diverses protéines accessoires sont produites suite à plusieurs événements d'épissage. Parmi celles-ci, on retrouve Tat, Rev, Nef, Vif, Vpu et Vpr. Leurs fonctions sont très variées et seront résumées ultérieurement.

Le génome du VIH comprend également des régions régulatrices, LTR (de l'anglais *Long Terminal Repeat*) qui viennent flanquer de part et d'autre le génome. Les LTR contiennent plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription cellulaires ainsi que pour la protéine virale Tat (figure 3). Ce sont ces facteurs de transcription qui modulent la transcription du VIH. Le LTR est constitué de trois régions nommées U3, R et U5 (37). Ces régions contiennent 4 sites fonctionnels reliés à la régulation de la transcription du VIH-1 : la région TAR (de l'anglais *trans-activation response element*), la région promotrice, la région amplificatrice et la région modulatrice (38). Cette dernière contient aussi une séquence nommée NRE (de l'anglais *negative regulatory element*) (39, 40).

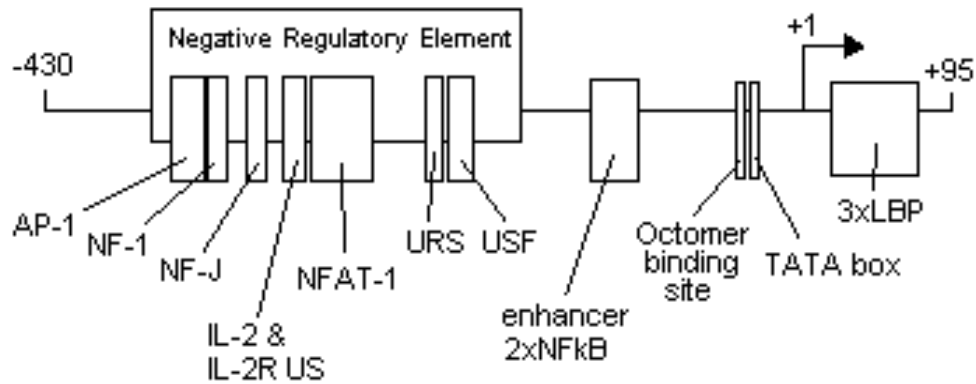


Figure 3. Représentation du LTR du VIH-1 (41)

1.2.4 La morphologie du VIH-1

Le VIH-1 est un virus enveloppé qui contient à sa surface une protéine de fusion ainsi qu'une molécule servant à lier les récepteurs de la cellule cible. C'est sous la bicouche lipidique que se trouve la MA qui elle-même protège la CA de forme conique. Cette dernière protège à son tour la NC, les deux copies du génome viral ainsi que la protéase, la TI et l'IN (figure 4). Le diamètre de la particule virale varie de 100 à 120 nm (23, 42)

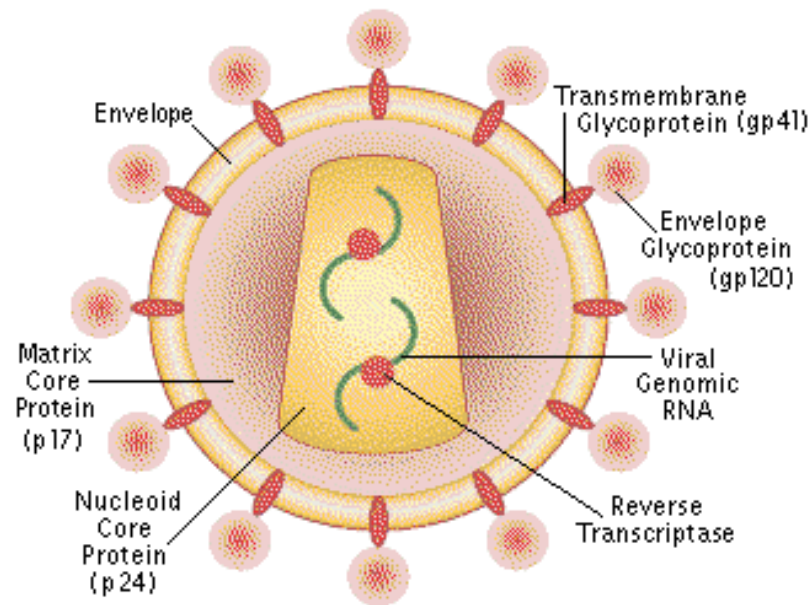


Figure 4. Structure du VIH-1 (43)

1.2.4.1 MA, CA, NC et p6

Aussi appelé p17, le domaine MA de Pr55^{Gag} accomplit plusieurs fonctions essentielles pendant le cycle viral. Après la synthèse de Gag, le domaine MA dirige la polyprotéine Pr55^{Gag} à la membrane. L'affinité du domaine MA pour la bicouche lipidique se fait, en partie, via l'acide myristique lié de manière covalente à l'extrémité N-terminale de MA (44). Malgré le fait que le bourgeonnement ait lieu principalement à la membrane plasmique, il a été démontré que dans certains types cellulaires, comme les macrophages, cette étape peut avoir lieu dans des compartiments intracellulaires comme les endosomes tardifs ou les corps multivésiculaires (45, 46). Le domaine MA joue aussi un rôle important dans l'incorporation des glycoprotéines de l'enveloppe dans les virions. Le tout s'effectue par le biais d'une interaction entre MA et la protéine de fusion, gp41 (47, 48). Finalement, le domaine MA joue aussi un rôle dans la translocation du complexe de préintégration (CPI) vers le noyau (49). La CA aussi appelée p24, forme une structure de forme conique

qui protège la NC et donc le génome viral. La CA est composée d'un domaine structural et d'un autre fonctionnel. La partie N-terminale forme le corps de la protéine, alors que la partie C-terminale contient un site de dimérisation. Le domaine N-terminal joue un rôle dans la condensation et la morphogenèse de la capsid alors que la partie C-terminale intervient dans l'assemblage de la structure (50). Le domaine CA permet aussi la liaison d'une protéine cellulaire, la cyclophiline A. Celle-ci s'intercale entre les p24 et est essentielle à l'infectivité virale (51).

Le domaine NC, aussi appelé p7, a pour principal rôle l'encapsidation spécifique d'ARN pleine longueur dans les virions. Le domaine NC contient deux motifs doigt de zinc dans lesquels des mutations empêchant la liaison du zinc abolissent l'encapsidation du génome et l'infectivité du virus (52, 53). En plus de son rôle dans l'encapsidation de l'ARN, le domaine NC est aussi impliqué dans l'assemblage de Gag (54, 55).

Le domaine p6 est très important puisque sa délétion empêche la production des particules virales en bloquant une étape tardive du bourgeonnement (56, 57). Ce domaine dirige aussi l'incorporation de la protéine accessoire Vpr (58, 59).

1.2.4.2 Les protéines de l'enveloppe

Le précurseur des glycoprotéines de l'enveloppe est appelé gp160. C'est une protéine membranaire ancrée aux membranes cellulaires par des liaisons hydrophobes. La gp160 subit plusieurs étapes de maturation dans le réticulum endoplasmique (RE) et le Golgi (repliement, glycosylation, oligomérisation et clivage) (60). C'est dans ce-dernier que la gp160 est clivée protéolytiquement par des enzymes cellulaires formant ainsi les glycoprotéines SU et TM, gp120 et gp41 respectivement. L'interaction gp120-gp41 est faible et par conséquent, de bonnes quantités de gp120 sont clivées de la surface des cellules infectées.

La gp120 est hautement glycosylée; environ la moitié de la masse moléculaire de la gp160 est composée de chaînes d'oligosaccharides. Toute cette glycosylation lui confère une résistance aux anticorps neutralisants, une stratégie employée par le virus pour échapper au système immunitaire. La gp120 contient des régions constantes (C1 à C5) et des régions variables (V1 à V5) (61). Les résidus cystéine présents dans la gp120 sont très conservés et forment des ponts disulfures qui lient les quatre premières régions variables en grandes boucles (61). Des études ont démontré que les régions constantes forment le corps de la gp120 et que les régions variables, sauf V5, forment des boucles à la surface de la gp120 (62, 63). La liaison du récepteur CD4 entraîne un mouvement des boucles V1 et V2, libérant la boucle V3 et lui permettant de lier le co-récepteur (64). La liaison de la gp120 avec le co-récepteur déclenche un réarrangement de la gp41 et l'exposition du peptide de fusion nécessaire à la fusion des membranes virale et cellulaire.

La gp41 comprend un domaine transmembranaire hydrophobe qui lui permet de s'ancrer dans la membrane cellulaire. Elle lie également de manière non covalente la gp120 et elle est le principal acteur dans le procédé de fusion des membranes, grâce à un domaine hydrophobe dans sa partie N-terminale (65). Ce domaine est d'ailleurs appelé peptide de fusion (66).

Les mécanismes précis par lesquels les glycoprotéines de l'enveloppe sont incorporées dans les virus sont encore méconnus. Il semblerait que ces protéines soient recrutées dans les virions via une interaction directe avec le domaine MA puisque des mutations dans celui-ci empêchent l'incorporation de la gp120 et gp41 (67-69).

En plus des glycoprotéines de l'enveloppe, les virions incorporent des quantités substantielles de différentes protéines cellulaires de surface telles que les molécules d'adhésion LFA-1 (de l'anglais *Leucocyte functional antigen-1*) et ICAM-1 (de l'anglais

Intercellular adhesion molecule-1) (70, 71). L'incorporation des molécules de l'hôte fera l'objet d'une section ultérieure.

1.2.4.3 Les protéines régulatrices et accessoires

Les protéines régulatrices (Tat et Rev) ainsi que les protéines accessoires (Vpr, Vif, Vpu et Nef) sont d'autres protéines aux multiples fonctions très impliquées dans le cycle répliatif du VIH-1. Les principales fonctions de chacune de ses protéines sont énumérées dans le tableau I.

Tableau 1. Rôles des protéines régulatrices et accessoires du VIH-1

| PROTÉINES | FONCTIONS |
|-------------------------------------|---|
| Tat (Transactivator) | Régulateur positif de la transcription (72) |
| Rev (Regulator of Viral Expression) | Permet l'exportation des transcrits non épissés hors du noyau (72) |
| Vpu (Viral Protein U) | Augmente la libération des particules virales et réduit l'expression du CD4 (73, 74) |
| Vpr (Viral Protein R) | Favorise le transport de l'ADN au noyau, augmente la production virale et arrête les cellules infectées en G ₂ (75-78) |
| Vif (Viral Infectivity) | Empêche la désamination de l'ADN viral en liant la protéine cellulaire antirétrovirale APOBEC3G |
| Nef (Negative-Regulation Factor) | Augmente l'infectivité et réduit l'expression du CD4, des CMH-I et II (79-82) |

1.3 Le tropisme

1.3.1 Le récepteur primaire et les différents co-récepteurs

1.3.1.1 Le CD4

Dès la découverte du VIH, la communauté scientifique a tenté de déterminer quel était le récepteur possible de ce virus à la surface des cellules cibles. Le CD4, une protéine de 55 kDa faisant partie de la superfamille des immunoglobulines, a été identifié comme étant ce récepteur (83-85). Celui-ci est constitué d'un domaine cytoplasmique hautement chargé, d'une région transmembranaire et de quatre domaines extracellulaires (D1 à D4) (83, 86). Chacun des monomères de la gp120 contient un site de liaison pour le CD4. La haute affinité du CD4 pour la gp120 se trouve au niveau de ses domaines D1 et D2. Cette protéine est largement exprimée à la surface des thymocytes ainsi que des lymphocytes T CD4+ et faiblement sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules neuronales et les cellules gliales. Le CD4 est connu pour stabiliser les interactions entre le récepteur des cellules T (RCT) et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) lors d'une présentation antigénique.

1.3.1.2 Les co-récepteurs

Peu après l'identification du CD4 en tant que récepteur, il devenait évident que cette protéine n'était pas suffisante pour induire la fusion des membranes et l'entrée du virus. Pendant plus de dix ans, les corécepteurs potentiels pour l'attachement du VIH-1 sont demeurés méconnus. C'est au milieu des années 90 que plusieurs études ont démontré que des protéines comportant sept domaines transmembranaires et faisant partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G étaient utilisées par le virus en tant que corécepteurs (87-90). Le CCR5 et le CXCR4 sont les deux principaux corécepteurs permettant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, une étape

importante menant à une infection productive (87, 90). Au même moment, plusieurs résultats expérimentaux démontraient l'existence d'au moins deux souches virales soient une souche de type lymphocytaire T et l'autre macrophagique. Il fut par la suite démontré que c'est l'utilisation du CCR5 ou du CXCR4 qui détermine le tropisme de la souche virale (R5, X4 et X4/R5) (91). Les souches R5 infectent préférentiellement les cellules exprimant le CCR5 à leur surface (macrophages, cellules dendritiques (CD), cellules T CD4+ activées), alors que les souches X4 infectent exclusivement les cellules exprimant le CXCR4, soient les cellules T CD4+ naïves, les cellules mémoires centrales et les cellules T CD4+ activées. Les souches dites X4/R5 peuvent infecter toutes cellules qui possèdent l'un ou l'autre de ces corécepteurs.

Outre le CCR5 et le CXCR4, plusieurs autres récepteurs de chimiokines peuvent servir de corécepteurs dans certaines situations dont les protéines CCR2b, CCR3, CCR8, CX3CR1 et le CXCL16 (92, 93) Le rôle de ces corécepteurs alternatifs dans le processus d'infection *in vivo* demeure toutefois méconnu.

La fonction primaire du CCR5 et du CXCR4 consiste à lier les chimiokines. Cette liaison engendre différentes cascades de signalisation entraînant la migration de cellules immunes au site inflammatoire suivant le gradient de chimiokines sécrétées. Le CXCR4 lie le SDF-1 alors que le CCR5 lie le Rantes, le MIP-1 α/β ainsi que le MCP-2. Ces chimiokines entrent en compétition avec les gp120 pour la liaison avec le CXCR4 et le CCR5. En effet, il est bien connu que leur présence inhibe le niveau d'infection du VIH (94).

La liaison de la gp120 avec ces corécepteurs est de nature électrostatique puisque la gp120 est chargée positivement alors que les corécepteurs portent des charges négatives (95, 96). L'interaction directe entre le corécepteur et la gp120 est grandement influencée par la présence ou non du CD4 (97-99).

1.3.2 Les types cellulaires infectés par le VIH-1

1.3.2.1 Les lymphocytes T CD4+

Les cellules T CD4+ demeurent les principales cibles du VIH-1. En plus du récepteur CD4, elles expriment de grandes quantités de CXCR4 et, selon la sous-population et leur état d'activation, le CCR5. Les cellules T sont habituellement séparées en deux groupes; les cellules naïves et les cellules mémoires, lesquelles renferment à la fois les mémoires centrales (Tcm) et les mémoires effectrices (Tem). Ces sous-types se distinguent à la fois par les récepteurs de chimiokines et les marqueurs d'activation qu'elles expriment mais également selon les facteurs de transcription qu'elles possèdent. Les caractéristiques de chacune seront énoncées un peu plus loin.

Phénotypiquement, les cellules naïves et mémoires se distinguent par l'isoforme de la phosphatase CD45 qu'elles expriment. En effet, les cellules naïves contiennent l'isoforme de haut poids moléculaire CD45RA alors que les cellules mémoires expriment la forme de bas poids moléculaire, le CD45RO (100, 101). Les cellules naïves, qui n'ont jamais rencontré d'antigène, sont dans un état quiescent (stade G₀), ne se divisent que très peu (environ une fois par an) et peuvent vivre très longtemps (102). Ces cellules sont constamment en recirculation dans les systèmes sanguin et lymphatique. C'est à l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) que ces cellules vont entrer en contact avec des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), comme les cellules dendritiques, qui vont les « avertir » des dangers potentiels. Selon la force du signal et les cytokines présentes, les cellules naïves s'activent et acquièrent un profil de type Th1, Th2, Th17 ou Treg (103-108). Alors que les trois premiers types sont des cellules effectrices (qui activent la réponse immune), les Treg sont des cellules suppressives (qui inhibent la réponse immune). Chacune des sous-populations se distingue par les cytokines qu'elles produisent et les cellules qu'elles activent. Du fait qu'elles ont besoin de migrer dans les ganglions, les cellules naïves expriment certains récepteurs de chimiokines comme le CCR7 dont le

ligand, SLC, est situé sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins. Elles expriment également de grande quantité de CD62L, une sélectine qui permet le roulement des cellules T à la surface de l'endothélium. Une fois attaché à celui-ci, la liaison du CCR7 avec son ligand permet aux cellules naïves d'extravaser directement dans le ganglion. Suite à leur stimulation, les cellules naïves changent l'expression de leurs molécules de surface. Elles cessent d'exprimer le CD62L et le CCR7 et expriment plutôt le CCR5, le CCR4 et le CXCR3, afin de permettre leur entrée dans les tissus non lymphoïdes (105, 109). Les cellules effectrices se rendent aux tissus périphériques inflammés où elles sécrètent différentes cytokines nécessaires à l'activation d'autres types cellulaires permettant ainsi la résorption de l'inflammation ou de l'infection. Par des mécanismes encore méconnus, certaines cellules effectrices se transforment en Tme, lesquelles résident dans les tissus périphériques à l'affût d'une nouvelle infection (103). Si le signal envoyé par la CPA à la cellule naïve est spécifique mais faible, celle-ci peut également devenir une Tmc. Les Tmc cellules mémoires centrales expriment l'isoforme CD45RO, CD62L et CCR7 ainsi que des molécules d'adhésion comme le LFA-1 (110, 111). Tout comme les cellules naïves, les Tmc patrouillent le sang et la lymphe jusqu'à ce qu'elles reconnaissent une deuxième fois leur antigène dans les organes lymphoïdes secondaires. Alors, elles prolifèrent et deviennent des Tme.

Il est bien connu que les cellules naïves sont plus résistantes à l'infection par le VIH-1 *in vitro* et contiennent moins de virus chez les patients infectés (112-114). Puisque l'infection par le VIH-1 dépend fortement de l'état d'activation des cellules, la RT et l'intégration sont deux étapes qui sont très peu efficaces au sein des cellules naïves et mémoires, lesquelles sont métaboliquement peu actives (115, 116). Cependant, les Tmc contiennent plus de facteurs cellulaires qui favorisent la RT, l'intégration et la transcription du VIH-1. Elles constituent d'ailleurs le principal réservoir du VIH-1 (117). De plus, chez les patients VIH-1, ces cellules contiennent 4 à 10 fois plus d'ADN viral que les cellules naïves (112). Néanmoins, les cellules T activées, c'est-à-dire les cellules effectrices, demeurent la cible

de choix puisqu'elles expriment à la fois le CXCR4 et le CCR5 et contiennent beaucoup de facteurs de transcription cellulaire nécessaires à la réplication virale (118).

1.3.2.2 Les macrophages

Les macrophages contribuent grandement à la réponse immune innée contre les pathogènes et ils sont à l'interface entre les réponses immunes innée et acquise. Ils jouent un rôle important dans le contrôle des infections, soit en détruisant les pathogènes ou en sécrétant des cytokines capables d'inhiber leur réplication ou d'activer d'autres cellules du système immunitaire. L'infection des macrophages par le VIH-1 altère leurs fonctions et leur profil de sécrétion de cytokines. Contrairement aux lymphocytes T CD4+, les macrophages sont résistants aux effets cytopathiques du virus et peuvent ainsi constituer des réservoirs persistants. Comme ils peuvent agir en tant que CPA auprès des lymphocytes T CD4+, ils favorisent ainsi la transmission du virus par contact cellule-cellule. Les macrophages peuvent également migrer dans les tissus inflammés, ce qui leur confère la possibilité de transporter le virus et de le transmettre à d'autres cellules (119).

Les macrophages expriment le CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4, ce qui les rend susceptibles à l'infection par le VIH-1 (119-121). Il semble que malgré le fait que ces cellules expriment le CXCR4, la présence d'une infection productive demeure un sujet controversé. Certaines études ont démontré une telle infection *in vitro* à l'aide de souche de laboratoires, par contre les résultats sont différents lorsque des isolats cliniques sont utilisés (122). D'autres équipes ont montré que l'entrée des virus X4 était possible mais qu'il y avait un blocage dans les étapes subséquentes (123). Toutes ces variations peuvent être dues aux méthodes d'isolement et de culture des macrophages, aux techniques utilisées pour bloquer l'entrée ou pour évaluer la présence des virus intracellulaires. Ce qui est certain, c'est qu'à la surface des lymphocytes T CD4+, le CXCR4 est présent sous forme d'un monomère alors qu'il possède un haut poids moléculaire à la surface des macrophages. Il est connu que le CD4 s'associe au CXCR4 sous sa forme monomérique

mais pas lorsqu'il est sous un haut poids moléculaire, suggérant que le CD4 ne peut interagir avec le CXCR4 exprimé chez les macrophages (124). Les macrophages présents dans les organes non lymphoïdes comme le foie (cellules de Küpffer), les poumons (macrophages alvéolaires), le placenta (cellules de Hofbauer) et le cerveau (cellules microgliales) peuvent également être infectés (125-127). D'ailleurs, l'infection de ces cellules peut mener à l'apparition de réservoirs viraux et contribuer à l'affaiblissement général du système immunitaire ainsi qu'à la dégénérescence du système nerveux central (128, 129).

1.3.2.3 Les cellules dendritiques

Les CD, tout comme les macrophages, participent grandement à la réponse immune. En effet, ces cellules sont responsables du développement de la réponse immune spécifique. Suite à la phagocytose d'un pathogène, les CD migrent dans les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent aux lymphocytes T CD4+ les antigènes du pathogène en question. Cette présentation antigénique permet par la suite le développement d'une réponse immune spécifique (130). Les CD peuvent être séparées en cellules immatures ou matures. Les cellules immatures, comme les cellules de Langerhans, sont situées dans les muqueuses et la peau où elles agissent en sentinelles, à l'affût des pathogènes. Les CD expriment le CD4 et les corécepteurs, mais en quantités plus faibles que les lymphocytes T CD4+. Il est possible pour le VIH-1 d'infecter directement les CD, comme les cellules de Langerhans ou d'autres CD myéloïdes (131). Par contre, ce procédé est beaucoup moins important que l'infection dans les lymphocytes T CD4+ et requiert une quantité initiale de virus plus importante (132). Outre le CD4, plusieurs études ont montré que d'autres molécules pouvaient également servir de récepteurs. La liaison du VIH-1 avec ces récepteurs est médiée par la gp120. Les récepteurs actuellement connus sont DC-SIGN (de l'anglais *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*), DCIR (de l'anglais *Dendritic cell immunoreceptor*), la langerine et les récepteurs du mannose (133-136). La liaison à ces récepteurs résulte fréquemment en une internalisation. Cependant, plusieurs virus demeurent liés à la surface de la membrane plasmique, surtout

dans les replis de celle-ci, ou entre les dendrites (137-139). Ainsi, le virus utilise la CD pour être transféré aux lymphocytes T CD4+ suite à la formation des synapses immunologiques. Ce type de transfert est appelé infection en *trans* (133, 138, 140, 141). Finalement, les virus issus d'une infection productive de la CD peuvent également être transférés aux lymphocytes T CD4+ lors des contacts cellule-cellule, on parle alors d'infection en *cis* (133).

1.3.2.4 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des acteurs importants de la réponse immune innée et se retrouvent fréquemment aux sites d'inflammation mucoale. Plusieurs médiateurs sécrétés par les neutrophiles stimulent la réplication du VIH-1. De plus, le neutrophile peut lier les souches X4 et R5 et les transférer de manière efficace aux lymphocytes T CD4+, ce qui favorise l'étendue de l'infection (142). Puisque les neutrophiles sont activés aux sites d'inflammation par des composés bactériens et par des cytokines comme le TNF- α (143), ceux-ci pourraient donc augmenter le risque de transmission du VIH-1 aux sites d'infection mucoale (144).

1.3.2.5 Les lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ sont très importants dans la défense de l'hôte, notamment dans le cadre d'une infection par le VIH-1. Ces cellules reconnaissent les protéines virales présentées dans le contexte du CMH-I sur les cellules infectées. Suite à cette reconnaissance, elles détruisent les cellules infectées à l'aide des perforines et granzymes contenus dans leurs granules intracellulaires (130). De manière générale, le VIH-1 infecte très peu ce type cellulaire. Cependant, l'infection de cellules destinées à devenir des lymphocytes T CD8+ peut avoir lieu pendant leur maturation dans le thymus, où ces cellules expriment alors à la fois le CD4 et le CD8 (145). Récemment, quelques études ont

montré l'apparition de souches virales utilisant le CD8 comme récepteur et le CXCR4 comme corécepteur (146, 147).

1.3.2.6 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B produisent les anticorps et sont responsables de la réponse immune humorale. Pendant une infection par le VIH-1, on peut retrouver une activation polyclonale de ces lymphocytes ainsi qu'une hypergammaglobulinémie (148, 149). Les lymphocytes B n'expriment pas de CD4 et très peu de CXCR4. La susceptibilité de ces cellules à l'infection est encore aujourd'hui très controversée. Par contre, il semble que l'entrée du virus serait possible grâce à la costimulation avec des anticorps dirigés contre le CD40 et la présence d'interleukine-4 (150). De plus, l'opsonisation des virus avec des molécules du complément permettrait l'attachement de celui-ci aux lymphocytes B et le transfert subséquent aux lymphocytes T CD4+ (151).

1.3.2.7 Les cellules NK et NKT

Les cellules NK (de l'anglais *Natural Killer Cells*) ont pour rôle de détruire les cellules cancéreuses ou infectées, en dégranulant des perforines, ce qui mène à la lyse de ces cellules anormales. Les cellules NK expriment à la fois le CD4, le CCR5 et le CXCR4 et peuvent donc être infectées par l'ensemble des souches virales (152, 153).

De leur côté, les cellules NKT (de l'anglais *Natural Killer T Cells*) constituent une sous-population de lymphocytes T exprimant spécifiquement le RCT V α 24-V β 11 (154, 155). Comme les cellules NK, elles participent à la réponse immune en détruisant les cellules cancéreuses ou infectées par un virus. De plus, elles expriment également le CD4 et les corécepteurs mais ne sont susceptibles à l'infection que par les souches R5 (156). Leur RCT reconnaît spécifiquement les antigènes glycolipidiques présentés par le CD1d, une molécule non-polymorphique très semblable aux molécules du CMH-I.

1.3.2.8 Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules dites inflammatoires qui sont importantes dans le cadre de l'immunité innée et acquise. Elles interviennent lors des réactions allergiques et/ou des réponses inflammatoires (157). Ces cellules se différencient dans les tissus *in situ* à partir de précurseurs circulants. Ces précurseurs expriment les corécepteurs CCR3, CCR5 et CXCR4 ainsi qu'un faible niveau de CD4. Ces cellules peuvent être infectées de manière productive par des virus de tropisme R5 ou R5/X4. Considérant que ces précurseurs circulent dans plusieurs tissus et que les mastocytes ont une longue durée de vie, ceux-ci pourraient constituer des réservoirs viraux importants (158).

1.3.2.9 Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales constituent l'épithélium qui se retrouve à l'interface entre l'hôte et l'environnement extérieur (tractus oropharyngé, urogénital ou gastrointestinal). Les interactions entre les cellules épithéliales et les cellules immunes ont d'importantes implications pour la transmission du VIH-1 (159). En effet, l'épithélium pourrait servir de réservoir pour le VIH-1. Les cellules épithéliales expriment le CCR5 et/ou le CXCR4 mais pas le CD4 (160, 161). Ces cellules expriment également d'autres molécules pouvant servir à trapper le virus tels que les galactosylcéramides et les héparans sulfates (162-164). Malgré le fait que plusieurs études ont montré une infection productive *in vitro*, aucune infection n'a été détectée chez les cellules épithéliales intestinales *in vivo*. Ces résultats suggèrent que bien qu'elles ne soient pas infectées de manière productive, les cellules épithéliales peuvent séquestrer le VIH-1 et le transférer subséquentement aux cellules immunes (165). En effet, il a été démontré que les cellules épithéliales du col de l'utérus, du vagin et de la prostate ne permettent pas la réplication du VIH-1 bien qu'elles puissent capturer le virus et le transférer (165). Finalement, les cellules épithéliales du placenta, plus communément appelées les trophoblastes, expriment les corécepteurs du VIH-1 et sont susceptibles à l'infection. Ce cas est assez particulier puisque l'entrée du virus se fait par

endocytose, indépendamment de l'enveloppe, et ne requiert aucun récepteur cellulaire particulier (166, 167). De plus, les trophoblastes peuvent transférer le virus du côté apical vers le côté basolatéral par transcytose (168).

1.3.2.10 Les cellules adipeuses

Les cellules adipeuses ou adipocytes, sont des cellules dont le rôle premier est d'emmagasiner les graisses. Ce sont les seules cellules non immunitaires qui expriment le récepteur et les corécepteurs du VIH-1. Il a d'ailleurs été démontré que les souches X4 et R5 peuvent infecter, faiblement, les cellules adipeuses (169).

1.3.2.11 Les cellules du système nerveux central

Les astrocytes sont des cellules gliales qui constituent la majorité des cellules présentes dans le cerveau et qui veillent au bon fonctionnement de celui-ci. Ces cellules participent entre autre à la réponse immunitaire via la sécrétion et la production de cytokines, de molécules d'adhésion et de composés de la matrice extracellulaire qui sont des médiateurs importants de l'immunité et de l'inflammation (170, 171). Leur étroite relation avec les neurones suggère que leur dysfonctionnement peut contribuer à la pathogenèse des maladies neurologiques. L'infection du système nerveux central par le VIH-1 cause chez les patients plusieurs troubles neurologiques comme les pertes de mémoires et les troubles moteurs (172). Bien que les microglies et les macrophages soient les principales cibles du VIH-1 d'un point de vue cérébral, l'infection des astrocytes est bien documentée (173-175). Contrairement aux microglies qui expriment le CD4 ainsi que les corécepteurs CCR5 et CCR3 (176), les astrocytes n'expriment pas le CD4 mais expriment le CXCR4 et le CCR5 (177). Dernièrement, il a été démontré que le récepteur du mannose pourrait servir de récepteur en dépit du manque de CD4 et que l'ADN viral était intégré dans ces cellules. Selon ces résultats, les astrocytes pourraient donc constituer des réservoirs pour le VIH-1 (178).

1.4 Le cycle réplcatif

La capacité du VIH à déjouer le système immunitaire et à parvenir à s'installer au sein des cellules de l'hôte requiert diverses stratégies mettant en vedette les protéines virales et certaines protéines cellulaires. Ainsi, le cycle de réplication du VIH-1 est assez complexe en ce sens qu'il diffère légèrement selon le type cellulaire infecté, les co-récepteurs utilisés, les voies d'entrée et le transit jusqu'au noyau.

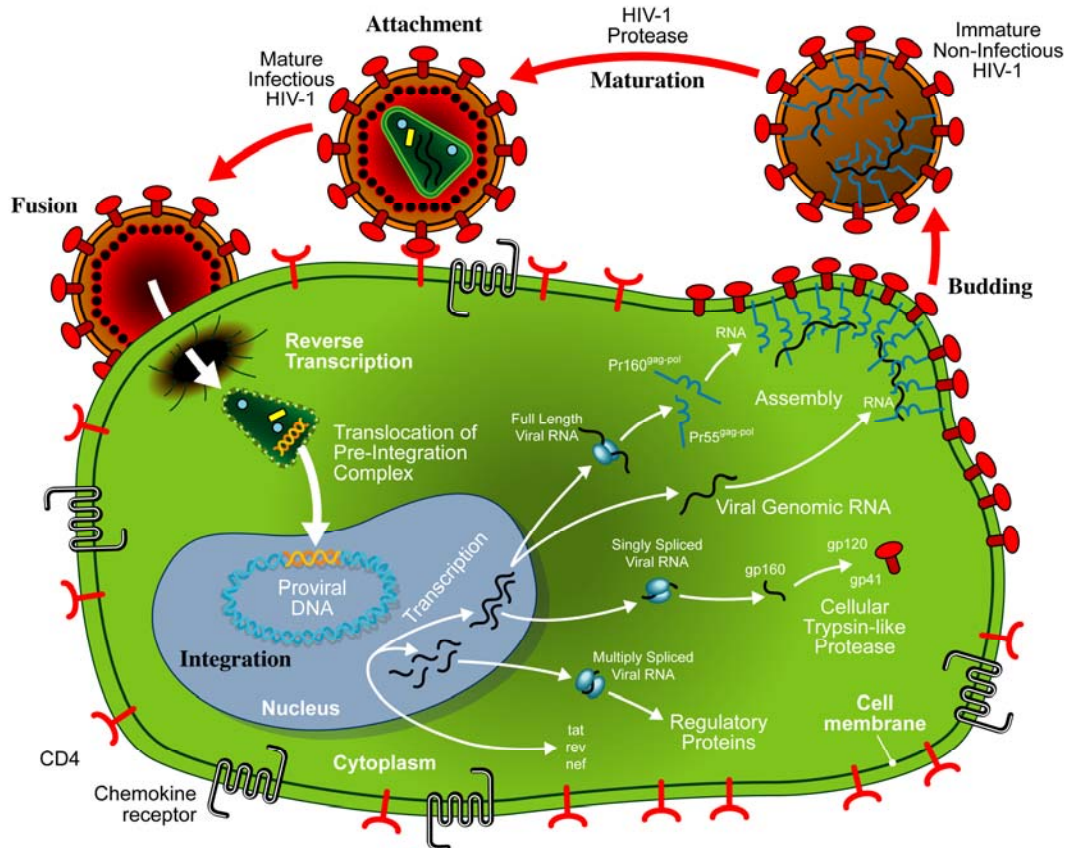


Figure 5. Cycle réplcatif du VIH

1.4.1 L'attachement

L'attachement du virus à une cellule cible est la première étape d'une infection productive. L'attachement est en général concrétisé par l'interaction spécifique de protéines virales et de protéines cellulaires de surface. Plusieurs études ont démontré que cette première interaction était principalement régie par des interactions entre la gp120 et des récepteurs cellulaires. Cependant, bien d'autres interactions, parfois non spécifiques, sont possibles.

1.4.1.2 Interaction CD4-gp120

Le CD4 interagit d'abord avec la gp120 puis un complexe CD4-corécepteur-gp120 se forme menant aux changements conformationnels de la gp41 permettant la fusion des membranes (179). Des études de mutagenèse et de cristallographie ont permis de déterminer que la liaison du CD4 avec la gp120 impliquait le domaine D1 du CD4 (180, 181). L'affinité de la gp120 pour le CD4 a été étudiée en utilisant des formes recombinantes solubles et a été rapportée comme étant de l'ordre du nanomolaire (1 à 10 nM). Cependant, il semble que l'interaction entre la forme oligomérique de la gp120 et le CD4 présent à la surface des cellules serait de plus faible affinité (182, 183). Le VIH-1 peut aussi infecter des types cellulaires exprimant peu ou pas de CD4 (macrophages, cellules dendritiques). Dans tous ces cas, l'attachement devient alors indépendant du CD4 et d'autres protéines de surfaces sont alors impliquées.

1.4.1.4 Autres ligands de la gp120

En plus de l'interaction CD4-gp120, d'autres ligands de la gp120 sont également présents sur différents types cellulaires et permettent la liaison du virus. Cet attachement ne mène pas nécessairement à une infection productive mais augmente tout de même l'entrée virale dans ces cellules. Ces interactions sont principalement médiées par les sucres présents sur la gp120 et des domaines glycosylés ou des lectines présents à la surface des cellules.

Parmi ces interactions, on note une importante interaction entre la boucle V3 de la gp120 et des composés chargés tels les héparans sulfates (162, 164, 184) ainsi que le récepteur du mannose sur les macrophages (185). Certains composés lipidiques de la membrane cellulaire comme les galactosylcéramides peuvent également favoriser l'attachement viral (163, 186) ainsi que leurs dérivés, les sulphatides, présents sur les cellules neuronales, gliales, épithéliales et sur les macrophages. Cependant, le groupe le plus important dans la liaison du VIH-1 est sans aucun doute un membre de la famille des lectines de type-C préalablement identifié dans des extraits de placentas et spécifiquement exprimé à la surface des cellules dendritiques et appelé DC-SIGN (187-189). D'autres lectines comme DC-SIGNR, sur certaines cellules endothéliales, et DCIR, sur les CD, ont récemment été identifiées comme capables de lier le virus (190). Plusieurs de ces interactions participent également au transfert du virus aux lymphocytes T CD4+. Ce type de transfert a lieu via les CD, les macrophages, les cellules épithéliales ou endothéliales (162, 188, 191) et est très efficace ce qui facilite la propagation du virus.

1.4.1.5 Interactions indépendantes de la gp120

Il existe d'autres interactions totalement indépendantes de la liaison de la gp120 qui permettent la liaison du virus aux cellules cibles. Ces interactions se produisent par exemple entre des molécules de l'hôte incorporées dans l'enveloppe lipidique du virus et leur ligands exprimés à la surface des cellules cibles (le phénomène d'incorporation des molécules de l'hôte sera traité plus en détails dans la section bourgeonnement du cycle viral). Parmi ces interactions impliquant les molécules de l'hôte mentionnons la cyclophiline qui interagit avec les héparans sulfates (192) ainsi que l'interaction entre la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1 et son ligand le LFA-1(193). D'autres composés présents dans le milieu extracellulaire peuvent aussi favoriser l'adhésion du VIH-1 à certains types cellulaires. La galectine-1, une lectine sécrétée dans l'environnement extracellulaire suite à l'activation ou la nécrose de certaines cellules, favorise la liaison du VIH-1 aux lymphocytes T CD4+ et aux macrophages (194).

En résumé, toute interaction permettant une liaison du VIH-1 aux cellules cibles permet également un rapprochement entre la gp120 et le CD4 facilitant ainsi les contacts avec les corécepteurs. La fusion est l'étape subséquente qui mène à une infection productive. Par contre, comme il a été mentionné auparavant, certaines interactions ne font que maximiser l'entrée sans toutefois mener à l'infection. Dans ces cas, l'entrée du virus se fait plus souvent par endocytose que par fusion, un processus qui dépend du type cellulaire et des molécules présentes à la membrane plasmique.

1.4.2 L'entrée

Le VIH-1 étant un virus, il a absolument besoin d'une cellule pour se multiplier et survivre. Il est donc primordial pour ce pathogène d'entrer dans les cellules cibles. L'entrée peut être médiée par la fusion (menant à une infection productive) ou l'endocytose.

1.4.2.1 La fusion

Suite à la liaison de la gp120 avec le corécepteur, un autre changement de conformation expose alors la gp41 et provoque un réarrangement de celle-ci afin de permettre au peptide de fusion de s'insérer dans la membrane cellulaire. C'est suite à cette étape qu'un deuxième réarrangement au sein de la gp41 entraîne la formation d'un complexe de six hélices. L'inhibiteur de fusion, le T-20, agit à cette étape en se liant à la région C-terminale et en empêchant la formation du complexe à six hélices, rendant la fusion impossible. La formation de ce complexe est critique pour la fusion des bicouches lipidiques du virus et de la cellule (195). Tous ces changements de conformation nécessitent la réorganisation des dix ponts disulfure présents dans la protéine de l'enveloppe. De telles modifications requièrent une activité rédox-isomérase fournie par la protéine PDI (de l'anglais *Protein Disulfide Isomerase*). Cette protéine semble requise pour l'infection par le VIH-1 puisque l'inhibition de celle-ci interfère avec l'infection (196). Le processus de fusion semble également dépendre de la disponibilité du récepteur et des corécepteurs. En fait, il a été

démonstré que trois liaisons CD4-gp120 sont nécessaires pour activer de manière efficace les trimères de l'enveloppe. Il semble que plusieurs événements de liaison des corécepteurs par trimères soient également nécessaires pour obtenir une fusion (197). Bien que la plupart des travaux ayant été effectués pour l'étude de la fusion utilisent des lignées cellulaires exprimant parfois plus de 10 000 molécules de CD4, CXCR4 ou CCR5, des quantités beaucoup plus faibles se retrouvent chez les cellules primaires. En effet, les lymphocytes T CD4+ et les macrophages expriment moins de 10 000 molécules de CXCR4 ou CCR5 selon les donneurs et les conditions de croissance *in vitro*. Par contre, le CD4 est exprimé en plus grande quantité, pouvant atteindre plus de 65 000 molécules par lymphocyte T CD4+ (198).

La découverte des radeaux lipidiques, microdomaines spécifiques de la membrane plasmique, a permis de mieux comprendre l'étape de fusion et d'émettre de nouvelles hypothèses. D'une taille variant entre 25 et 700 nm, ces microdomaines contiennent de nombreuses protéines cellulaires, dont le récepteur du VIH-1 (199-201). Le corécepteur CCR5 est également associé aux radeaux lipidiques, alors que le CXCR4 ne l'est pas (202, 203). Ces radeaux lipidiques jouent un rôle dans le processus d'entrée des virus enveloppés, l'ancrage des glycoprotéines de l'enveloppe, l'interaction des protéines de l'enveloppe virale avec des composés lipidiques, l'ancrage de récepteurs cellulaires et l'inhibition de l'entrée virale suite à leur déplétion en cholestérol (204). Il semble que le VIH-1 se lie d'abord au CD4 dans les radeaux lipidiques et qu'ensuite l'association avec le CXCR4 requiert un déplacement des protéines et lipides associés en dehors de cet environnement. Ceci déstabilise la membrane plasmique et favorise la réaction de fusion. De plus, la pénétration du VIH-1 via les radeaux lipidiques libère immédiatement le CPI dans un compartiment favorable à l'infection (204). Une fois les membranes fusionnées, la CA virale est libérée dans le cytoplasme. La fusion est un phénomène indépendant du pH et bien différent de l'entrée par endocytose qui peut également avoir lieu. L'entrée par fusion mène généralement à une infection productive.

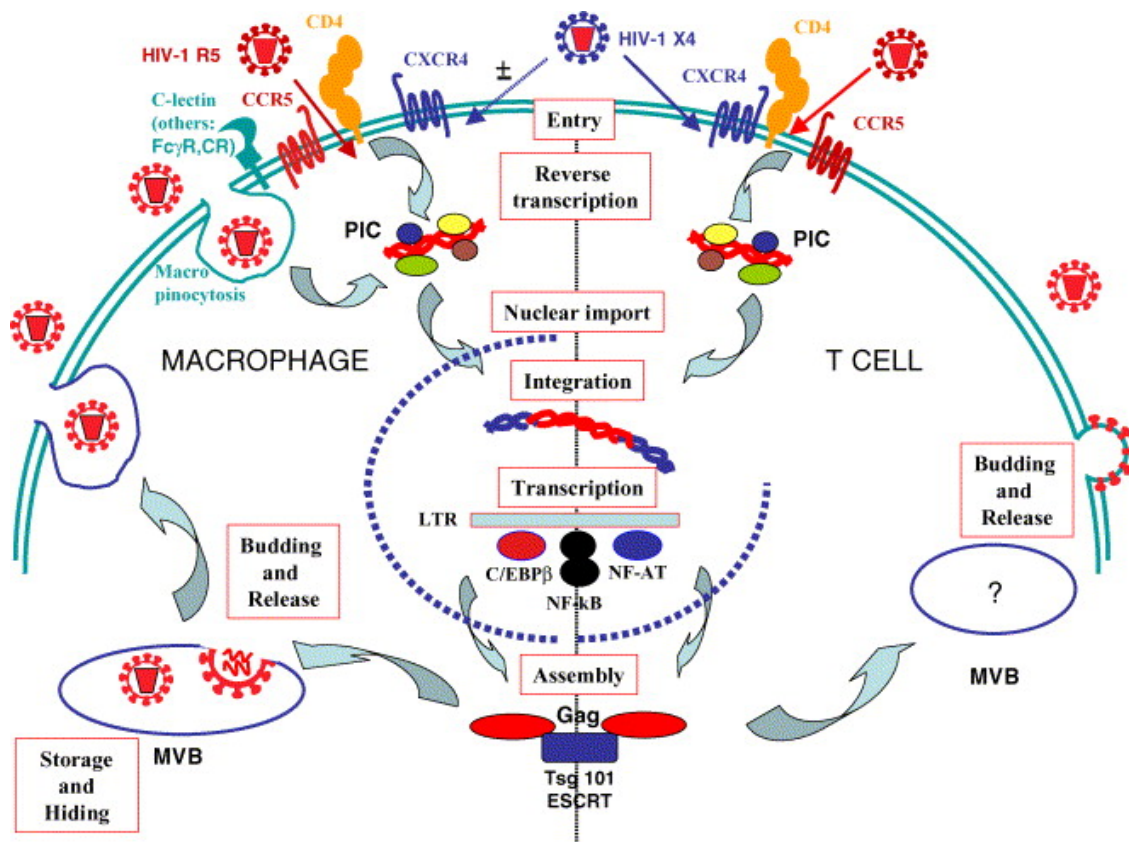


Figure 6. Cycle répliatif chez les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages (119)

1.4.2.2 L'endocytose

Contrairement à l'entrée par fusion qui permet l'infection de la cellule permissive, l'entrée par endocytose culmine dans l'inactivation des virions dans les endosomes acidifiés ou la dégradation dans les lysosomes et, dans la majorité des cellules, à une infection abortive (205-207). Par contre, dans certains types cellulaires, l'endocytose du virus peut avoir des conséquences importantes sur la propagation de l'infection virale. Par exemple, dans les CD, la capture et l'endocytose via la lectine DC-SIGN joue un rôle clé dans la dissémination du VIH-1 (208, 209). Dans les macrophages, les virus sont internalisés à l'intérieur de larges vésicules par un procédé indépendant de tous récepteurs, la macropinocytose. Bien que la grande majorité des virus internalisés de cette manière soient

dégradés, quelques-uns parviennent à engager le CD4 et un corécepteur sur la surface interne d'une structure appelée le macropinosome. Une fusion s'ensuit et la CA virale est ainsi libérée dans le cytoplasme et une infection productive peut avoir lieu (210). L'endocytose a lieu également dans d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales mais également les lymphocytes T CD4+ où près de 60% des virus entrent par cette voie, l'autre 40% provenant de la fusion. Notons qu'il est possible que les virus endocytosés fusionnent avec les membranes de l'endosome avant leur inactivation. Cependant, dans plusieurs cellules, comme les lymphocytes T CD4+, l'endocytose des virions ne contribue pas de manière significative à l'infection.

1.4.2.3 Le transfert et la transcytose des virions

Le mode d'entrée « classique » du VIH-1 consiste en la fusion de virus libres avec des cellules permissives. Par contre, il a été démontré que les virus attachés à la surface d'autres cellules pouvaient être transférés aux lymphocytes T CD4+ lors d'un contact cellule-cellule (140). Ce phénomène a entre autre été observé avec les CD, les macrophages, les neutrophiles, les cellules épithéliales et endothéliales (142, 144, 162, 188).

Un tel transfert de virus peut également avoir lieu lorsque des virus contenus dans des vésicules intracellulaires de CD ou de macrophages sont libérés dans l'espace synaptique, de la synapse immunologique, lors du contact avec un lymphocyte T CD4+ (211, 212). La proximité ainsi créée entre le virus et la cellule permissive favorise l'infection. Le transfert peut être précoce ou tardif selon que les virus transférés sont ceux retenus à la surface des cellules, emmagasinés à l'intérieur de vésicules intracellulaires ou issus d'une infection productive. Dans ce dernier cas, le point de contact entre la cellule infectée et la cellule permissive peut devenir le point de bourgeonnement de la particule virale, qui est alors directement en contact avec les récepteurs et corécepteurs de la cellule cible.

Finalement, il est également possible qu'un lymphocyte T infecté qui rencontre un autre lymphocyte T non infecté, transmette le virus. Dans ce type de transfert, le virus n'est pas libéré dans l'espace synaptique (puisque'il ne s'agit pas d'une synapse), ni dans l'environnement extracellulaire. Le transfert a lieu si lors du bourgeonnement, l'autre lymphocyte T est à proximité. Ainsi, le virus peut être transféré d'une cellule à l'autre (213). Dans certains cas, le virus peut utiliser la transthyrocytose comme autre moyen de « transport » afin de passer d'un environnement à un autre. Les cellules épithéliales utilisent beaucoup ce procédé pour transférer des nutriments des muqueuses aux sous-muqueuses jusqu'aux tissus périphériques. Ce phénomène permet ainsi au virus de se rendre en des endroits stratégiques, riches en cellules du système immunitaire comme les CD, les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs et les macrophages (160, 214).

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

On a longtemps pensé que la décapsidation avait lieu dès l'entrée du virus dans le cytoplasme. Cependant, de nouvelles études ont démontré que cette étape se déroulait plus précisément aux niveaux des pores nucléaires, juste avant l'entrée du CPI dans le noyau (215, 216). Par un mécanisme mal identifié, la CA se déstabilise et son contenu se retrouve donc dans le cytoplasme. Selon certains articles, il semble que l'action de la cyclophiline A pourrait influencer la décapsidation (217). La protéine accessoire Nef du virus joue également un rôle dans la décapsidation en se liant à la pompe à protons V-ATPase, laquelle induit un changement de pH ponctuel qui déstabilise la CA (218).

Une fois décapsidé, le complexe de transcription inverse est relâché. Ce complexe est constitué de deux molécules d'ARN viral (ARN_v), l'ARN de transfert lysine 3 (ARN^{Lys3}) qui sert d'amorce à la TI, la TI, l'IN, la MA, la NC et la protéine accessoire Vpr. La RT, étape qui converti l'ARN en ADN est un processus hautement régulé. Chez les rétrovirus,

l'initiation de la RT requiert l'appariement de dix-huit nucléotides en extrémité 3' de l'ARNt cellulaire à une région spécifique appelée PBS (de l'anglais *Primer Binding Site*), située près de l'extrémité 5' du génome d'ARN (219-221). Dans le cas précis du VIH-1, il existe une forte pression de sélection qui fait en sorte que l'ARNt utilisé est l'ARNt^{Lys3}. Une fois l'ARNt hybridé, la TI synthétise une copie d'ADN complémentaire (ADNc) puis, à l'aide de son activité RNase H, dégrade le brin d'ARN résiduel et termine la synthèse de l'ADN proviral en synthétisant le second brin (222).

La capacité des lentivirus, en particulier le VIH-1, à se répliquer dans des cellules qui ne sont pas en division, comme les macrophages, repose sur le transport actif de l'ADNv dans le noyau de la cellule infectée. Ce procédé dépend de la capacité du CPI, constitué de l'ADNv, MA, IN, TI, Vpr et des protéines de l'hôte liant l'ADN (les HMGI(Y)), à interagir avec la machinerie cellulaire (223, 224). Les différents constituants du CPI contribuent à l'importation nucléaire du VIH-1 par plusieurs mécanismes : MA et IN possèdent des signaux de localisation nucléaire (SLN) fonctionnels pour interagir avec les importines α et β (protéines transporteuses) (225-228) et Vpr régule ce procédé en augmentant l'affinité entre l'importine α et les SLN (229). En plus des importines α et β , d'autres facteurs participent au transport, incluant la petite GTPase Ran et la protéine qu'elle lie, le facteur 2 de transport nucléaire (de l'anglais *Nuclear Transport Factor 2*). Toutes ces protéines travaillent de concert afin de délivrer le CPI dans le noyau de la cellule infectée.

1.4.4 L'intégration

L'intégration de l'ADNv est catalysée par l'IN, une protéine de 32 kDa générée suite au clivage de la polyprotéine Gag-Pol. L'intégration a lieu lorsque l'IN retire deux ou trois nucléotides des extrémités de l'ADNv. Par la suite, elle fait la même chose auprès de l'ADN génomique afin de permettre l'insertion de l'ADNv. Elle catalyse ensuite la liaison des ADN viral et cellulaire (230, 231). Des études ont démontré que le virus s'intègre plus fréquemment en des sites spécifiques, souvent à l'intérieur de gènes qui eux-mêmes sont

régulés lors d'une infection par le VIH-1. Il arrive parfois que l'ADNv ne s'intègre pas au génome cellulaire. Dans ce cas, trois scénarios sont possibles : la liaison des deux extrémités de l'ADN pour former un cercle contenant les deux LTR, la recombinaison homologue du génome viral formant un cercle avec un seul LTR et finalement, il est possible que l'ADN viral demeure linéaire (232). Bien que ces formes d'ADN ne soient pas des substrats pour l'intégration, ils sont des marqueurs importants pour l'évaluation de l'import nucléaire de l'ADNv puisque leur formation requiert la machinerie enzymatique présente dans le noyau de la cellule hôte.

1.4.5 L'expression génique

La régulation de l'expression génique implique plusieurs interactions complexes entre l'ADNv, les facteurs de transcription cellulaire et le transactivateur viral Tat. La transcription peut être divisée en deux étapes. La première phase est médiée par des interactions entre les facteurs de transcription cellulaire et certains éléments situés dans le promoteur du VIH-1. La deuxième phase dépend de l'accumulation suffisante de Tat, pendant la première phase (233). Le niveau de base de l'activité transcriptionnelle du LTR est très faible; la synthèse d'ARN est grandement augmentée (plus de 2 logs) lorsque la protéine Tat est présente (234, 235). Le promoteur du LTR contient une boîte TATA, trois séquences consensus pour la liaison du facteur cellulaire SP1 et deux régions pour NF- κ B. Ces sites de liaison permettent également le recrutement de l'ADN polymérase II lors de la transcription. Les régions en amont des sites de liaison pour NF- κ B influencent également l'expression génique et constituent la région modulatrice du LTR. Cette région contient des éléments de régulation négative (39, 40). Plusieurs facteurs de transcription cellulaires tels que NF-AT, AP-1, c-Myb, USF interagissent avec cette région (37). Finalement, le LTR contient aussi une structure d'ARN en forme de boucle appelée TAR (de l'anglais *Transactivation Response Region*) qui permet la liaison de la protéine virale Tat. Cette interaction permet la synthèse d'ARNm codant pour des protéines structurales du VIH. En fait, si les facteurs de transcription cellulaire ou la protéine Tat sont manquants, le virus est

incapable de produire ses ARNm et entre dans un état de latence. Cet état peut également survenir lorsque l'ADNv s'intègre dans une région où la transcription génique est réprimée. La transcription des gènes du VIH-1 peut débuter suite à l'activation de la cellule par une présentation antigénique, l'effet de certaines cytokines présentes dans le milieu ou la stimulation des TLR (de l'anglais *Toll-like Receptor*), récepteurs de composés microbiens exprimés par plusieurs types cellulaires.

La transcription génère un grand nombre de transcrits (plus de trente) d'ARNv (236). Ces transcrits peuvent être divisés en trois classes : 1-les ARN non épissés, lesquels codent pour Gag et le précurseur GagPol, 2-les ARN partiellement épissés (d'environ 5 kb) qui codent pour Env, Vif, Vpu et Vpr et 3-les petits ARN (1,7 à 2 kb) à épissage multiple qui codent pour Rev, Tat et Nef. Puisque la plupart des ARNm cellulaires subissent l'épissage multiple avant leur transport en dehors du noyau, le besoin d'ARN pleine longueur ou à épissage simple dans le cytoplasme pose un réel problème pour le VIH-1. Cette difficulté peut être surmontée grâce à la protéine virale Rev et son interaction avec le RRE (de l'anglais *Rev Responsive Element*) (237). Le RRE est situé dans le gène *env* et présent dans tous les ARN partiellement épissés ou à épissage multiple. En se liant au RRE, le complexe Rev-RRE-ARN peut ainsi interagir avec la machinerie d'export nucléaire cellulaire et faire en sorte que l'ARNv est transporté du noyau au cytoplasme. La protéine Rev revient par la suite au noyau grâce à son SLN.

L'ADNv non intégré peut aussi servir à la transcription. En effet, les protéines Tat et Nef peuvent être traduites à partir de cet ADN non intégré (238, 239). Par contre, leur production entraîne l'activation des cellules sans toutefois mener à la production de nouvelles particules virales. Il a été démontré que l'ADNv circulaire non intégré, particulièrement celui avec deux LTR, lorsque retrouvé dans les cellules mononucléées du sang périphérique de patient atteints, est associé avec une augmentation de la virémie, un déclin rapide des cellules T CD4+ et une progression accélérée vers le stade du SIDA (240).

1.4.6 L'assemblage et le bourgeonnement

Suite à la synthèse des protéines virales, l'assemblage débute. L'acteur principal de cette étape est le précurseur de Gag, Pr55^{Gag}. Cette protéine contient tout ce qu'il faut pour s'ancrer à la membrane plasmique, favoriser les interactions Gag-Gag, encapsider le génome viral, s'associer avec les protéines de l'enveloppe et stimuler le bourgeonnement. Le domaine MA de Gag est largement responsable de la liaison à la membrane dû à l'ajout d'un acide myristique en son extrémité N-terminale. En fait, il semble que les charges positives de MA interagissent avec les charges négatives des phospholipides de la membrane. Le domaine MA peut également se détacher de la membrane afin de s'associer avec le CPI grâce à un phénomène appelé « myristyl switch » qui lui fait perdre son habileté à lier la membrane.

Une fois Gag à la membrane, il peut maintenant médier les interactions Gag-Gag pour permettre à l'assemblage de débiter. De son côté, la glycoprotéine Env est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) pour générer le précurseur gp160. Celui-ci est alors transporté à la surface cellulaire via la voie de sécrétion; c'est d'ailleurs durant son passage dans le Golgi qu'il est clivé par des protéases cellulaires pour former la gp120 et la gp41. Suite à ce clivage, la gp41 s'ancre au complexe Env situé à la membrane et s'associe de manière non covalente à la gp120. Le complexe formé avec la glycoprotéine Env atteint la surface et peut alors être rapidement internalisé (via la reconnaissance, par la machinerie cellulaire, d'un motif d'endocytose présent dans la queue cytoplasmique de la gp41) ou incorporé dans les nouvelles particules virales. Bien que la compréhension du procédé par lequel les glycoprotéines de l'enveloppe sont incorporées dans les virions demeure incomplet, plusieurs évidences suggèrent qu'une interaction entre la queue cytoplasmique de la gp41 et le domaine MA de Gag recrutent Env dans les virions (241). D'autres protéines virales comme Vpr et Vif sont également incluses dans les particules virales. Vpr est incorporée via une interaction avec le domaine p6 de Gag (242). De son côté, Vif

interagit avec Gag mais également avec la membrane et est incorporée en même temps que l'ARN génomique viral (243, 244).

Certaines protéines cellulaires telles que la cyclophiline A, HP68 et Tsg101, participent également aux dernières étapes du cycle viral. En fait, la cyclophiline A s'associe à Gag et est aussi incorporée dans les virions via une interaction avec les protéines de la capsid (217, 245). De son côté, HP68 favorise l'assemblage de Gag dans les capsides immatures, le mécanisme de ce procédé est toutefois toujours inconnu (246). Finalement, la protéine Tsg101, qui interagit avec le domaine p6, favorise le bourgeonnement (247).

Bien qu'au départ on croyait que le principe de bourgeonnement était totalement aléatoire et spontané, des études ont démontré que des séquences spécifiques étaient nécessaires pour la libération des particules. Ces séquences sont appelées les domaines « late » ou « L » pour rappeler leur rôle qui survient tardivement dans le cycle de vie du virus. Dans le cas du VIH-1, le domaine L se trouve dans le domaine p6 de Gag. En effet, la délétion de p6 ou l'insertion de certaines mutations provoque une accumulation des virus à la surface cellulaire, ce qui les rend incapables de bourgeonner. Les complexes Gag-Gag et Gag-Pol sont tous concentrés et associés avec des domaines membranaires enrichis de cholestérol et de glycosphingolipides appelés les radeaux lipidiques (248). Plusieurs études ont démontré que le VIH-1 bourgeonne sélectivement aux radeaux lipidiques. En effet, la composition lipidique de l'enveloppe virale est enrichie de cholestérol et de sphingolipides, elle contient le ganglioside GM1 et ne contient pas le CD45. De plus, il a été démontré que le cholestérol est important pour l'entrée virale et le bourgeonnement.

Dans les macrophages, l'assemblage a lieu principalement dans les endosomes tardifs et/ou les corps multivésiculaires, MVB (de l'anglais *MultiVesicular Bodies*) (249, 250). Par contre, il a été démontré que ce phénomène existait également chez les lymphocytes T CD4+ (251). L'assemblage ici ressemble beaucoup à celui qui a lieu à la membrane plasmique. Dans ce cas-ci, les virus bourgeonnent dans les MVB et suite à la fusion de

ceux-ci à la membrane, les virus sont alors largués dans l'environnement extracellulaire. La voie de sécrétion des exosomes participe à ce phénomène (252).

1.4.6.1 L'incorporation des molécules de l'hôte

C'est à l'étape du bourgeonnement que les molécules de l'hôte sont incorporées dans les nouvelles particules virales. Comme il a été mentionné précédemment, plusieurs études ont montré que le virus bourgeonnait au niveau des radeaux lipidiques. Ces domaines contiennent plusieurs protéines, il est donc normal que bon nombre d'entre elles se retrouvent aussi à la surface des nouvelles particules virales. Les virus pouvant bourgeonner à la fois des vésicules intracellulaires, comme les MVB, ou à la surface membranaire, il est normal de retrouver des protéines cytoplasmique et membranaire dans les virions. En effet, la cyclophiline A, la déaminase APOBEC3G (de l'anglais *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G*), Tsg101 ainsi que les CMH-I et II, et ICAM-1 sont toutes des protéines retrouvées dans les virus (71). Il existe quatre modèles afin d'expliquer l'incorporation de ces molécules; 1-inclusion par liaison des protéines avec le cytosquelette d'actine, 2-inclusion par l'interaction des protéines cellulaires avec des protéines virales comme la gp120/41 ou Pr55^{Gag}, 3-inclusion passive par la présence ou non des protéines dans les radeaux lipidiques et 4-exclusion causée par l'encombrement stérique nuisant à l'assemblage et au bourgeonnement.

Il semble qu'une partie de chacune de ces théories soit applicable au phénomène d'incorporation des molécules de l'hôte. En effet, dans le cas du ICAM-1, cette molécule interagit avec Pr55^{Gag} via un pont formé avec les filaments d'actine (253). Cette incorporation favorise donc à la fois la théorie voulant que l'inclusion ait lieu via une interaction avec l'actine et celle mentionnant une interaction avec les protéines virales comme Pr55^{Gag} ou gp120/41. Toutefois, l'incorporation du ICAM-1, tout comme celle de la molécule HLA-DR, est indépendante des glycoprotéines de l'enveloppe gp120/41 (253-255). L'hypothèse voulant que les protéines présentes dans les radeaux lipidiques soient

incorporées se confirme également par la présence de CD59 et Thy-1 (256), par contre le fait que certaines protéines résidentes des radeaux lipidiques ne soient pas incorporées (comme le CD45) pourrait s'expliquer par leur taille imposante qui crée de l'encombrement stérique et nuit à l'assemblage du virus. Donc, les hypothèses étant ce qu'elles sont, il est nécessaire de continuer les recherches afin de mieux comprendre et décortiquer ce qui se passe réellement au moment du bourgeonnement des nouvelles particules virales.

1.4.7 La maturation des particules virales

La maturation est un procédé qui entraîne différents changements structuraux à l'intérieur des virions. L'arrangement radial, en forme de beigne, des molécules de Gag se défait pour faire place à une structure conique au centre de la particule virale (257-259). L'activation de la protéase est une étape cruciale dans la morphogenèse du VIH-1. Le clivage de Gag et du précurseur Gag-Pol est essentiel pour la maturation du virus et son infectivité de sorte que des mutations ou l'inhibition de la protéase abolissent la production de particules infectieuses (241). Suite à l'activation de la protéase, le premier clivage survient entre les domaines p2 et NC du précurseur Gag-Pol, suivit du clivage entre MA et CA pour terminer avec le clivage entre CA et p2 (260). Le clivage entre p2 et NC est essentiel chez Gag, alors qu'il ne l'est pas chez Gag-Pol, pour permettre la formation de dimères d'ARN stables et faciliter l'empaquetage de cet ARN. C'est le clivage de Pr55^{Gag} qui induit les principaux réarrangements structuraux dans la particule virale et c'est le dernier clivage entre CA et p2 qui permet la condensation de NC et du génome d'ARN en une forme conique entourée par CA. Ces réarrangements sont nécessaires pour l'infectivité des virus (241, 261-263).

1.5 La défense de l'hôte face à l'infection

L'infection par le VIH-1 génère les réponses immunes innée et acquise qui contrôlent le virus mais ne l'éliminent pas. L'immunité innée, première ligne de défense de l'organisme, n'est pas spécifique et implique les cellules phagocytaires (macrophages, CD et

neutrophiles), les molécules du complément, des peptides antimicrobiens, des molécules anti-virales comme les interférons de type I et les cellules NK/NKT (130). La réponse innée vise la mise en place d'une défense anti-VIH spécifique qui implique les lymphocytes T et B.

Bien que le VIH-1 ait développé des stratégies ingénieuses pour usurper la machinerie cellulaire de l'hôte et faciliter sa réplication, il doit aussi déployer des efforts pour contourner les mécanismes de défense mis sur pied par l'hôte pour restreindre l'infection. Un de ces mécanismes est la protéine cytoplasmique TRIM5 α (de l'anglais *Tripartite motif 5 α*) (264, 265). Des études suggèrent que cette protéine interagit avec les protéines de la CA pendant la formation du complexe de rétro-transcription (266, 267). TRIM5 α séquestre ce complexe et induit sa dégradation dans le protéasome. Malgré ces données, des études sont présentement en cours afin d'élucider clairement le mécanisme d'action de cette protéine. Un autre suppresseur de l'infection du VIH-1 a dicté l'évolution de la protéine virale Vif. La présence de Vif est hautement conservée parmi tous les lentivirus. Rapidement, suite à la découverte de cette protéine, les chercheurs ont noté que sa présence était hautement dépendante des cellules permissives à l'infection. Ainsi, certaines lignées cellulaires (293T, HeLa, SupT1, COS, Jurkat) sont permissives à l'infection par des virus déficients en Vif alors que certaines cellules primaires (lymphocytes T et macrophages) ne le sont pas. Cette observation suggère qu'un facteur cellulaire interagit avec les fonctions de Vif (244, 268). Ce facteur cellulaire, appelé APOBEC3G, inhibe la réplication du VIH-1 et l'habileté de Vif à surmonter cette inhibition (269). APOBEC3G fait partie de la famille des cytosines déaminases qui sont impliquées dans la modification de l'ARN (270). En absence de Vif, APOBEC3G est incorporée dans les virions. À la prochaine ronde d'infection, les virions ayant incorporés cette protéine en subissent les contrecoups. En effet, pendant la synthèse d'ADN, les cytosines sont alors converties en uraciles (271-275). Dans les cellules non permissives, Vif induit la dégradation d'APOBEC3G via la voie de dégradation du protéasome, défiant ainsi son activité antivirale (276-279). Finalement, il est raisonnable de croire que la protéine APOBEC3G est incorporée dans les virus suivant une interaction avec un élément essentiel à la réplication. Certains chercheurs ont proposé qu'il

y aurait une interaction entre APOBEC3G et Gag, en particulier avec le domaine NC (280-282).

De son côté, la réponse immune acquise est spécifique à un agent pathogène et débute suite à la présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules T CD4⁺ activées vont permettre l'initiation des réponses humorale et à médiation cellulaire. La réponse humorale est l'affaire des lymphocytes B qui, suite à leur activation par les lymphocytes T CD4⁺ activés, vont produire des anticorps spécifiques contre des épitopes des particules virales. Ces anticorps se lient au virus et permettent sa lyse par le complément, facilitent sa phagocytose et empêchent sa liaison aux cellules cibles en saturant les sites de liaison. Cependant, la réponse humorale est efficace contre les virus libres et non pas contre les cellules infectées qui doivent être éliminées par l'action d'autres cellules comme les cellules T CD8⁺. Les lymphocytes T CD8⁺ effectrices vont reconnaître les cellules infectées et les détruire par l'action d'enzymes qu'elles relâchent (perforines et granzymes). Elles produisent également de l'IFN γ qui réduit la réplication virale (130).

Malgré tous les efforts de l'hôte, la persévérance du VIH-1 finit par rapporter et une chute du nombre de cellules T CD4⁺ accompagnée d'une hausse de la charge virale s'observe inévitablement chez les personnes atteintes.

1.6 La pathogenèse

L'immunodéficience causée par la perte graduelle des lymphocytes T CD4⁺ fait place à différentes manifestations comme les infections opportunistes. Le cours de la maladie peut être divisé en trois étapes; la primo-infection, la phase chronique ou asymptomatique et le stade SIDA. La durée de chaque étape est très variable et peut être modifiée par la thérapie anti-rétrovirale.

1.6.1 La transmission

La transmission dépend de la concentration du virus dans les liquides biologiques et de la voie d'entrée. Le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et le lait maternel sont tous susceptibles de contenir des particules virales. Les manières les plus courantes de transmettre le virus sont par contacts sexuels non protégés et par le sang (utilisation de drogues intraveineuses par exemple). Le virus peut également être transmis de la mère à l'enfant pendant la grossesse, à l'accouchement ou pendant l'allaitement (130).

Les muqueuses (bouche, vagin, col de l'utérus, rectum, colon) représentent d'excellentes portes d'entrée pour le VIH-1. Par conséquent, ce sont surtout les virus R5 qui initient l'infection (283, 284). Les souches X4, quant à elles, demeurent emprisonnées dans les muqueuses pour être éventuellement dégradées (160, 214). Une fois entrés, les virus se trouvent en contact avec plusieurs cellules du système immunitaire propices à l'infection (CD, macrophages et lymphocytes T CD4+ mémoires effecteurs). L'infection de ces cellules permet au virus d'être transporté dans les organes lymphoïdes secondaires où beaucoup de lymphocytes T CD4+ sont présents, des cibles de choix pour l'infection.

1.6.2 La primo-infection

L'infection par le VIH-1 est accompagnée, chez 50 à 70% des individus, de plusieurs symptômes non spécifiques ressemblant aux symptômes grippaux (285). Ceux-ci apparaissent habituellement deux semaines après la première exposition et incluent généralement de la fièvre, des maux de tête et des myalgies (286, 287). Les symptômes de la primo-infection se résorbent généralement dans les trois à quatre semaines suivant celle-ci. Cependant, une persistance de ces symptômes au-delà de huit à douze semaines ainsi qu'une diminution rapide du nombre de cellules T CD4+ laissent présager une progression plus rapide de la maladie.

D'un point de vue clinique, la primo-infection inclue une diminution du compte absolu des lymphocytes T CD4+ habituellement accompagnée d'une augmentation des cellules T CD8+ circulantes (288). La charge virale, en copies d'ARN, dans le plasma atteint son point maximal généralement une semaine après les symptômes pour une moyenne de 10^6 à 10^7 copies/ml et diminue aux environs de 10^3 - 10^5 copies/ml deux mois après l'infection (289, 290). Cette diminution de la charge virale, accompagnée d'une stabilisation du nombre de lymphocytes T CD4+ circulants est signe du déploiement de la réponse immune spécifique contre le VIH-1

1.6.3 La phase chronique

Suite à la primo-infection et à l'établissement d'un état virologique stable, une longue période dépourvue de symptômes s'installe (trois à dix ans) (291). Le terme « latence clinique » est souvent utilisé pour identifier cette phase, ce qui est totalement inapproprié considérant que la réplication virale continue et que la déplétion des cellules T CD4+ est constante. Cette déplétion suit son cours à raison de 60 cellules/mm³/année, bien que leur nombre puisse demeurer stable pendant plusieurs années avant un déclin rapide (292). Malgré tout, moins de 1% des patients progressent vers le stade SIDA en moins de deux ans (293-295). Cette progression rapide est souvent associée à la transmission de virus formant des syncytiums (c'est-à-dire les virus qui utilisent le corécepteur CXCR4) (293, 296-298). En effet, c'est au cours de la phase chronique que l'on dénote l'apparition des souches virales X4 et R5/X4 et donc la possibilité d'infecter de nouvelles cibles (167).

Durant cette phase, la rotation des lymphocytes T augmente ainsi que leur niveau d'activation et on observe également une augmentation des niveaux de cytokines proinflammatoires et chimiokines dans le sérum (299-301). Il semble que le degré d'activation du système immunitaire est un meilleur indicateur de la progression de la maladie que la charge virale. Cependant, les causes de cette hyperactivation demeurent partiellement inconnues (302-304).

Des événements cliniques mineurs, comme les candidoses vaginale et orale et plusieurs problèmes dermatologiques peuvent apparaître pendant ces années de même qu'une variété de manifestations systémiques. La rémission partielle en réponse aux traitements anti-rétroviraux suggère un rôle direct du VIH-1 dans ces pathogénèses.

1.6.3.1 La translocation microbienne

Récemment, des études ont montré que la déplétion des lymphocytes T CD4+ avait lieu au cours des premières semaines d'infection et qu'elle était surtout localisée dans le tractus gastro-intestinal (104, 305-307). Il a donc été conclu que les dommages à la muqueuse du tractus gastro-intestinal combinés aux dommages des cellules épithéliales intestinales pouvaient affecter l'activation immune systémique pendant la phase chronique de l'infection par le VIH-1 via l'augmentation de la translocation des produits bactériens de l'intestin (303). Le phénomène de translocation microbienne se définit comme étant la translocation de microbes et/ou de produits microbiens sans occasionner de bactériémie (308). Le tractus gastro-intestinal est la principale source de produits microbiens dû aux grandes quantités qu'il contient comparé aux autres sites anatomiques (308, 309). Le lipopolysaccharide (LPS), principal composé des parois des bactéries Gram-négatives et qui a un fort potentiel immunostimulateur (310), peut être quantifié dans le plasma afin de déterminer le degré de translocation microbienne. De plus, le niveau de LPS est directement associé avec le degré de perméabilité intestinale suivant, par exemple, une chirurgie invasive gastro-intestinale (311).

Chez les patients en phase chronique, on remarque une augmentation du taux de LPS dans le plasma, un indicateur de la translocation microbienne, et une association entre le niveau de LPS et l'activation immune (303). De plus, l'environnement pro-inflammatoire qui s'installe localement dans le tractus gastro-intestinal pendant l'infection peut causer des dommages à la barrière épithéliale, ce qui augmente la translocation microbienne et mène subséquemment à l'activation immune systémique (312). On se retrouve donc pris dans un

cercle vicieux puisque l'infection favorise l'activation des lymphocytes T et cette activation favorise la réplication virale. De plus, les cytokines pro-inflammatoires activent les lymphocytes T et diminuent la résistance de la barrière épithéliale ce qui favorise la translocation microbienne et provoque l'activation du système immunitaire (313, 314).

1.6.3.2 Les sujets asymptomatiques à long terme

Certains individus contrôlent l'infection pendant de nombreuses années (quinze-vingt ans) sans que le virus ne prenne le dessus (291). Ces sujets sont appelés asymptomatiques à long terme (ALT) (de l'anglais *Long Term Non-Progressors*) (315-317). Ils représentent 1 à 2% de tous les individus infectés. Pour réussir à contenir l'infection, ces individus développent une très forte réponse immune cellulaire spécifique (cellules NK, lymphocytes T CD4+ et CD8+). Malgré tout, on ignore encore précisément toutes les composantes impliquées dans le contrôle de l'infection.

1.6.3.3 L'évasion virale

Le VIH-1 déploie plusieurs tactiques pour parvenir à échapper au système immunitaire. L'infection des cellules du système immunitaire constitue en soi une stratégie efficace puisqu'en les détruisant, le VIH-1 réduit du même coup les chances de réponse immunitaire efficace. Le virus parvient également à échapper à l'action des lymphocytes T CD8+ en réduisant la quantité de molécules du CMH-I exprimé à la surface des cellules (318, 319). De plus, le virus réduit également le nombre de lymphocytes T CD8+ en induisant leur apoptose (320, 321). Une autre tactique est l'insertion de nombreuses mutations lors du processus de RT, ce qui favorise l'émergence de souches résistantes et permet d'échapper plus facilement aux réponses cellulaire et humorale (322). Ces capacités à modifier certaines protéines de surface cellulaire lui permettent également d'échapper à toute tentative vaccinale.

1.6.4 Le stade SIDA

Les infections opportunistes sont assez rares tant que le compte des cellules T CD4+ demeure au dessus de 500 cellules/mm³, mais elles augmentent rapidement avec la chute de ceux-ci. La candidose orale, les infections à pneumocoques, la réactivation de l'herpès simplex et du varicella zoster sont des manifestations très fréquentes. Lorsque les lymphocytes T CD4+ atteignent moins de 200 cellules/mm³, les infections fongiques, les encéphalites et les méningites à cryptocoques augmentent de manière substantielle (323). Finalement, les infections opportunistes comme la réactivation du cytomégalovirus et les cryptosporidioses indiquent un réel manque de l'immunité cellulaire et surviennent lorsque les comptes de CD4+ sont aux alentours de 50 cellules/mm³. Ces infections sont causées par des bactéries faisant partie de la flore normale ou par d'autres que l'organisme parvient normalement à éliminer chez un individu sain. Les cancers associés au SIDA sont généralement liés à d'autres infections virales comme le sarcome de Kaposi causé par l'infection de l'herpès simplex 8; les lymphomes associés à l'infection d'Epstein-Barr, les carcinomes anal et cervical associés au virus du papillome humain. Sans traitement, les individus infectés survivent environ trois ans.

1.7 Les traitements

Les traitements actuellement disponibles sur le marché ciblent différentes étapes du cycle viral. Malgré leur efficacité prouvée et le fait que ces traitements prolongent de plusieurs années la durée de vie des patients, leurs effets secondaires peuvent être très désagréables et nuire à la bonne qualité de vie des gens atteints. De plus, ces traitements ne permettent pas d'éradiquer le virus ni de rétablir une bonne réponse immunitaire.

Le cycle viral implique plusieurs étapes dont certaines ont été ciblées pour le développement de traitements. Jusqu'à maintenant, plus de 20 antirétroviraux sont approuvés pour le traitement du VIH-1 et plusieurs autres sont en développement.

1.7.1 Les antirétroviraux

La démonstration en 1987 que la zidovudine augmentait la survie des individus a lancé l'ère de la thérapie antirétrovirale (324). Le développement subséquent d'autres NRTI (de l'anglais *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*) a permis la combinaison de plusieurs thérapies (325, 326). Les NNRTI (de l'anglais *Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*) ont également aidé au traitement mais ont rapidement mené à l'apparition de résistances (327-329). Peu de temps après, la découverte des inhibiteurs de protéase a également permis des suppressions durables de la réplication (330). Cependant, au même moment, des études ont démontré que les hauts taux de réplication virale ainsi que l'apparition des quasi-espèces soulevaient le fait que les résistances étaient inévitables (331-333). Le but des antirétroviraux aujourd'hui est donc de réduire les niveaux d'ARNv dans le plasma sous la limite de détection des essais les plus sensibles et de tenter de les maintenir (334).

Le cycle viral se décortique en plusieurs étapes dont certaines ont été ciblées pour le développement des traitements antirétroviraux. La première étape, l'entrée, nécessite l'attachement, la liaison du corécepteur et la fusion des membranes. Bien que certains composés visant à empêcher l'attachement, à l'aide de CD4 soluble, aient bien fonctionné (335, 336), de petites molécules bloquant l'interaction gp120-CD4 ont démontré un bien meilleur potentiel (337, 338). L'inhibition de l'attachement a aussi été démontrée cliniquement via l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de chimiokines, empêchant la liaison de la gp120 au CCR5 ou CXCR4 (339-342). De manière similaire, un anticorps monoclonal humanisé (TNX-355) liant le domaine 2 de la partie extracellulaire du CD4 agit comme un inhibiteur post-attachement et a prouvé son efficacité lors d'études cliniques

(343). L'efficacité de l'inhibiteur de fusion T-20, un oligopeptide synthétique, a également été confirmé (344). Ce traitement bloque la fusion en empêchant la formation de la structure à six hélices de la gp41 (345, 346).

L'inhibition de la RT par des substrats analogues nucléosidiques et nucléotidiques (NRTI) et par des inhibiteurs non compétitifs non nucléosidiques (NNRTI) constitue la majorité des traitements antirétroviraux. Puisque les NRTI n'ont pas de groupement OH à leur extrémité 3', une fois incorporés dans l'ADN complémentaire ils provoquent l'arrêt de la RT (347). Les NRTI constituent la base de la thérapie antirétrovirale depuis l'apparition de la zidovudine en 1987. Les NNRTI se lient aux sites actifs de la TI. La liaison induit un changement de conformation qui inactive celle-ci (348). Ils sont en quelque sorte des inhibiteurs allostériques (349). Les traitements de cette catégorie sont les premiers utilisés, surtout pour prévenir la transmission mère-enfant.

De leur côté, les inhibiteurs de protéase empêchent le clivage de Gag et du précurseur Gag-Pol, donc la maturation requise pour la réplication virale. Les inhibiteurs de protéase mènent à la libération de particules virales non infectieuses (350-352).

Finalement, le développement de bons inhibiteurs d'intégrase est possible. Des études sur les animaux démontrent actuellement d'importantes baisses de la charge virale circulante et ce, pour plusieurs composés. Le Raltegravir, inhibiteur d'intégrase actuellement utilisé chez les patients dont les virus sont résistants à plusieurs antirétroviraux, est très bien toléré et donne d'excellents résultats (353). Beaucoup d'espoirs reposent sur ces futurs médicaments.

Depuis 1996, une combinaison de trois différents traitements (généralement deux inhibiteurs de TI et un inhibiteur de protéase) est utilisée afin de limiter l'apparition de résistances. Cette thérapie est appelée HAART (de l'anglais *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*).

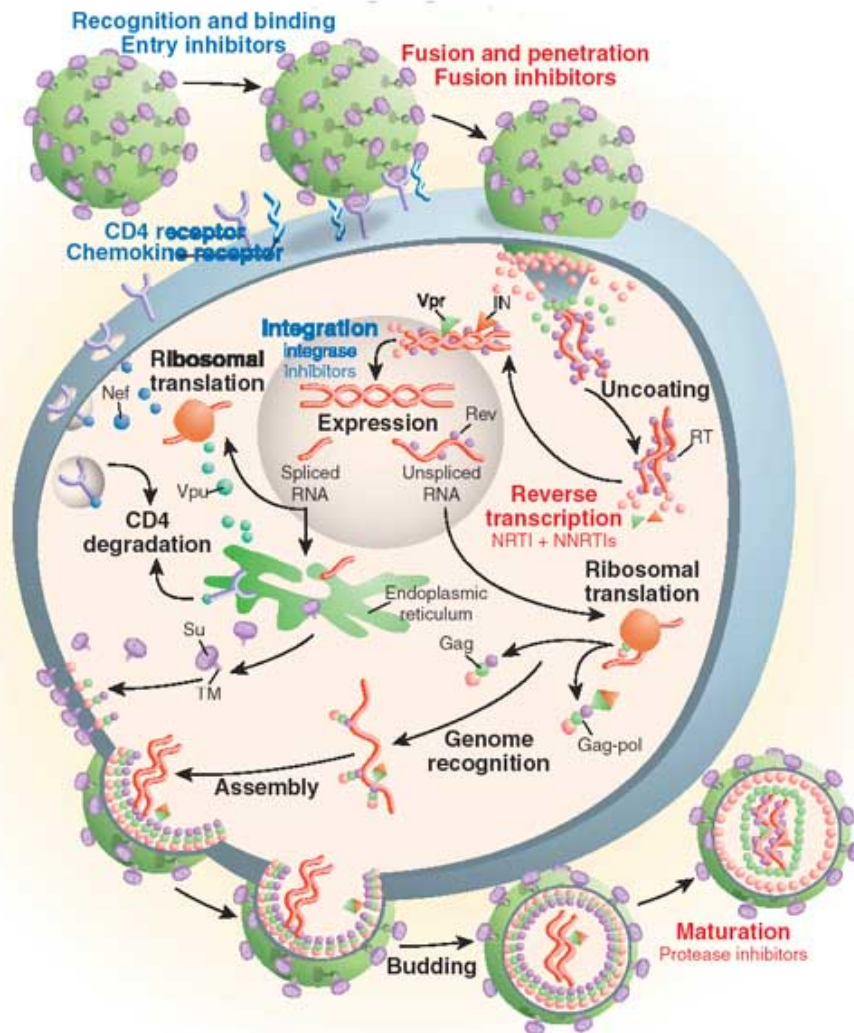


Figure 7. Les cibles thérapeutiques (354)

1.7.1.1 Toxicité associée au traitement HAART

Les patients sous HAART démontrent plusieurs signes de toxicité. Dans le cas des NRTI, les plus sérieux sont l'anémie et la neutropénie (355), la neuropathie périphérique (356-358) et la réaction d'hypersensibilité (359-362). Les moins graves, mais tout aussi limitant,

sont constitués de troubles gastrointestinaux et d'une hyperpigmentation. Plus récemment, plusieurs lipoatrophies périphériques ont été associées à l'utilisation de certains NRTI, fréquemment causées par l'inhibition de l'ADN polymérase mitochondriale γ (363, 364).

L'utilisation des NNRTI peut également être accompagnée d'éruptions cutanées et de toxicité hépatique sévère.

Les inhibiteurs de protéase ont également leurs effets secondaires allant des intolérances gastrointestinales aux toxicités hépatiques. L'incidence de ces complications augmente chez les patients co-infectés avec le virus de l'hépatite C (365).

Finalement, l'utilisation du T-20, qui requiert des infections sous-cutanées, mène à la formation de nodules sous-cutanés douloureux qui limitent, à long terme, l'utilisation de ce médicament (341).

1.7.1.2 La résistance aux antirétroviraux

La capacité de la transcriptase inverse, TI, à insérer plusieurs mutations mène rapidement à l'apparition de virus résistants. Ces résistances sont d'autant plus précoces dans les cas où seule une monothérapie est utilisée. Par exemple, les résistances à la névirapine et à la lamivudine émergent en quelques semaines suivant le début de la monothérapie (366). Dans le cas des inhibiteurs de protéase, ces résistances apparaissent suite à l'accumulation de plusieurs mutations au fil du temps (367, 368).

Des résultats du CDC (de l'anglais *Centers for Disease control*) montrent une prévalence de la résistance aux antirétroviraux chez 15% des nouveaux cas diagnostiqués et une résistance aux médicaments d'une ou de plusieurs classes chez 3 à 4% de ces mêmes cas . De plus, une étude chez des patients américains traités en 1998 révèle que 50% des patients possédaient des virus résistants à au moins une drogue (369).

La résistance aux antirétroviraux peut être décelée par des analyses génotypiques et phénotypiques (370-372) et peut ainsi permettre au médecin traitant de faire un choix judicieux en ce qui a trait au traitement.

1.7.2 Les nouveaux traitements

Les protéines accessoires virales (Nef, Rev, Tat, Vif et Vpr) constituent des cibles potentielles puisqu'elles sont nécessaires à la réplication.

Plusieurs autres facteurs de restriction cellulaires qui empêchent l'infection par le VIH-1 pourraient également être ciblés. C'est le cas entre autre des protéines APOBEC3G et TRIM-5 α . APOBEC3G introduit des erreurs dans l'ADNv pendant la RT, rendant le virus non infectieux (273). La protéine virale Vif agit sur APOBEC3G et pourrait donc servir de cible intéressante pour le développement d'un nouveau traitement. De son côté, TRIM-5 α est un composé des corps cytoplasmiques qui module les événements précoces du cycle réplcatif (265).

Plusieurs approches de thérapie génique ont été proposées pour rendre les cellules T CD4+ résistantes à l'infection par le VIH-1. Parmi elles, mentionnons l'utilisation de ribozymes, d'ARN antisens et de petits ARN interférants (de l'anglais *Small Interfering RNA*, *siRNA*) employés dans le but de réprimer l'expression des gènes cellulaires ou viraux (373, 374). Bien que ces approches aient montré des résultats prometteurs en laboratoire, elles n'ont toutefois pas encore prouvé leur efficacité chez les patients.

1.7.3 L'immunothérapie

Il existe aussi plusieurs thérapies basées sur l'immunité et visant à développer la réponse immune de l'hôte ou à développer une réponse virus-spécifique. Entre autres, les

traitements intermittents avec de fortes doses d'IL-2 ou l'administration régulière sous-cutanée de faibles doses d'IL-2 produisent une augmentation substantielle et soutenue du nombre de lymphocytes T CD4+ (375-380). Les thérapies immunosuppressives visant à limiter la réplication virale en limitant le niveau d'activation immunitaire inappropriée qui accompagne généralement l'infection par le VIH-1 ont aussi donné de bons résultats, quoique variables (381-386)

1.8 Conclusion

Le VIH-1 est un pathogène astucieux qui a développé et utilise à merveille plusieurs stratégies afin de détourner le système immunitaire. Ce chapitre a passé en revue les principales caractéristiques du virus ainsi que ses modes d'actions pour déjouer l'organisme. L'infection productive nécessite plusieurs étapes dont l'attachement, la fusion, la RT, l'intégration, la transcription, l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation. Une fois dans la cellule, le virus exploite les facteurs cellulaires pour sa propre réplication. Malgré le fait que la cellule possède quelques mécanismes pour contrer le virus (APOBEC3G et TRIM-5 α), celui-ci parvient très souvent à les contourner. L'infection par le VIH-1 mène à une déplétion massive des lymphocytes T CD4+ ce qui affaiblit considérablement le système immunitaire. Le virus peut aussi persister dans certains types cellulaires comme les macrophages et les Tmc. Ces cellules sont un véritable problème puisqu'elles constituent des réservoirs difficiles à éradiquer. La compréhension des événements liés à l'infection initiale, aux acteurs cellulaires qui y participent ainsi qu'aux facteurs menant à l'hyperactivation du système immunitaire demeure essentielle afin de permettre le développement de nouveaux traitements.

Chapitre 2. Les récepteurs Toll-like

Les mammifères sont constamment sujets aux invasions par des micro-organismes et ils ont développés au cours de l'évolution des systèmes de défense pour éliminer ces pathogènes. Le système immunitaire est constitué des réponses immunes innée et acquise. La réponse innée est la première ligne de défense de l'hôte contre les pathogènes et est médiée par les phagocytes, incluant les macrophages et les cellules dendritiques. Alors que la réponse immunitaire acquise est spécifique à un pathogène donné, la réponse innée ne l'est pas ou l'est beaucoup moins. En fait, elle parvient à distinguer les antigènes provenant de l'hôte de ceux qui proviennent des pathogènes. Le système immunitaire innée reconnaît des micro-organismes via un nombre limité de récepteurs qui reconnaissent des structures précises des pathogènes, on les appelle les PRR (de l'anglais *Patterns Recognition Receptors*).

2.1 La découverte des récepteurs Toll

C'est vers la fin des années 90 que le premier récepteur Toll fût découvert chez la mouche à fruits *Drosophila*, associé à la polarité embryonnaire dorsale-ventrale (387). La protéine Toll chez la *Drosophila* code pour une protéine transmembranaire très homologue au récepteur de l'IL-1 (IL-1R), appelé le domaine Toll/IL-1R (TIR) (388). C'est par la suite que différentes études ont montré que Toll avait un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée, puisqu'une mutation au sein de cette protéine entraînait une diminution de la survie des mouches suite à une infection fongique (387, 389). Un an plus tard, un homologue mammifère du récepteur Toll, appelé récepteur Toll-like 4 (TLR4) a été identifié puisqu'il induisait l'expression de gènes inflammatoires (390). Depuis, 11 différents homologues humains de la protéine Toll de la *Drosophila* ont été identifiés (391, 392).

2.2 La structure des récepteurs Toll-like

Les TLR sont des glycoprotéines membranaires de type I caractérisées par des domaines extracellulaires contenant un nombre variable de répétitions riches en leucine (RRL) et un domaine cytoplasmique homologue à celui du récepteur de l'IL-1 (IL-1R), appelé Toll/IL-1R ou domaine TIR (393). Les domaines RRL sont composés de 19-25 tandems de motifs RRL, chacun ayant de 24-29 acides aminés de longueur et contenant le motif XLXXLXX ainsi que d'autres résidus d'acides aminés conservés (XØXXØXXXXFXLX; Ø = résidu hydrophobe). Chaque RRL consiste en un feuillet β et une hélice α reliés par des boucles. Les motifs RRL sont responsables de la reconnaissance des ligands et varient beaucoup entre les TLRs, bien qu'ils arrivent à discriminer les différents PAMP (de l'anglais *Pathogen-Associated Molecular Patterns*).

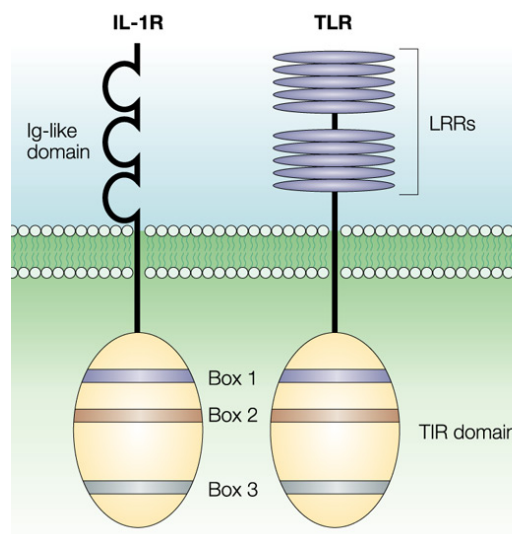


Figure 8. La structure des TLR (394)

2.3 L'expression des différents récepteurs Toll-like

Les TLR sont exprimés sur plusieurs cellules immunes incluant les macrophages, les CD, les lymphocytes B et certains types de lymphocytes T, mais ils sont également présent sur des cellules non-immunes comme les fibroblastes et les cellules épithéliales. L'expression des TLR n'est pas statique et peut être modulée rapidement en réponse aux pathogènes, à différentes cytokines et aux stress de l'environnement. De plus, les TLR peuvent être exprimés extra- ou intra-cellulairement. En effet, alors que certains TLR (TLR 1, 2, 4, 5, 6) se retrouvent à la surface cellulaire d'autres (TLR 3, 7, 8, 9) sont présents exclusivement dans les compartiments intracellulaires tels que les endosomes. Dans ce cas, leurs ligands, principalement des acides nucléiques issus des agents pathogènes, requièrent l'internalisation dans les endosomes avant que toute signalisation ne soit possible. Les régions transmembranaires et membrane-proximale sont très importantes pour la compartimentalisation cellulaire de ces récepteurs (392). Les prochaines sections présentent les principaux types cellulaires exprimant les TLR bien que d'autres types de cellules expriment également ces récepteurs. L'énumération qui suit n'est donc pas exhaustive.

2.3.1 Les TLR exprimés selon les types cellulaires

Il est important de rappeler que la grande majorité des études ont étudié les niveaux d'ARNm et non pas des protéines exprimées. Par conséquent, il n'est pas rare qu'un type cellulaire exprime l'ARN de plusieurs TLR et ne réponde qu'aux ligands de quelques-uns seulement.

2.3.1.1 Les lymphocytes T

L'expression des différents TLR exprimés par les lymphocytes T dépend du fait qu'ils soient naïfs ou mémoires, quiescents ou activés, CD4⁺ ou CD8⁺ et que leur RCT soit constitué des chaînes $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. À la base, il a été démontré que les lymphocytes T CD4⁺

quiescents isolés directement du sang périphérique contiennent les ARNm des TLR1, 2, 3, 4, 5, 7 et 9 mais en quantités variables (395-397). Par contre, peu de lymphocytes expriment les TLR1, 2 et 4 dans leur état quiescent alors que l'expression du TLR2 est augmentée chez les cellules mémoires (CD45RO+) et les cellules activées (398, 399). En fait, il semble que la liaison du CD3 par le RCT augmente l'expression des TLR2 et 4 et réduit celle du TLR5 (400). Par contre, la même analyse chez des lymphocytes T isolés d'amygdales a permis de constater que seuls les TLR1, 2, 3, 5, 9 et 10 étaient présents et qu'il y avait certaines différences entre les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (401). De plus, les lymphocytes T CD4+ dont le RCT est constitué des chaînes $\alpha\beta$ expriment plus de TLR1 et 3 que ceux dont le RCT est fait des chaînes $\gamma\delta$ (402, 403).

2.3.1.2 Les monocytes et les macrophages

Les monocytes, précurseurs des macrophages et des CD myéloïdes, expriment une grande variété de TLR. En effet, l'ARNm des TLR1, 2, 4, 5, 6, 7 et 8 a été identifié chez ces cellules. Bien que la plupart des études s'entendent sur la présence ou non de ces TLR chez les monocytes, la présence du TLR7 est beaucoup plus controversée. Certaines équipes détectent de faibles quantités de TLR7 (404, 405) alors que d'autres persistent à dire que les monocytes ne possèdent tout simplement pas ce TLR (395, 406-409). De leur côté, les macrophages expriment tous les TLR connus (396).

2.3.1.3 Les cellules dendritiques

Il existe différentes sous-populations de CD; les CD myéloïdes (CDm) dites conventionnelles, les CD plasmacytoïdes (CDp) et les CD dérivées de monocytes (CDDM) *in vitro* à l'aide de cytokines (GM-CSF et IL-4). Chacun de ces sous-types exprime un patron de TLR différents qui doit être considéré. Afin de faciliter cette section, les résultats ont été regroupés dans le tableau qui suit ainsi que ceux des monocytes préalablement mentionnés afin de montrer que certains TLR apparaissent ou disparaissent dans les

différents processus de différenciation. Le fait que les mots « oui » et « non » se retrouvent parfois dans la même case, indique la présence d'une controverse au sujet de l'expression de ce TLR en particulier. Selon les TLR stimulés, les CD répondent différemment, leurs sécrétions de cytokines étant également différentes. Ce sont ces différentes cytokines qui vont mener à la différenciation des lymphocytes T avoisinants soit vers un profil Th1 (pro-inflammatoires), un profil Th2 (anti-inflammatoire) ou un profil Th17.

Tableau 2 Expression des différents TLR selon le type cellulaire (395, 404-406, 408-410)

| | Monocytes | CD Myéloïdes | CD Plasmacytoïdes | CD <i>in vitro</i> |
|-------------|------------------|---------------------|--------------------------|---------------------------|
| TLR1 | OUI | OUI | OUI | OUI |
| TLR2 | OUI | OUI | NON | OUI |
| TLR3 | NON | OUI | NON | OUI |
| TLR4 | OUI | NON | NON | OUI |
| TLR5 | OUI | OUI | NON | OUI |
| | | | | NON |
| TLR6 | OUI | OUI | OUI | OUI |
| TLR7 | OUI | OUI | OUI | NON |
| | NON | NON | | |
| TLR8 | OUI | OUI | NON | OUI |
| TLR9 | NON | NON | OUI | NON |

| | | | | |
|--------------|-----|-----|-----|------|
| TLR10 | NON | OUI | OUI | N.D. |
|--------------|-----|-----|-----|------|

2.3.1.4 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B, tout comme les lymphocytes T, ont des patrons d'expression des TLR différents selon qu'ils soient naïfs ou mémoires. En fait, les lymphocytes B naïfs n'expriment pas de niveaux significatifs de TLR à moins qu'ils n'aient été pré-stimulés via le récepteur des cellules B (RCB). De leur côté, les cellules B mémoires présentent des niveaux significatifs des TLR2, 6, 7, 9 et 10 (411, 412). De plus, le niveau d'expression de chacun de ces TLR varie selon que les lymphocytes B proviennent des zones marginales ou des centres germinatifs situés dans les organes lymphoïdes secondaires (413, 414).

2.3.1.5 Les cellules NK

Les cellules NK expriment les TLR1, 2, 3, 5, 6 et 9, l'ARNm du TLR1 étant le plus présent et celui du TLR9 étant le plus faible. Malgré tout, les cellules NK sont un bel exemple que la présence en ARNm des TLR ne corrèle pas forcément avec leur expression en protéine ou leur fonctionnalité. En effet, même si l'ARNm du TLR9 est présent, aucune réponse n'est décelée suite à une stimulation de celui-ci avec des motifs CpG (395).

2.3.1.6 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les cellules immunes les plus abondantes du sang. Elles arrivent rapidement aux sites d'infections et constituent la première ligne de défense. Ces cellules possèdent une grande variété de fonctions effectrices antimicrobiennes. Les neutrophiles expriment tous les TLR de 1 à 10 sauf le TLR3 (415). Par contre, ces cellules ne répondent qu'aux stimulations des TLR2, 4 et 8 (416). L'expression, entre autre du TLR2, est

augmentée par les cytokines pro-inflammatoires et suite à l'exposition du neutrophile à de multiples bactéries (417). Il est clair que ces deux TLR régulent les fonctions pro-inflammatoires et la défense de l'hôte par le neutrophile (418).

2.3.1.7 Les éosinophiles

Les éosinophiles expriment les TLR1, 4, 7, 9 et 10, le TLR7 étant le plus présent. Malgré ce vaste éventail de TLR, seule la stimulation du TLR7 module leurs fonctions (419).

2.3.1.8 Les mastocytes

Outre leur contribution aux réponses allergiques et à l'inflammation chronique, les mastocytes sont également impliqués dans la défense de l'hôte contre les infections bactériennes (420-422). Les mastocytes possèdent les ARNm des TLR1, 2, 4 et 6 bien qu'ils ne répondent qu'aux TLR2 et 4 (423-425).

2.3.1.9 Les cellules épithéliales

Reconnues comme étant une excellente barrière physique contre les infections, les cellules épithéliales ont également développé des fonctions antimicrobiennes ainsi que l'habileté à moduler le recrutement et l'activité d'autres cellules immunes. On retrouve des TLR chez plusieurs types de cellules épithéliales et les patrons d'expression diffèrent beaucoup selon le type cellulaire. Ainsi, les cellules épithéliales du système respiratoire expriment les TLR 1 à 10, les cellules intestinales les TLR 1 à 4 ainsi que les TLR 6 et 9 et les cellules épithéliales gastriques présentent les TLR 2, 4 et 5 (426-428). De plus, chez la femme, les cellules épithéliales du vagin et du col de l'utérus expriment les TLR 1, 2, 3, 5 et 6 (429).

2.4 Les différents ligands

Les TLR reconnaissent une multitude de ligands provenant à la fois des bactéries et des virus. Une fois liés à leur récepteurs, ces différents ligands engendrent différentes cascades de signalisation menant à la sécrétion de plusieurs cytokines et/ou d'IFN de type I. Les TLR, ainsi que leurs ligands, sont présentés à la figure 9.

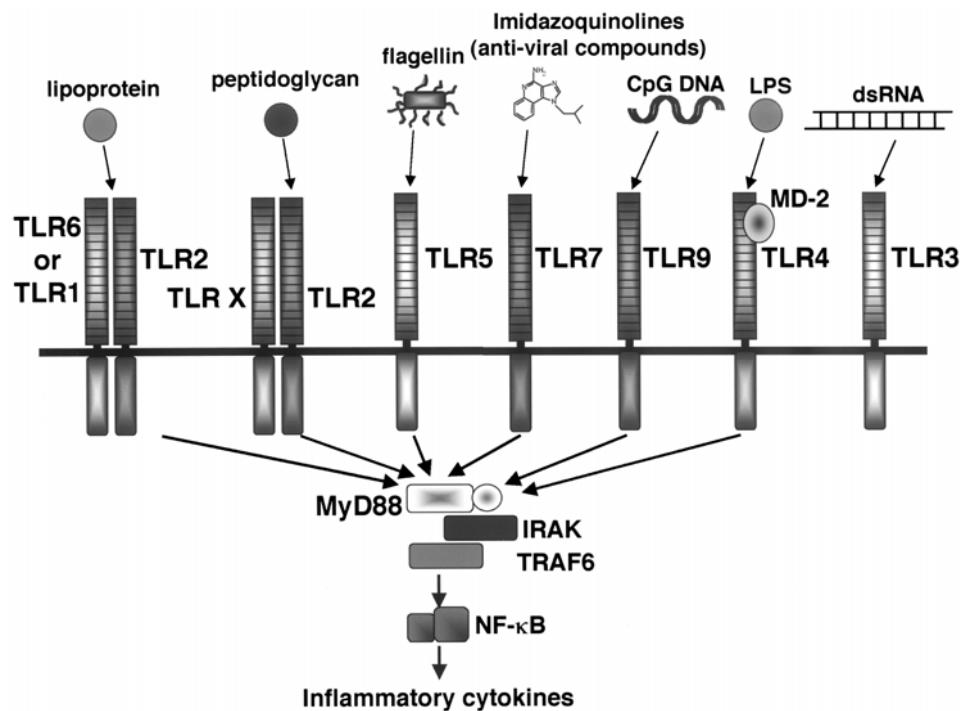


Figure 9. Les différents ligands des TLR (430)

2.4.1 La reconnaissance des bactéries

2.4.1.1 Les parois des bactéries Gram-positive et Gram-négative

Les bactéries peuvent être classées en deux groupes majeurs selon la constitution de leur paroi, on parle alors de bactéries Gram-positives ou Gram-négatives (figure 10). Certains

composés de la paroi bactérienne agissent comme PAMP et peuvent être reconnus spécifiquement par différents TLR. C'est le cas entre autre du LPS, aussi connu pour être une endotoxine. Le LPS est libéré des bactéries Gram-négatives en association avec la protéine liant le LPS (PLL), une protéine de phase aigüe présente dans la circulation sanguine. Celle-ci se lie au CD14, une protéine liée à la surface des cellules phagocytaires permettant ainsi au LPS d'être transféré à la protéine MD-2, elle-même associée à la portion extra-cellulaire du TLR4. Cette association entraîne l'oligomérisation du TLR4 et déclenche une cascade de signalisation résultant à l'activation de gènes liés à la réponse inflammatoire (431, 432). Différentes bactéries produisent des LPS distincts qui peuvent varier selon leur composition en phosphate ou en acides gras.

Les composés des parois des bactéries Gram-positives peuvent également stimuler l'immunité innée. Bien que ces bactéries ne contiennent pas de LPS, ce sont les acides lipoteichoïques (ALT) qui semblent fonctionner de manière similaire. Les lipoprotéines et les peptidoglycans (PG), qui sont présents à la fois chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, sont aussi de forts immuno-stimulants. Le TLR2 joue un rôle majeur dans la détection des bactéries Gram-positives et est impliqué dans la reconnaissance d'une grande variété de composés microbiens incluant les ALT, les lipoprotéines et les PG. Le TLR2 interagit physiquement et fonctionnellement avec les TLR1 et TLR6, ce qui lui permet de différencier des changements subtils dans la portion lipidique des lipoprotéines. Les ALT contiennent également des portions diacylées et conséquemment ils peuvent activer les cellules via l'hétérodimère TLR2/TLR6. Le duo TLR2/TLR1 reconnaît de son côté des portions triacylées.

Les PG sont composés de longues chaînes linéaires de sucres où le N-acétyl glucosamine (GlcNac) et l'acide muramique N-acétyl (MurNac) sont reliés par des ponts peptidiques pour former de grosses structures macromoléculaires. Bien que le TLR2 ait également été rapporté pour être capable de lier les PG, cette observation demeure controversée (433). L'importance du TLR2 dans la défense de l'hôte contre les bactéries Gram-positives a été

démontrée en utilisant des souris déficientes pour ce TLR, lesquelles étaient très susceptibles à l'infection par *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae* (434, 435). Chez l'humain, un polymorphisme dans le gène du TLR2 a été démontré et associé à une réponse réduite à différentes lipoprotéines bactériennes et au choc septique suite à une infection par les staphylocoques (436). Ce polymorphisme a été identifié chez un groupe de sujets Caucasiens où 6-9% étaient hétérozygotes.

Finalement, les bactéries uropathogéniques sont reconnues, chez la souris, par le TLR11 bien que le composé responsable de cette activation n'ait pas encore été identifié (391). Cependant, le TLR11 chez l'humain est non fonctionnel due à la présence d'un codon stop dans le gène.

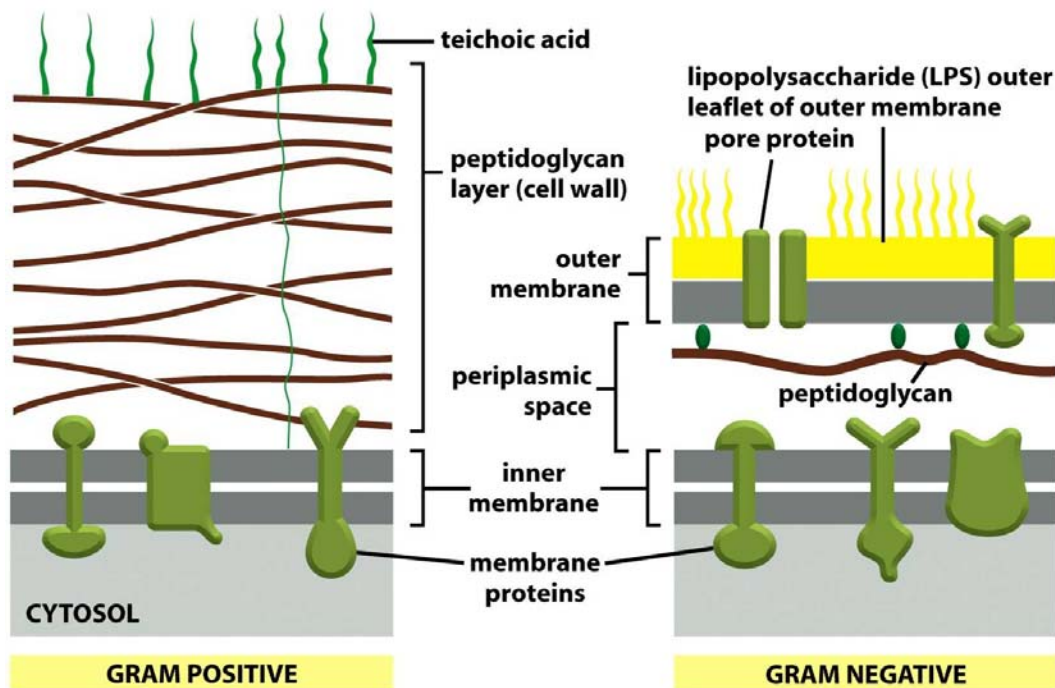


Figure 10. Structure des parois de bactéries Gram-positives et -négatives (437)

2.4.1.2 La flagelline

La flagelline est le constituant majeur de la flagelle de certaines bactéries, appareil de motilité utilisé par plusieurs pathogènes, et c'est un activateur puissant de la réponse immune innée. Le TLR5 est responsable de la détection de la flagelline et plus spécifiquement du domaine constant D1, lequel est relativement conservé chez les différentes espèces (438). Le TLR5 est exprimé par les cellules épithéliales, les monocytes et les cellules dendritiques immatures. Puisque le TLR5 est exprimé du côté baso-latéral des cellules intestinales, la flagelline est reconnue par l'hôte seulement lorsque la bactérie a réussi à traverser l'épithélium (439). Le TLR5 est également très présent dans les poumons et semble y jouer un rôle important dans la défense contre les pathogènes respiratoires. Jusqu'à 10% des individus ont une mutation qui introduit un codon stop dans le domaine de liaison du ligand. Cette mutation est associée à une susceptibilité accrue aux pneumonies causées par la bactérie flagellée *L. pneumophila* (440). Plusieurs bactéries, comme *Helicobacter pylori* et *Campylobacter jejuni* produisent de la flagelline qui n'entraîne pas de reconnaissance immune, parvenant ainsi à échapper aux défenses de l'hôte (441).

2.4.1.3 L'ADN bactérien

L'ADN bactérien est également un puissant immuno-stimulant et est reconnu par le TLR9 (442, 443). Son effet stimulant est dû à la présence de dinucléotides CpG non-méthylés présents au sein de l'ADN bactérien. Bien que le motif CpG soit abondant dans les génomes bactériens, sa fréquence est réduite et il est hautement méthylé dans les génomes de mammifères. Les motifs CpG méthylés n'activent pas les cellules immunes des mammifères. Des oligonucléotides synthétiques contenant des motifs CpG sont équivalents à l'ADN bactérien quant à leur pouvoir d'activation des cellules immunes. Puisque le TLR9 réside dans les endosomes, l'ADN bactérien doit être libéré dans ces compartiments intracellulaires, où l'acidification et les conditions réductrices mènent à la dégradation de l'ADN double-brin en plusieurs régions simple-brin contenant les motifs

CpG qui interagissent subséquemment avec le TLR9 (444, 445). Les composés qui empêchent l'acidification des endosomes, comme la bafilomycine et la chloroquine, inhibent la signalisation engagée par les motifs CpG et le TLR9 (446). En fait, l'interaction du TLR9 avec ces ligands serait optimale à des pH variant de 5.5 à 6.5 (447). Cependant, des études ont récemment démontré qu'une chimère du TLR9 localisée à la surface cellulaire pouvait lier les motifs CpG, suggérant que l'acidification n'est peut-être pas réellement nécessaire (448). Cette étude suggère que l'expression du TLR9 dans les compartiments intracellulaires est importante pour empêcher la reconnaissance de l'ADN de l'hôte. D'autres études seront nécessaires pour clarifier le rôle de l'acidification des endosomes dans la reconnaissance des motifs CpG.

2.4.2 La reconnaissance des mycobactéries

Les mycobactéries sont des bactéries intracellulaires qui survivent dans les macrophages de l'hôte selon différents mécanismes. La paroi des mycobactéries est composée d'une épaisse couche de lipides et de polysaccharides et est caractérisée par la présence en grande quantité d'acide mycolique. Des parois purifiées de mycobactéries ont démontré qu'elles activaient préférentiellement le TLR2 et parfois le TLR4. Le lipomannane (LM) et le lipoarabinomannane (LAM) sont également de puissants activateurs de la réponse immune. Le domaine arabinane peut soit être lié au mannosyle pour produire le ManLAM ou à un résidu phosphoinositide pour donner le PILAM. Ce dernier est un activateur du TLR2 identifié chez une espèce non-pathogénique, *Mycobacterium smegmatis* (449). Au contraire, le ManLAM est une puissante molécule anti-inflammatoire qui est retrouvée chez les espèces pathogéniques *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG et *Mycobacterium avium*. Puisque le LM des espèces de mycobactéries est à la fois pathogénique et non-pathogénique, indépendamment de leur origine, et induit des cytokines inflammatoires suite à la liaison du TLR2, alors la réponse ultime contre les mycobactéries peut être déterminée par le ratio ManLAM/LM de la paroi mycobactérienne (450).

De plus, l'association du TLR2 avec le TLR1 permet la reconnaissance d'une lipoprotéine de 19 kDa associée à la paroi, un antigène sécrété par *M. tuberculosis* qui mène à l'induction de cytokines par le macrophage (451). Le TLR9 peut également être activé par l'ADN mycobactérien, lequel peut être libéré pendant la dégradation endosomale.

2.4.3 La reconnaissance fongique

L'observation initiale chez la *Drosophile* révélant que les mouches déficientes pour le récepteur Toll étaient susceptibles aux infections fongiques, soulève l'idée que les TLR des mammifères pourraient également participer à l'immunité anti-fongique. Les TLR sont impliqués dans la reconnaissance de pathogènes fongiques tels que *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus feoformans* et *Pneumocystis carinii* (310, 452). Plusieurs PAMP fongiques sont situés dans les parois cellulaires ou sur la surface cellulaire des champignons et sont reconnus par le TLR2 ou le TLR4. La plupart des expériences ayant permis d'arriver à ces conclusions ont été menées chez des souris déficientes pour ces TLR. Ainsi, les souris déficientes pour le TLR4 ont montré une susceptibilité aux infections par *Candida*, alors que les souris déficientes pour le TLR2 ont plutôt démontré une résistance (452).

Dectine-1 est une protéine transmembranaire de type II qui possède un domaine lectine de type C dans sa région extracellulaire et un motif ITAM dans son domaine intracellulaire. La Dectine-1 lie les β -glycans, composé majeur du zymosan, et est le principal récepteur des macrophages pour la phagocytose de plusieurs champignons (453). Il a été démontré que la Dectine-1 peut collaborer avec le TLR2 en réponse aux levures et mener à une forte réponse inflammatoire via le recrutement de diverses protéines intracellulaires (454-456).

2.4.4 La reconnaissance des protozoaires et parasites

Les composés des parasites protozoaires sont également détectés par les TLR. Ces parasites protozoaires incluent *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* and *Plasmodium falciparum*. Les molécules dérivées des Trypanosomes comme les mucines glycosylphosphatidylinositol (tGPI-mucine), les glycoinositolphospholipides (GIPL) et l'ADN génomique sont reconnues pour activer les TLR2, TLR4 et TLR9 respectivement (457).

Dans le cas de *P. falciparum*, les schizonts présents dans le sang ou les extraits de schizonts solubles activent les CDp via le TLR9 (458). Récemment, l'hémozoïne, un produit de l'hème, a également démontré une activation du TLR9 (459).

2.4.5 La reconnaissance des virus

Les virus contiennent du matériel génétique constitué d'ADN ou d'ARN qui code pour les composés structuraux viraux et différents enzymes. Plusieurs composés, incluant l'ADN viral, l'ARN double-brin, l'ARN simple-brin et les glycoprotéines de surface, sont des PAMP et sont reconnus par les TLR et autres PRR. Parmi les TLR, les TLR3, 7, 8 et 9 sont impliqués dans la reconnaissance des nucléotides viraux. La reconnaissance des composés viraux induit généralement la production d'interféron (IFN) de type I qui active les cellules cibles de manières autocrine et paracrine.

2.4.5.1 L'ADN viral

L'ADN viral contient des régions riches en motif CpG qui lient le TLR9 induisant ainsi la sécrétion de cytokines inflammatoires et d'IFN de type I (6, 460-463). La reconnaissance de l'ADN viral ne requiert pas la réplication virale puisque les virus inactivés aux rayons ultra-violetts induisent les mêmes réponses que les virus vivants.

2.4.5.2 L'ARN simple-brin

Plusieurs virus enveloppés transitent dans le cytosol via les compartiments endosomaux. Le phagolysosome est un environnement hautement acidifié qui contient plusieurs enzymes de dégradation qui peuvent endommager les particules virales menant à la libération d'ARN simple-brin et à la reconnaissance par les TLR 7 et 8. Les gènes codant pour ces TLR présentent une forte homologie. Le TLR7 murin et le TLR8 humain reconnaissent des composés antiviraux synthétiques appelés imidazoquinoline (R848, Imiquimod) et certains analogues de nucléotides de guanine (Loxoribine) (464, 465). Les TLR 7 et 8 sont capables de reconnaître des régions riches en uridine et guanosine du VIH-1, virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et virus de l'influenza. Les TLR 7 et 8 sont exprimés dans les membranes endosomales, indiquant que l'accessibilité de l'ARN simple-brin est peut être un facteur clé pour l'activation cellulaire via ces récepteurs. De plus, lorsque des cellules infectées par des virus sont phagocytées, les ARN viraux peuvent être libérés de ces cellules dans le phagolysosome. Contrairement aux particules virales où le génome est encapsidé, les ARN de l'hôte sont sujets à la dégradation par les RNases extracellulaires lorsqu'ils sont libérés d'une cellule et atteignent rarement les compartiments d'endocytose.

2.4.5.3 L'ARN double-brin

L'ARN double-brin ainsi que son analogue synthétique, l'acide polyinosine-déoxycytidylique (poly I :C), sont de forts inducteurs d'IFN de type I et sont reconnus par le TLR3 (466). L'ARN double-brin peut être généré pendant l'infection virale en tant qu'intermédiaire de réplication pour les virus d'ARN simple-brin ou comme produit de transcription symétrique de virus à ADN. Le TLR3 est exprimé par les CD conventionnelles mais pas par les CDp. Le TLR3 est également exprimé par plusieurs cellules épithéliales incluant celles des voies respiratoires, de l'utérus, de la cornée, du vagin, du col de l'utérus et de l'intestin. Ce TLR est également très exprimé dans le cerveau, spécifiquement par les astrocytes, indiquant un rôle spécifique dans le cerveau

et/ou une réponse aux virus causant des encéphalites. Pour de multiples raisons, le rôle du TLR3 dans la réponse antivirale demeure nébuleux (392).

2.4.5.4 Les glycoprotéines virales

Quelques protéines virales de l'enveloppe peuvent être reconnues par le TLR4 ou le TLR2. Leur détection mène généralement à la production de cytokines inflammatoires mais pas à la sécrétion d'IFN de type I, impliquant que cette réponse mène à l'inflammation plutôt qu'à une réponse antivirale spécifique. Pour l'instant, la protéine de fusion (F) du virus respiratoire syncytial (VRS) a été identifiée comme étant capable d'activer le TLR4 (467). L'importance de l'activation du TLR4 pendant les infections VRS a été démontrée grâce à l'utilisation de souris déficientes pour le TLR4, lesquelles exhibaient de faibles niveaux d'infiltration de cellules mononucléées, résultant en une difficulté à éliminer le virus.

Le TLR2 est aussi activé par des composés viraux comme les protéines hémagglutinine du virus de la rougeole, du cytomégalovirus et du virus de l'herpès simplex 1 (468, 469).

2.5 Les différentes voies de signalisation

La signalisation induite suite à l'engagement des TLR peut mener à l'activation de plusieurs facteurs de transcription, incluant NF- κ B et les IRF (de l'anglais *IFN Regulatory Factor*) (figure 11). Subséquemment, plusieurs gènes impliqués dans la réponse immune sont induits. Chaque TLR active une voie similaire mais certains d'entre eux ont leur voie spécifique. Cette induction différentielle dépend surtout des molécules adaptatrices cytoplasmiques qui peuvent s'associer avec la région intracytoplasmique des TLR (394).

2.5.1 Les voies MyD88-dépendantes

2.5.1.1 L'activation de NF- κ B, p38 et JNK via la voie MyD88-dépendante

La signalisation des TLR mène à l'activation de NF- κ B, p38 et JNK. Tous les TLR, sauf le TLR3, recrutent MyD88. À son tour, MyD88 recrute IRAK-4 et IRAK-1 dans le complexe. IRAK-4 est la kinase sérine/thréonine cruciale du complexe. Elle phosphoryle IRAK-1, qui subséquemment s'autophosphoryle afin de devenir pleinement activée (470) et être ultérieurement dégradée par le protéasome (471). À part IRAK-1 et IRAK-4, deux autres membres ont été identifiés à savoir IRAK-2 et IRAK-M (472, 473). Toutefois, ces deux kinases sont inactives. Les IRAK lient le complexe à TRAF6, laquelle interagit avec Uev1A et Ubc13 (*Ubiquitin-conjugating enzymes*) et devient alors polyubiquitinylée et activée à son tour (474, 475). Par la suite, TRAF6 interagit avec TAK1 (de l'anglais *TGF- β -Activated Kinase 1*) et les protéines liant TAK1, TAB1, TAB2 et TAB3 (de l'anglais *TAK1-Binding Proteins*) (476). TAK1 phosphoryle ensuite le complexe NEMO/IKK α /IKK β . L'activation du complexe IKK requiert également la polyubiquitinylation de NEMO (de l'anglais *NF- κ B Essential Modulator*) par TRAF6/Uev1A/Ubc13. À leur tour, les IKK phosphorylent I κ B, lequel est pré-associé à NF- κ B constitué des sous-unités p50 et p65. Cette phosphorylation mène à la dégradation par le protéasome de I κ B, ce qui permet la translocation dans le noyau de NF- κ B et la liaison des gènes contenant ce motif de liaison, permettant leur transcription et leur expression (477-480). De cette manière, les cytokines inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6 sont produites. TAK1 est aussi liée à l'activation des MAPK kinase (MAPKK) 6 (ou MKK6) et d'autres MAPKK telles que MKK3 et MKK7. La phosphorylation de MKK6 mène à l'activation de JNK alors que MKK3 et MKK7 sont responsables de l'activation de p38. À leur tour, elles activent le facteur de transcription AP-1 qui, comme NF- κ B, mène à la production de cytokines inflammatoires.

Dans le cas de la signalisation du TLR4, MyD88 n'est pas capable de s'associer directement avec le récepteur. En fait, elle requiert l'aide de Mal, qui agit comme un adaptateur, amenant MyD88 à la membrane et permettant ainsi la signalisation. Le TLR4 utilise les quatre molécules adaptatrices. À part MyD88 et Mal, il peut s'associer avec TRIF et TRAM. TRAM est un adaptateur qui permet l'association de TRIF avec le récepteur. Le TLR4 peut aussi activer le complexe IKK via l'interaction de TRIF avec RIP1. Les mêmes protéines sont utilisées par le TLR3 pour activer NF- κ B. Cependant, le TLR3 utilise seulement TRIF parmi les quatre molécules adaptatrices.

2.5.1.2 L'activation des IRF par la voie MyD88-dépendante

Une autre découverte récente est le fait que la voie de signalisation MyD88-dépendante peut également activer les IRF. Un d'entre eux est IRF7, lequel participe à la signalisation engendrée par la stimulation des TLR7 et TLR9. L'activation de IRF7 a lieu exclusivement dans les CDp et non dans les CD conventionnelles. MyD88, IRAK-1, IRAK-4 et TRAF6 sont directement associés avec IRF7 (6, 481-484). Par conséquent, IRF7 est transloqué dans le noyau où il lie les motifs ISRE (de l'anglais *IFN-Stimulated Response Element*), menant à la sécrétion d'IFN de type I. La présence d'IRAK-1 dans cette voie de signalisation est essentielle, comme il a été démontré par l'utilisation de souris déficientes pour cette kinase, lesquelles ne peuvent produire l'IFN α suite à la stimulation des TLR 7 et 9 (484). En fait, IRAK-1 doit phosphoryler IRF7 pour induire son activation. Dans la signalisation par le TLR9, MyD88 doit être associée à celui-ci via son domaine TIR afin de permettre l'activation de IRF7 (482).

Un autre facteur de transcription de la même famille qui est également activé par la voie MyD88 est IRF5. Dans la signalisation des TLR4 et TLR9, IRF5 complexe à la fois avec MyD88 et TRAF6 (485). Conséquemment, il est dirigé dans le noyau et lie les motifs ISRE dans les régions promotrices des gènes de cytokines inflammatoires et induit la production d'IL-6, d'IL-12 et de TNF α .

Finalement, dans les CDM, MyD88 s'associe avec IRF1 (486). Suivant cette interaction, IRF1 est transloqué dans le noyau et active différents gènes dépendants de l'activation des TLR.

2.5.1.3 Mal-une molécule adaptatrice de la signalisation MyD88-dépendante

MyD88 n'est pas la seule protéine adaptatrice requise pour la signalisation des TLR. Cette notion est apparue évidente lorsque chez des souris déficientes pour MyD88, l'activation de NF- κ B et des MAPK était absente en réponse aux ligands des TLR5, 7, 8 et 9. La réponse du TLR4 étant seulement retardée. Éventuellement, quatre molécules adaptatrices homologues à MyD88 ont été identifiées et ont permis d'expliquer ce phénomène.

La première découverte est Mal/TIRAP (487, 488). Cette protéine est en fait un membre important de la signalisation MyD88-dépendante des TLR2 et 4. Contrairement à MyD88, Mal possède un domaine de liaison pour un composé de la membrane plasmique, le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) (489, 490). C'est via ce domaine que Mal interagit avec PIP2, ce qui facilite le recrutement de MyD88 à la membrane. De cette façon, Mal et MyD88 sont près du TLR4 et peuvent s'associer avec lui. Mal peut également s'associer avec TRAF6, devenant ainsi responsable du recrutement de cette protéine dans la signalisation via les TLR2 et TLR4 (491). Finalement, Mal peut interagir avec la tyrosine kinase de Bruton (Btk). Cette kinase phosphoryle Mal et rend possible la signalisation (492). Btk participe à la signalisation des TLR2 et 4 en étant impliquée dans la phosphorylation de NF- κ B sur la sous-unité p65 (493-495). La découverte de Mal fut la première preuve que les différents TLR recrutent différentes molécules adaptatrices.

2.5.2 Les voies MyD88-indépendantes

2.5.2.1 La voie TRIF-dépendante

L'adaptateur essentiel dans la voie MyD88-indépendante est TRIF (496, 497). Les souris déficientes pour TRIF ont permis d'identifier clairement les fonctions de cet adaptateur. La production de cytokines inflammatoires était absente lors de la signalisation par le TLR4, mais n'était pas affectée suivant la stimulation des TLR2, 7 et 9. L'activation de IRF3 et la sécrétion subséquente d'IFN β étaient également absentes dans la signalisation via les TLR3 et 4 (498). Ainsi, TRIF était l'adaptateur manquant pour la signalisation des TLR3 et 4.

Afin de permettre la signalisation via ces TLR, TRIF forme des complexes avec TBK1 (de l'anglais *TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-Binding kinase 1*) (499), IKK ϵ et IRF3. Ces interactions résultent en la phosphorylation de IRF3 par TBK1 et IKK ϵ , permettant son activation. Conséquemment, IRF3 peut se lier aux ISRE des gènes cibles et induire la production d'IFN α/β (500), il en va de même pour IRF7 (483, 484). IRF5 est également activée via TRIF suite à la stimulation du TLR3 induisant la production de cytokines inflammatoires (485).

2.5.2.2 TRAM-une molécule adaptatrice de la voie TRIF-dépendante

Alors que le TLR3 peut s'associer directement avec TRIF, le TLR4 requiert la présence de TRAM afin d'engager TRIF (499, 501, 502). TRAM est donc une autre molécule adaptatrice, comme Mal, et elle est différente des autres du fait qu'elle est exclusive à la signalisation via le TLR4. Comme c'est le cas pour Mal, TRAM s'associe également à la membrane plasmique. Cependant, contrairement à Mal, cette interaction dépend de la myristoylation de son extrémité N-terminale. De plus, son activation est dépendante de sa phosphorylation par la protéine kinase C ϵ .

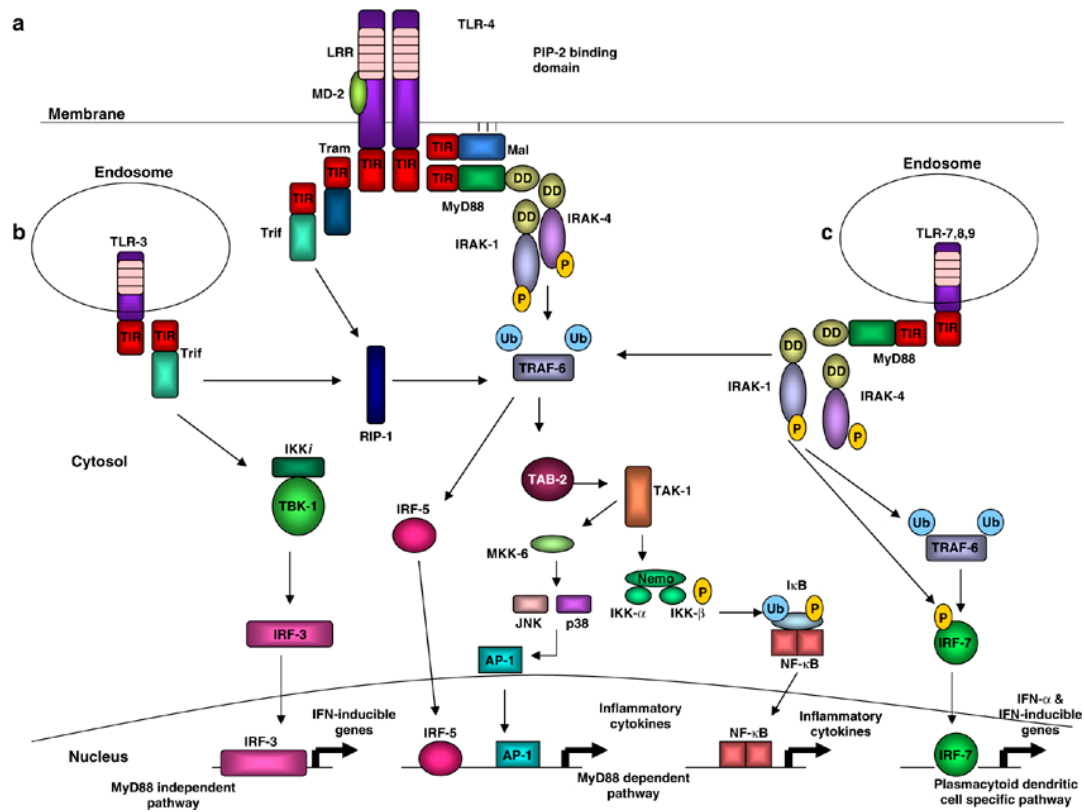


Figure 11. Principales voies de signalisation des TLR (394)

2.6 Les TLR et le VIH-1

Bien que le VIH-1 puisse activer les TLR3, 7 et 8, la majorité des études menées jusqu'à maintenant ont plutôt étudié l'impact d'une stimulation des TLR sur l'infection par le VIH-1. À ce jour, plusieurs types cellulaires ont été étudiés comme les macrophages, les lymphocytes et les CD. Cette section résume les principales études qui ont été faites jusqu'à maintenant.

Les TLR les plus étudiés chez les lymphocytes T CD4⁺ sont les TLR2, 4, 5, 7 et 8. Malgré l'expression du TLR4, aucune équipe n'est parvenue jusqu'à présent à détecter des effets significatifs suite à la stimulation de celui-ci. Les chercheurs en sont venus à la conclusion

que l'absence de réponse devait être due au fait que certaines molécules accessoires, comme le CD14, sont absentes. Pour ce qui est des TLR2, 5, 7 et 8, toutes les études ont démontré que la stimulation de ces TLR menait à l'activation des cellules soit en mesurant leur capacité de prolifération, l'apparition de certains marqueurs d'activation ou leur sécrétion de cytokines (IL-2, IL-8, IFN γ). En effet, dans le cas d'une stimulation via les TLR2 et TLR5, il a été remarqué que les lymphocytes T CD4⁺ sécrétaient de l'IFN γ , de l'IL-2 et de l'IL-8. De plus, la flagelline et le Pam₃Csk₄ (ligand synthétique du TLR2) ont tous deux induit la prolifération des cellules T CD4⁺.

Les études menées sur les différentes sous-populations des lymphocytes T CD4⁺ ont également permis de constater que les effets de la stimulation des TLR sont toujours plus prononcés chez les cellules mémoires (CD45RO) que chez les cellules naïves (CD45RA) (397). Ces résultats peuvent être attribués au fait que les cellules mémoires, lesquelles ont déjà rencontré leur antigène, nécessitent une stimulation moins stringente que les cellules naïves pour mener à leur activation (503). De plus, en séparant à nouveau les cellules mémoires T_{mc} et T_{me}, les auteurs ont découvert que les T_{me} avaient également une meilleure capacité à répondre aux stimuli.

Suite à ces observations, il est possible de spéculer que les cellules T CD4⁺ ayant rencontré l'antigène, lesquelles entrent dans les tissus périphériques pour médier la réaction inflammatoire, pourraient être efficacement stimulées par les PAMP et contribuer à contenir les pathogènes invasifs via la sécrétion de cytokines telles que l'IL-8 et l'IFN γ . Sachant que ces cytokines favorisent respectivement le recrutement des phagocytes et leur activation, une telle sécrétion est bénéfique pour l'hôte. Finalement, l'observation qu'à la fois les T_{mc} et les T_{me} répondent à la stimulation des agonistes des TLR suggère que la stimulation de ceux-ci pourrait contribuer au maintien d'un répertoire polyclonal de cellules T mémoires. Bien qu'il a récemment été rapporté que le TLR2 pourrait être unique en son habileté à stimuler les fonctions des lymphocytes T CD4⁺, certaines études ont aussi

démontré que les TLR5, 7 et 8 pouvaient produire les mêmes effets, bien que parfois à moindre échelle.

Plus spécifiquement, les études basées sur la stimulation des TLR7 et 8 ont permis de mettre en évidence le fait que la présence de leurs ligands dans le milieu de culture, avant, pendant ou après l'infection par le VIH-1, réduisait l'infection. Sachant que la stimulation de ces TLR peut mener à la fois à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires via l'activation de NF- κ B, ce qui favorise la transcription du VIH-1, et à la synthèse d'IFN de type I, lesquels ont un effet antiviral, les auteurs ont d'abord tenté de bloquer l'action des cytokines et chimiokines produites. Aucune de ces tentatives n'a permis d'identifier la cytokine responsable de cette diminution de l'infection. Conséquemment, chaque type cellulaire (lymphocytes T, B, CD, monocytes) a été déplété et les auteurs ont démontré que l'effet en question provenait de l'action des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK suite à leur activation préalable par les CD (504, 505). Malheureusement, aucune identité n'a été révélée concernant le ou les facteurs impliqués. Étrangement, la même stimulation des TLR7 et 8 permet de réactiver des virus latents au sein de lignées cellulaires. Ces différentes actions pourraient jouer un rôle critique pendant les infections aiguë et chronique du VIH-1.

Pendant l'infection aiguë, l'état antiviral induit suite à la stimulation des TLR 7 et 8 peut restreindre la surinfection jusqu'à l'apparition de la réponse immune acquise. Pendant l'infection chronique, l'effet anti-VIH peut encore permettre de réduire la réplication, alors que les effets pro-VIH garantissent un certain niveau de réplication qui ne détruit pas l'hôte trop rapidement. Ainsi, le VIH-1 est capable d'utiliser à bon escient la stimulation des TLR 7 et 8. Les effets dichotomiques de ces stimulations pourraient avoir des répercussions thérapeutiques. Il serait possible de purger les cellules infectées de manière latente tout en prévenant les nouvelles infections (506).

Finalement, l'étude la plus récente a été menée à la fois sur des lymphocytes T CD4+ et CD8+ en stimulant les TLR2, 3, 4, 5, 7, 8 et 9. Cette étude a permis de mettre en évidence que les lymphocytes T CD8+ étaient également activés suite à ces stimulations, tout comme les lymphocytes T CD4+. Les chercheurs ont également montré que suite à ces stimulations, les cellules T CD4+ entraient dans le cycle cellulaire et progressaient plus rapidement vers l'apoptose. Cette étude amène des spécifications sur le fait que les produits bactériens présents dans la circulation sanguine, suite à la translocation microbienne, mène à l'hyperactivation des cellules T et leur mort cellulaire, le tout durant la phase chronique de l'infection par le VIH (507).

En résumé, il est clair que la stimulation des TLR engendre généralement l'activation des différents types cellulaires. Selon les cellules affectées, les effets peuvent être positifs (sécrétion d'IFN de type I par les CD) ou négatifs (activation des lymphocytes T pouvant favoriser la réplication virale). C'est donc suite à ces quelques études que nous avons décidé d'approfondir les multiples effets de la stimulation des TLR sur l'infection par le VIH-1.

Chapitre III. Hypothèse et objectifs de recherche

3.1 Hypothèse de recherche

Il a récemment été démontré que le phénomène de translocation microbienne pouvait en partie expliquer l'hyperactivation du système immunitaire observé chez les patients atteints par le VIH-1. Ce phénomène est caractérisé par une perte d'intégrité de la muqueuse intestinale et se traduit par la présence de produits bactériens dans la circulation sanguine. Ces données ont permis de mettre en avant plan une classe de récepteurs, dont le but premier est de détecter ces pathogènes, les TLR. Ainsi, nous savions que les TLR étaient largement exprimés par les cellules du système immunitaire, et qu'ils pouvaient certainement fournir des réponses en ce qui a trait à la progression du VIH-1. En se basant sur ces données, nous avons formulé les hypothèses suivantes :

Est-ce que la stimulation des différents TLR peut moduler certaines étapes du cycle de réplication du VIH-1 ? Si oui, quelles sont ces étapes et est-ce qu'elles seront les mêmes chez différents types cellulaires ?

3.2 Objectifs de recherche

La compréhension et la caractérisation du ou des mécanismes responsables d'une possible modulation de l'infection suite à la stimulation des TLR constitue l'objectif principal de ce projet. Trois objectifs spécifiques ont été établis afin d'atteindre le but fixé :

Objectif 1 : Identifier si la stimulation du TLR2, exprimé par les lymphocytes T CD4+ naïfs et mémoires, change l'état d'activation de ces cellules et module l'infection par le VIH-1.

Objectif 2 : Vérifier si la stimulation des TLR 2, 4, 5, 7 et 9 module l'infection par le VIH-1 des CD immatures et son transfert aux lymphocytes T CD4+ autologues.

Objectif 3 : Vérifier si la stimulation des TLR 2 et 5 est suffisante pour réactiver les virus latents des cellules Jurkat-lat et si oui, est-ce que cette stimulation peut également réactiver les virus contenus dans les cellules de patients atteints du VIH-1.

3.3 Aperçu des résultats et contributions scientifiques

Les premiers résultats obtenus nous ont permis de conclure que la stimulation du TLR2 exprimé par les lymphocytes T CD4+ naïfs et mémoires était suffisante pour entraîner leur activation. Suite à la stimulation de ce TLR, nous avons observé la formation d'agrégats (signe d'activation des cellules) ainsi que l'apparition des marqueurs d'activation CD25, CD69, HLA-DR et ICAM-1. De plus, nous avons également noté l'apparition de l'expression du corécepteur CCR5, un autre signe de l'activation cellulaire. Concernant l'infection par le VIH-1, nous avons montré que la stimulation du TLR2 rendait les cellules T CD4+ naïves et mémoires plus permissives à l'infection, à la fois par des virus de tropisme X4 et R5. L'article décrivant ces résultats s'inscrit au chapitre IV de la thèse.

En deuxième lieu, nous avons voulu déterminer si la stimulation d'autres TLR exprimés cette fois par les cellules dendritiques immatures, pouvait également moduler l'infection par le VIH-1. Nos résultats nous ont permis de montrer que seule la stimulation du TLR2 menait à une infection accrue des CD, alors que la stimulation du TLR4 la réduisait. Nous avons observé les mêmes effets lors du transfert précoce du VIH-1 aux lymphocytes T CD4+ autologues. De plus, nous avons montré que la stimulation du TLR2 devait obligatoirement avoir lieu avant l'infection pour permettre une augmentation, puisque diverses expériences où celle-ci a eu lieu après n'ont donné aucune différence. Finalement, nous avons montré que la diminution observée suite à la stimulation du TLR4 était due à la

sécrétion d'IFN de type I et que le fait de bloquer ceux-ci restaurait complètement l'effet. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article au chapitre V de la thèse.

En troisième et dernière partie, nous nous sommes attardés au phénomène de latence et avons mesuré l'impact de la stimulation des TLR2 et 5 sur la réactivation des virus latents. Nos résultats ont d'abord permis de conclure que seul le TLR5 était exprimé par la lignée cellulaire utilisée, les Jurkat-lat, bien que celles-ci soient issues d'une lignée lymphocytaire. Ainsi, nous avons démontré que la stimulation du TLR5 était suffisante pour permettre la réactivation des virus latents contenus dans les Jurkat-lat. Malheureusement, lors de l'utilisation de cellules de patients atteints du VIH-1, nous n'avons pas corroboré ces résultats. Le chapitre VI de cette thèse présente les résultats de cet article.

Chapitre IV. La signalisation engendrée par la stimulation du TLR2 rend les cellules T CD4+ quiescentes, naïves et mémoires, susceptibles à l'infection par le VIH-1 de type X4 ou R5.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *The Journal of Immunology* (2007, Oct 1 ;179(7) :4357-66) et est constitué de la version finale telle que publiée.

4.1 Résumé

Récemment, il a été démontré que les produits bactériens présents dans la circulation sanguine étaient responsables de l'activation systémique du système immunitaire chez les individus infectés par le VIH-1. Les produits bactériens expriment des motifs conservés qui sont reconnus par les récepteurs Toll-like. Certains de ces récepteurs sont exprimés chez les lymphocytes T CD4+ humains mais leur rôle précis demeure méconnu. Nous rapportons ici que l'engagement du TLR2 exprimé par les lymphocytes T CD4+ naïfs et mémoires mène à un phénotype de type effecteur. De manière intéressante, l'engagement de ce TLR rend les cellules naïves et mémoires plus susceptibles à l'infection par les virus de tropisme X4 et R5. Ainsi, il peut être proposé que l'exposition des cellules T CD4+ quiescentes aux produits dérivés de pathogènes qui peuvent lier le TLR2 mène à l'acquisition d'un phénotype de type effecteur, un phénomène qui peut favoriser la réplication virale, la dissémination ainsi que l'activation du système immunitaire et la progression de la maladie vers le stade SIDA.

4.2 Article

TLR2 Signaling Renders Quiescent Naïve and Memory CD4⁺ T Cells More Susceptible to Productive Infection with X4 and R5 HIV-1

Sandra Thibault, Mélanie R. Tardif, Corinne Barat, and Michel J. Tremblay*

*Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval,
and Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada, G1V 4G2*

Running title: TLR2 triggering modulates HIV infection in CD4⁺ T cells

Keywords: HIV-1, T Cells, TLR, Cell Activation

*Corresponding author

Abstract

It has been recently demonstrated that circulating microbial products are responsible for a systemic immune activation in individuals infected with HIV-1. Bacterial products carry structural conserved motifs recognized by Toll-like receptors (TLRs). Some TLR members are expressed in primary human CD4⁺ T cells but the precise functional role played by these pattern recognition receptors is still imprecise. We report here that engagement of TLR2 in quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells leads to the acquisition of an effector-like phenotype. Interestingly, engagement of TLR2 renders both cell subsets more susceptible to productive infection with X4 virions and a higher virus production was seen with R5 viruses. It can be proposed that exposure of resting CD4⁺ T cells to pathogen-derived products that can engage TLR2 induces the acquisition of an effector-like phenotype in naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes, a phenomenon that might result to an acceleration of virus replication, immune dysregulation and HIV-1-mediated disease progression.

Introduction

Replication of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) relies heavily on the activation state of target cells. Hence, productive HIV-1 infection will ensue in cell subtypes containing the appropriate cellular factors such as it is the case in effector CD4⁺ T lymphocytes. It is now well established that these cells are massively depleted at the mucosal interface (i.e. gut and genital tracts) during the acute infection (1, 2). Their high permissiveness for HIV-1 infection is linked to expression of both CXCR4 and CCR5, which act as co-receptors for HIV-1, as well as to the presence of cellular factors required for an active virus production. It is known that resting CD4⁺ T cells display a weak permissiveness to a productive HIV-1 infection due to the absence of these cellular factors and, when these cells are infected, the virus remains in a latent form and such cells are now considered as a stable reservoir for the virus (3).

CD4⁺ T lymphocytes constitute a heterogeneous population that can be subdivided into various subsets including naïve, short-lived effector, long-lived central memory and effector memory cells. Naïve cells have never encountered the antigen, are in a resting state and express the CD45RA isoform and two markers essential for homing to secondary lymphoid tissues (e.g. lymph nodes, spleen and tonsils), i.e. CD62L and CCR7 (4, 5). These cells circulate in lymphoid tissues through blood and lymph until they encounter their nominal antigen presented by an antigen-presenting cell (6, 7). Depending on the duration and strength of the signal received as well as on the type of cytokines present in

the microenvironment, naïve cells will differentiate into short-lived effector or long-lived central memory cells, which have distinct roles in immunity. The effector cells migrate to inflamed non-lymphoid tissues to help innate immune cells to kill invaders and then they die. In contrast, central memory cells, which express the CD45RO isoform, CD62L and CCR7, recirculate as naïve cells among secondary lymphoid tissues through blood and lymph until they reencounter their nominal antigen. These cells are called “memory cells” because they are able to recognize previous antigens and rapidly orchestrate an efficient immune response. Once activated, they become effector memory cells and will eventually lose CD62L and CCR7, express CD69 and CD25, two markers of cell activation, and acquire chemokine receptors (i.e. CCR5 and CCR3), which are essential for reaching inflamed non-lymphoid tissues (8-11). After accomplishing their effector functions, some effector memory cells will persist in non-lymphoid tissues and provide the long-term immunological memory required for controlling and fighting the invaders at the tissue-external environment interface.

A rapid and progressive depletion of effector memory CD4⁺ T cells is seen in HIV-1-infected individuals that results in an increased susceptibility to opportunistic and community-acquired infections and enhanced microbial translocation to the normally sterile internal environment (12). These features contribute to the establishment of an immune hyperactivation state and T-cell turnover in chronically-infected individuals, setting up ideal conditions for further viral replication and cellular destruction. When the number of

CD4⁺ T cells decreases below 200/mm³, commensal and normally well-controlled microorganisms present in the human flora become pathogenic (13, 14). Indeed, it is known that individuals carrying HIV-1 fail to control and eliminate opportunistic microorganisms and these infections often become invasive and mortal. This particular feature of HIV-1 infection is mostly caused by destruction of effector memory CD4⁺ T cells and the inability of the infected host to regenerate the pool of competent effector CD4⁺ T lymphocytes.

The immune system senses an invasion with microbes via receptors recognizing microbial components known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (15). These receptors are identified as pathogens recognition receptors (16). Among these, toll-like receptors (TLRs) are mostly expressed on innate immune cells such as macrophages, dendritic cells (DCs), B lymphocytes and natural killer cells (17, 18). TLRs are transmembrane glycoproteins characterized by an extracellular domain bearing various leucine-rich-repeat motifs and a cytoplasmic signalling domain called the Toll/IL-1R homology domain (19). To date 11 TLRs have been identified in humans (20). These receptors can be classified according to which PAMPs they recognize: TLR-1, 2 and 6 detect lipids, whereas TLR-3, 7, 8 and 9 recognize nucleic acids. TLR4, either associated or not with CD14, identifies various ligands such as lipopolysaccharides (LPS), heat shock proteins and fibronectin, whereas TLR-5 binds flagellin (21). These bacterial components are liberated from live bacteria or released upon bacterial lysis (caused by complement, antibiotics or soluble factors such as lysozyme and beta-defensins). Gram-negative bacteria

are mostly identified by TLR4 through LPS binding (22, 23) while TLR2 rather recognizes diverse bacterial cell-wall components such as peptidoglycan (24), lipoteichoic acid (25), lipoarabinomannan (26), lipoproteins (27) and porins (28, 29). It has been recently showed that mRNAs encoding for TLR-1, 2, 3, 4, 5, 7 and 9 are present in CD4⁺ T lymphocytes (30, 31). Further studies have revealed that central memory CD4⁺ T cells express higher levels of TLR2, 4, 5 and 7 than naïve ones. Moreover, exposure of these T cell subsets to TLR2, 5, or 7 ligand triggers a signalling cascade resulting in IFN- γ production (30, 31). These data suggest that some TLR ligands can activate resting T cells. Accordingly, we hypothesized that exposure of quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells to bacterial TLR ligands might modulate susceptibility to HIV-1 infection. We report here that TLR2 triggering increases replication of X4-tropic HIV-1 in naïve and memory CD4⁺ T cells and renders these cells susceptible to productive infection with R5-dependent viruses.

Materials and Methods

Antibodies and reagents

The hybridoma cell line OKT3, which produces the anti-CD3 ζ monoclonal antibody, and the hybridoma cell line 2.06, which secretes a monoclonal antibody directed against a monomorphic epitope of the HLA-DR determinant of MHC-II, were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, MD). The anti-ICAM-1 hybridoma R6.5 was provided by S. Benedict (University of Kansas, Lawrence, KS). A purified anti-CD28 antibody (clone 9.3) was kindly provided by J. A. Ledbetter (Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Princeton). PE-conjugated anti-CCR5, anti-CD45RA (clone 5H9), anti-CD45RO (clone UCHL1) and FITC-conjugated anti-CD69 were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). The hybridoma cell line 7G7/B6, which produces an anti-CD25 monoclonal antibody, was kindly provided by J. Bernier (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC). Hybridomas producing 183-H12-5C and 31-90-25, two antibodies recognizing different epitopes of the HIV-1 major viral core protein p24^{gag}, were supplied by the AIDS Repository Reagent Program (Germantown, MD) and ATCC, respectively. Antibodies obtained from these cells were purified using mAbTrap protein G affinity columns according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Ultra-purified LPS and the TLR2 agonist Pam₃Csk₄ were purchased from InvivoGen (San Diego, CA).

Cells

293T cells were provided by W. C. Greene (The J. Gladstone Institutes, San Francisco, CA, USA) and TZM-bl indicator cells were obtained from the AIDS Repository Reagent Program. These cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS). To obtain the studied primary CD4⁺ T cell subsets, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. Thereafter, CD4⁺ T cells were purified from freshly isolated PBMCs by immunomagnetic negative selection as indicated by the manufacturer (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC). Bulk CD4⁺ T cells were separated into pure naïve (CD45RA-expressing) and memory (CD45RO-expressing) subpopulation by negative selection as described by the manufacturer (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA). The purity of isolated CD4⁺ T cell subsets was determined by cytofluorometry and was always greater than 98%. Lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS with or without recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) (30 U/ml) as indicated.

Plasmids and production of viral stocks

pNL4-3 (32) and pNL4-3Balenv (33) are full-length infectious molecular clones of HIV-1. In pNL4-3Balenv, the *env* gene of the X4 (T)-tropic NL4-3 strain has been replaced with that of the R5 (macrophage)-tropic Bal strain. Viruses were produced by the calcium phosphate coprecipitation method in 293T cells as described previously (34). Virus preparations were normalized for virion content using an in-house enzymatic assay specific

for the major viral p24^{gag} protein. In this test, 183-H12-5C and 31-90-25 antibodies are used in combination to quantify p24^{gag} levels (35).

Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis

To monitor cell surface expression of CCR5, CD25, CD69, ICAM-1 and HLA-DR on naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes, samples from two different healthy donors were incubated with anti-CCR5-PE, anti-CD25, anti-CD69-FITC, anti-ICAM-1, anti-HLA-DR or an appropriate isotype-matched irrelevant control antibody for 30 min at 4°C. Cells were next washed with phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated when appropriate with an R-PE-conjugated goat anti-mouse IgG for 30 min at 4°C. After two washes with PBS, cells were fixed in 2 % paraformaldehyde and analyzed by FACS (Epics ELITE ESP, Coulter Electronics, Burlington, ON).

Stimulation and virus infection assays

Primary naïve and memory CD4⁺ T cells (1×10^5) were seeded in 96-well flat-bottom tissue culture plates and either left untreated or treated with the following reagents. Briefly, purified CD4⁺ T lymphocyte subsets were subjected to a treatment with cross-linked OKT3 (i.e. OKT3 at 1 µg/ml and goat anti-mouse/GAM at 5 µg/ml) or Pam₃Csk₄ (5 µg/ml), an agonist of TLR2. Cells stimulated with the mitogenic agent PHA-L used in combination with rhIL-2 were used as a positive control. After 24 or 72 h of stimulation, photographs of cell cultures were taken to estimate cell aggregates. For virus infections studies, the purified cell subsets were either left untreated or treated with the tested stimuli for 24 or 72 h and

washed before infection with NL4-3 or NL4-3Balenv (10 ng of p24^{gag} per 1×10^5) for 24 h. Next, cells were washed again to eliminate uninternalized viruses. Supernatants were harvested at 3 days post-infection. Virus replication was estimated by incubating cell-free supernatants with TZM-bl, an indicator cell line derived from HeLa cells that carries a stably integrated luciferase reporter gene placed under the control of the HIV-1 regulatory element (i.e. LTR) (36). This experimental strategy allows rapidly assessing the amount of infectious virus particles contained in the supernatant from infected cells, in contrast to the measurement of the extracellular p24^{gag} content which does not discriminate between infectious and non-infectious viruses.

Nuclear extracts and electromobility shift assay (EMSA)

Primary naïve and memory CD4⁺ T cells (5×10^6) were either left untreated (mock) or treated for 24 h at 37°C with Pam₃Csk₄ (5 µg/ml) in a final volume of 2.5 ml of RPMI. As a positive control, we used CD4⁺ T cells (5×10^6) that were activated for 3 days with PHA-L (1 µg/ml) in the presence of rhIL-2 (30 U/ml) and stimulated for 4 h with OKT3 (1 µg/ml) and anti-CD28 (1 µg/ml) in a final volume of 2.5 ml of RPMI. Cells were then washed twice with ice-cold PBS, and nuclear extracts were prepared according to a previously reported protocol (37). EMSAs were performed by incubating 10 µg of nuclear proteins with 20 µl of 1 X 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 µg of poly(dI-dC), 10 µg of nuclease-free bovine serum albumin fraction V and 0.8 ng of a γ -³²P-labelled double-stranded DNA oligonucleotide for 20 min at room temperature. The consensus NF-

κ B-binding site (5'-ATGTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') and the consensus binding site for Oct-2A (5'-GGAGTATCCAGCTCCGTAGCATGCAAATCCTCTGG-3') (used as control for non-specific competition) were used as probes and/or in competition assays. The DNA-protein complexes were resolved from free-labelled DNA by electrophoresis in native 4% (wt/vol) polyacrylamide gels in 0.5X TBE buffer. The gels were subsequently dried and exposed to Kodak X-ray film. Cold competition assays were carried out by adding a 100-fold molar excess of an unlabeled double-stranded DNA oligonucleotide simultaneously with the labelled probe.

Bio-Plex cytokine assay

A commercial Bio-Plex cytokine test that can detect and quantify 10 different cytokines (i.e. IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, TNF α and IFN γ) through the use of the Luminex® 100™ apparatus (Luminex Corporation, Austin, TX) was purchased from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON). The Luminex technology is a bead array cytometric analyzer designed to study numerous analytes simultaneously by using spectrally distinct beads in a single well of a microtiter plate, using very small sample volumes (i.e. as little as 25 μ l). Briefly, purified naïve and memory CD4⁺ T cells were either left untreated (i.e. mock) or treated for 24 h at 37°C with the following stimuli: the TLR2 ligand Pam₃Csk₄ (5 μ g/ml), the TLR4 ligand LPS (0.1 μ g/ml), or cross-linked OKT3 (1 μ g/ml). Quantification was achieved by measuring concentrations of the studied cytokines in cell-free supernatants according to the manufacturer's instructions. The lowest detection limits for the tested cytokines are: 4.38 pg/ml for IL-1 β , 1.6 pg/ml for IL-2, 0.33

pg/ml for IL-4, 2.27 pg/ml for IL-6, 4.82 pg/ml for IL-7, 2.12 pg/ml for IL-8, 3.35 pg/ml for IL-10, 2.08 pg/ml for IL-15, 2.25 pg/ml for TNF α and 3.72 pg/ml for IFN γ .

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out according to the methods outlined in Zar (38) and Sokal and Rohlf (39). Briefly, homoscedasticity was determined using the variance ratio test and the means were compared using a single factor ANOVA followed by appropriate *post hoc* multiple comparisons (Tukey's or Dunnett's). P values of less than 0.05 (*) were deemed statistically significant, whereas P values lower than 0.01 (**) were considered highly significant. Computations were carried out using GraphPad PRISM $\text{\textcircled{R}}$ version 3.03 statistical software.

Results

TLR2 signaling triggers cluster formation in naïve and memory CD4⁺ T cells

It is now well established that treatment of macrophages and DCs with some TLR ligands results in cell activation (40-42). As for naïve and memory CD4⁺ T cells, it is known that TLR2 stimulation triggers IFN- γ and IL-8 secretion (30), but the possible phenotypic changes occurring in such cells following TLR2 engagement remains largely unknown. To define whether TLR2 stimulation has an effect on the phenotype of naïve and memory CD4⁺ T cells, the TLR2 ligand Pam₃Csk₄ was used to treat the studied CD4⁺ T cell subsets. In brief, quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells were purified from PBMCs of different healthy donors and were exposed to the TLR2 agonist Pam₃Csk₄ for either 24 or 72 h. These stimulation time lengths were selected based on the idea that activation is a relatively fast event and several activation markers and phenotypic changes are observed within these time frames. Data depicted in Fig. 1 indicate that treatment of both naïve (panel A) and memory CD4⁺ T cells (panel B) with Pam₃Csk₄ induces the formation of small cellular aggregates after 24 h and clusters were larger and more numerous after 72 h of treatment. The TLR2-mediated cell clusters are much smaller and less compact than the ones obtained with PHA-L/rhIL-2, a combination of reagents that was used as a positive control. Engagement of the TCR/CD3 complex with the OKT3 monoclonal antibody was also very efficient at inducing cluster formation. Interestingly, no synergistic effect was observed when OKT3 was used in combination with the TLR2 agonist Pam₃Csk₄ (data not shown).

Taken together, these results suggest that TLR2 stimulation influences the activation status of both naïve and memory CD4⁺ T cells.

TLR2 engagement increases expression of activation markers on naïve and memory CD4⁺ T cells

It has been demonstrated that some cell surface molecules such as CD69, CD25, ICAM-1 and HLA-DR are up-regulated following T-cell activation and differentiation (43-46). Given that TLR2 engagement leads to homotypic aggregation of quiescent naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes, we next assessed if treatment with the TLR2 agonist Pam₃Csk₄ can increase expression of some specific cell surface markers. To this end, we performed immunostaining of CD69 and CD25, which are considered as two early-activation state markers, as well as of ICAM-1 and HLA-DR after exposure to the tested stimuli. As expected, treatment of purified CD4⁺ T cell subsets either with OKT3 or the PHA-L/rhIL-2 combination resulted in an increase in CD25, CD69, ICAM-1 and HLA-DR expression (table I). Of interest to note is that a more significant induction of most of the studied cell surface markers was seen with the TLR2 agonist Pam₃Csk₄ compared to treatment with OKT3. For example, CD69 was up-regulated by about 4- and 14-fold in naïve and memory CD4⁺ T cells, respectively. Comparable results were obtained when studying expression of the α subunit of the IL-2 receptor (i.e. CD25), which is augmented by about 3- and 9.2-fold in naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes, respectively. Surface expression of ICAM-1 was up-regulated by about 2.9- and 8.5-fold compared to an increase of about 4.8- and 13.2-fold for HLA-DR in naïve and memory CD4⁺ T cells, respectively. The percentage of cells expressing the studied activation markers was further enhanced

when the TLR2 agonist was used in combination with OKT3. All activation markers were more rapidly induced on the surface of memory than naïve CD4⁺ T cells by the TLR2 ligand since an increase is already seen after 24 h of treatment (data not shown). These data confirm that TLR2 engagement changes the activation status of quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells.

TLR2 engagement leads to NF-κB induction in naïve and memory CD4⁺ T cells

Activation of CD4⁺ T lymphocytes results in nuclear translocation of certain transcription factors like NF-κB, NFAT and AP-1, which regulate the expression of a broad range of genes involved in inflammation and immune response (47-49). Considering that ICAM-1 and HLA-DR are regulated by NF-κB (47, 50) and that TLR2 stimulation enhances expression of these cell surface markers in the studied cell subsets, we hypothesized that NF-κB might be induced following TLR2 engagement. Therefore, purified naïve and memory CD4⁺ T cells were treated with the TLR2 agonist Pam₃Csk₄ for 24 h and nuclear proteins were extracted and analyzed by EMSA. As illustrated in Fig. 2A, NF-κB was induced upon treatment of naïve and memory CD4⁺ T with Pam₃Csk₄. For example, fold increases over unstimulated cells are 1.7 and 3 for naïve and memory CD4⁺ T cells, respectively (Fig. 2B). Competition assays performed with cold specific or unrelated oligonucleotides confirmed the specificity of the retarded NF-κB specific complexes. Our results thus suggest that stimulation of TLR2 triggers a signalling cascade resulting in nuclear translocation of NF-κB in both naïve and memory CD4⁺ T cells.

Replication of X4 virions is increased in quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells treated with the TLR2 agonist

It is well known that HIV-1 replicates predominantly in effector CD4⁺ T cells (51). It is thought to be associated with the presence of cellular factors such as NF-κB, NFAT and AP-1, which are crucial for viral replication (47-49). Some of these transcription factors are also present in memory CD4⁺ T cells explaining why such cells are also permissive to HIV-1 replication, but to a lesser extent than effector CD4⁺ T lymphocytes. In contrast, these intracellular constituents are not present in the nucleus of naïve CD4⁺ T cells, which might be the cause of their very low natural susceptibility to productive HIV-1 infection. Based on our previous data, we tested whether treatment of quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells with the studied TLR2 ligand can modulate HIV-1 replication. In some samples, the TLR2 agonist Pam₃Csk₄ was also used in combination with OKT3 and all the tested stimuli were used in the absence or presence of rhIL-2 to define if this cytokine can modulate the response of the studied CD4⁺ T cell subsets to stimulation through TLR2. In this series of investigations, the TLR4 agonist LPS was used as a negative control because CD4⁺ T cells do not express the CD14 signalling co-receptor. Following an incubation period of 24 or 72 h with the tested stimuli, cells were infected with the prototypic X4-using NL4-3 strain of HIV-1 and virus production was estimated through the use of the TZM-bl cell line. It is important to highlight that TZM-bl cells do not express neither TLR2 nor CD14 (the latter cell surface constituent would allow signalling through TLR4) (data not shown). Results from Fig. 3A indicate that treatment of naïve CD4⁺ T cells with the TLR2 agonist

Pam₃Csk₄ before exposure to NL4-3 is sufficient to enhance virus production (i.e. 1.7-fold increase after 24 h of treatment). A more significant increase in virus production was seen when such cells were stimulated with the TLR2 ligand and OKT3 (i.e. 2-fold increase). Moreover, the TLR2-mediated HIV-1 production was markedly enhanced in the presence of rhIL-2 (i.e. a 27-fold increase in presence of rhIL-2). Similarly the TLR2- and TCR/CD3-mediated virus replication was also augmented upon addition of rhIL-2 (i.e. a 19-fold augmentation in presence of rhIL-2). A similar TLR2-mediated increase in HIV-1 production was seen when experiments were conducted in memory CD4⁺ T cells (Fig. 3B). Again, the noticed augmentation in virus production was more significant in presence of rhIL-2. In an attempt to demonstrate that the observed TLR2-mediated augmentation in luciferase activity seen in TZM-bl is not due to soluble factors produced by the stimulated CD4⁺ T cells, purified naïve and memory CD4⁺ T cells from two different healthy donors were either left untreated or treated for 24 h at 37°C with the following stimuli: cross-linked OKT3, the TLR2 ligand Pam₃Csk₄, or the TLR4 ligand LPS. Next, cell-free supernatants were harvested and added to TZM-bl indicator cells. In some samples, TZM-bl cells were incubated with complete culture medium only (i.e. CTRL) (used to estimate the basal level of luciferase activity). None of the tested cell-free supernatants was able to drive HIV-1 LTR-driven luciferase in TZM-bl indicator cells (data not shown), therefore indicating that the TLR2-dependent increase in HIV-1 LTR-driven reporter gene activity is really associated with an increase in HIV-1 production. Altogether, we provide evidence here that TLR2 engagement enhances replication of X4-tropic virus in both quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells.

Engagement of TLR2 increases CCR5 expression and renders cells more permissive to R5 virions

Upon cell activation, naïve and memory CD4⁺ T cells acquire an effector phenotype. The effector phenotype is characterized by expression of some specific cell surface molecules, including chemokine receptors like CCR5 and CCR3, the role of which is to allow migration of effector cells to inflamed non-lymphoid tissue (8, 10, 11). In order to investigate whether naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes become effector-like cells, we assessed CCR5 expression by flow cytometry. Data from table II indicate that expression of the chemokine receptor CCR5 is increased upon exposure of the studied cell subsets to the TLR2 agonist Pam₃Csk₄ and this augmentation is more important when the TLR2 ligand is used in conjunction with OKT3.

Our next studies were aimed at defining if the TLR2-mediated increase in CCR5 expression could translate in a higher permissiveness to R5 virions (i.e. NL4-3Balenv) given that untreated naïve and memory CD4⁺ T cells are not susceptible to a productive infection with NL4-3Balenv. Treatment of both cell subsets with Pam₃Csk₄ leads to a more important virus production with the tested strain of HIV-1 (Fig. 4). For example, a 1.4-fold increase in HIV-1 production was seen following treatment of naïve CD4⁺ T cells with the TLR2 ligand and a 2.7-fold enhancement in virus production was detected when Pam₃Csk₄ was also used in combination with OKT3. However, in the presence of rhIL-2, the augmentation reached 9.3- and 24-fold respectively with the TLR2 ligand and with both TLR2 and TCR/CD3 ligands. A more significant TLR2-mediated increase in HIV-1

production was seen in memory CD4⁺ T cells either in the absence or presence of exogenous rhIL-2. Taken together our findings demonstrate that quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells acquire an effector-like phenotype following TLR2 engagement, a process resulting in a more important replication of R5-using virions.

TLR2-mediated effect on HIV-1 replication is not due to contaminating cells in the purified CD4⁺ T cell preparations

Studies were next performed to address the possibility that stimulation of contaminating cells such as monocytes and DCs by the TLR2 ligand might have influenced HIV-1 expression and/or virus infection in the purified CD4⁺ T cell subpopulations. To this end, naïve and memory CD4⁺ T cells were either left untreated (i.e. mock) or treated for 24 h at 37°C with the following stimuli: the TLR2 ligand Pam₃Csk₄, the TLR4 ligand LPS (which will activate monocytes and DCs but not CD4⁺ T lymphocytes because these cells do not express CD14) (used as a control to estimate contaminating cells such as monocytes and DCs), and cross-linked OKT3 (which will lead to T-cell activation by engaging the TCR/CD3 complex) (used as a positive control). Next, cell-free supernatants were harvested and analyzed with a Bio-Plex assay to quantify the following cytokines: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, TNF α and IFN γ . As depicted in Fig. 5, ligation of TLR2 resulted in production of IL-8 from purified naïve and memory CD4⁺ T cells. Engagement of the TCR/CD3 complex with cross-linked OKT3 led to secretion of various cytokines such as IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, TNF α and IFN γ . Interestingly, treatment with LPS did not result in the production of cytokines such as IL-6, IL-10 and

TNF α that are known to be secreted by human monocytes and DCs following TLR4/CD14 ligation (52). Altogether these results suggest that our purified cell subpopulations are primarily constituted of CD4⁺ T lymphocytes and the observed TLR2-mediated effect on HIV-1 is not due to production of soluble factors by contaminating cells such as monocytes and DCs.

Discussion

Although many studies have reported the impact of TLR ligands on the activation of innate immune cells, the direct effects of microbial components that can bind to some TLRs in different T cell subsets is only beginning to be deciphered (53). Indeed, it has recently been reported that some bacterial cell wall constituents can provide a co-signal and act in concert with a TCR/CD3-mediated signal, a phenomenon resulting in cell proliferation and secretion of IFN- γ and IL-8 in both naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes (54). These two processes are intimately linked with the acquisition of an effector-like phenotype by these cells (30). Considering the important role of effector CD4⁺ T cells in the pathogenesis of HIV-1 infection, we investigated whether a TLR2 agonist (i.e. Pam₃Csk₄) can directly modulate the function of quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells and affect permissiveness to infection with X4 and R5 viruses.

We first assessed the ability of the TLR2 ligand Pam₃Csk₄ to induce activation of the studied resting CD4⁺ T cell subsets. We found that the tested TLR2 agonist triggers homotypic aggregation in both naïve and memory CD4⁺ T cells. The absence of aggregation in unstimulated cells proves the quiescent state of the purified naïve and memory CD4⁺ T cells. It has been established that aggregation occurs upon T cell activation and involves adhesion molecules like CD43 (55), CD44 (56, 57), intercellular adhesion molecules (ICAMs) (58-60) and the integrin leukocyte functional antigen-1 (LFA-1) (61). Activation and differentiation of CD4⁺ T cells are also characterized by an up-regulation of some activation markers such as CD69, CD25 and HLA-DR (43-46). We

demonstrate here for the first time that exposure of resting naïve and memory CD4⁺ T cells to the TLR2 agonist Pam₃Csk₄ is sufficient to increase expression of these cell surface markers on both cell subsets, but with a different time kinetics. For example, a portion of naïve and memory cells becomes positive for CD69, CD25 and HLA-DR after 72 h of TLR2 stimulation. However, memory cells express these activation markers already after 24 h of stimulation. Again, the absence of the activation markers CD25 and CD69 at the surface of unstimulated naïve and memory CD4⁺ T cells indicates that these cells were under a resting state. Cells stimulated with PHA-L/rhIL-2 and OKT3 were used as a positive control for activation. The low percentage of naïve and memory CD4⁺ T cells expressing activation markers following OKT3 stimulation can be explain by the absence of costimulation via CD28. These data are in agreement with the previous demonstration that memory cells require a less stringent signal to be activated than naïve cells, which are metabolically less active (62). The observed differences with respect to the responsive time could be linked to a greater expression of TLR2 in memory cells (63). We also measured LFA-1 expression and found that this cell surface constituent is not modulated by the studied TLR2 ligand. Since LFA-1 is mainly regulated by changes in its affinity and avidity states, our data are thus not surprising. Further studies are needed to clarify the impact of TLR2 stimulation on the LFA-1 activation status, as well as on expression of other adhesion molecules that could be involved in homotypic cell adhesion. However, it can be postulated that the TLR2-mediated cell cluster formation is most likely attributable to the increased expression of ICAM-1.

Modulation of activation markers is controlled also by different transcription factors like NF- κ B, NFAT and AP-1 (47-49). Following their activation, these cytoplasmic proteins are translocated to the nucleus where they activate several genes participating in inflammation and to the establishment of an immune response. The presence of these factors in permissive cells also allows HIV-1 gene expression and virus production. NF- κ B is considered as a key player in the virus life cycle because it binds to the two NF- κ B-binding motifs located in the HIV-1 enhancer region (64). Transcription of HIV-1 can also be modulated by NFAT and AP-1 (65, 66). The presence of certain pro-inflammatory cytokines in the extracellular environment (e.g. TNF- α and IL-1) and a number of T cell activators can induce these transcription factors and promote HIV-1 production. It is well known that HIV-1 replicates preferentially in effector and memory CD4⁺ T cells and cells displaying a naïve phenotype do not support virus gene expression (51). This inability to allow virus replication seems to be linked with the absence of NFAT in naïve CD4⁺ T cells (65, 67-69). It was previously demonstrated that NFAT acts in synergy with NF- κ B to promote HIV-1 replication in activated and memory CD4⁺ T cells. Moreover, naïve CD4⁺ T cells are metabolically less active than memory cells and require a stronger stimulus to be fully activated and translocate AP-1 and NF- κ B to the nucleus (62, 70). Based on this information, we assessed whether a TLR2-mediated signal is sufficient to trigger nuclear translocation of NF- κ B in naïve and memory CD4⁺ T cells. NF- κ B was found to be activated in both T cell subsets following treatment with the TLR2 ligand Pam₃Csk₄. It can therefore be proposed that bacterial cell wall components that can ligate TLR2 might

promote HIV-1 replication by priming both naïve and memory CD4⁺ T cells. The possibility that TLR-mediated signal transduction events can modulate virus gene expression is not new. For example, it has been reported that TLR2 engagement either with Pam₃Csk₄ or *Neisseria gonorrhoeae* can directly enhance HIV-1 infection in DCs, a process leading to a more efficient virus transfer to CD4⁺ T cells (71). On the other hand, engagement of TLR4 by LPS inhibits HIV-1 replication in primary human macrophages (72, 73). A similar observation has been made with the *Neisseria gonorrhoeae*-derived lipooligosaccharide (74). In both cases, the inhibition of virus replication is linked to a TLR4-mediated secretion of the antiviral cytokines INF- α and IFN- β .

More relevant to HIV-1, we observed that TLR2 stimulation increases virus replication in naïve and memory CD4⁺ T cells and this effect was not due to soluble factor(s) made by contaminating cells such as monocytes and DCs. However, it cannot be totally excluded that the TLR2-mediated effect on HIV-1 replication in purified naïve and memory CD4⁺ T cells might be partly due to contaminating cells through a cell-to-cell contact. It can be proposed that the TLR-2-mediated increase in cellular aggregation might be responsible to some extent for the enhanced HIV-1 production based on the idea that cell-to-cell virus infection is a much more efficient process than infection with cell-free virions. In both CD4⁺ T cell subsets, addition of exogenous rhIL-2 led to an augmentation of TLR2-mediated HIV-1 production. It seems that rhIL-2 provides a positive signal to naïve and memory cells during virus infection and acts in synergy with the TLR2 agonist. Surprisingly, no synergic effect was observed when the TLR2 agonist was used in

combination with a TCR/CD3 ligand (i.e. OKT3) in naïve cells, which is in contrast to the situation prevailing in memory cells. This could be due to the absence of the CD28 co-stimulatory signal. It is surprising to see that virus replication is not augmented in naïve CD4⁺ T lymphocytes when the TLR2 ligand is used in conjunction with OKT3 knowing that these cells need a strong signal to lead to activation. Studies are currently underway to shed light on this matter.

It is now well accepted that there is a selective transmission of R5 virions, a process occurring in mucosal sites like gastrointestinal and genital tracts (75). Effector memory CD4⁺ T cells, which are located in such mucosal tissues, are massively depleted very soon following primary infection (1, 2). This phenomenon is attributable to their high permissiveness to infection with R5 viruses because these cells express high levels of surface CCR5. On the other hand, central memory CD4⁺ T lymphocytes in absence of other stimuli can only be infected by X4 viruses because they do express CXCR4 and are negative for CCR5. Having established that TLR2 stimulation causes naïve and memory CD4⁺ T cells to acquire an effector-like phenotype, we assessed whether they do acquire expression of the virus co-receptor CCR5. This chemokine receptor is expressed on effector T cells and allows them to reach inflamed non-lymphoid tissues and peripheral tissues (8, 11). Importantly, treatment of naïve and memory CD4⁺ T cells with the TLR2 ligand resulted in an increased expression of CCR5 in both cell subsets. These data are in agreement with a previous work showing that the TLR2 ligand Pam₃Csk₄ can trigger

secretion of IFN- γ (76), a cytokine produced by effector T cells. Interestingly, although virus production could not be detected in untreated cells, the TLR2-mediated induction of CCR5 rendered naïve and memory CD4⁺ T cells susceptible to infection with the R5 strain NL4-3Balenv. Moreover, our results indicate that naïve cells become permissive to infection with R5 virions only after a long stimulation time with the TLR2 ligand (i.e. 72 h) and the noticed increase in HIV-1 replication was further augmented in presence of rhIL-2. It is possible that TLR2 engagement is not powerful enough to allow productive infection with R5 viruses after only 24 h of stimulation. In fact, viral replication appears only after 72 h of stimulation either in absence or presence of rhIL-2. In addition, virus production is further augmented when TLR2 and TCR/CD3 complex are concomitantly engaged (i.e. 1.4- compared to 2.7-fold increase in absence of rhIL-2 in naïve cells and 9.3- compared to 24-fold increase in presence of rhIL-2 in memory cells). The more important HIV-1 replication in memory compared to naïve cells is most likely due to a higher surface expression of CCR5 and enhanced TLR2-mediated induction of NF- κ B.

Considering that circulating microbial products are responsible for a systemic immune activation, it is possible that these bacterial components are responsible for at least part of this activation via TLR stimulation of naïve and memory CD4⁺ T cells. These products that originate from the microbial translocation might directly or indirectly, through the effects of cytokines and chemokines, result in a polyclonal T cell activation. Of interest to note is the recent study by Brenchley and colleagues who have demonstrated that ongoing

infection and depletion of CD4⁺ T cells throughout the chronic phase of HIV-1 infection prevents the re-establishment of a competent immunological control of microbial translocation (12). The complement to such events would be that microbial translocation in turn perpetuates viral replication through the provision and activation of CD4⁺ T cells that might serve as targets for HIV-1 (12, 77). This series of events can accelerate the deterioration of the immune system. In fact, it is known that the switch from R5 to X4 viruses takes place many years after primo-infection and that at this time, there is a rapid and dramatic decrease in CD4⁺ T cell counts. The results presented in the current study lead us to propose that the decline in the overall number of circulating CD4⁺ T lymphocytes might be accelerated in patients experiencing infections with pathogens that can engage some specific pathogen recognition receptors such as TLR2. Although the contribution of sexually transmitted bacterial infections to HIV-1 pathogenesis is established, the impact of community-acquired bacterial infections is still unclear. However, it is recognized that these infections caused for example by *Streptococcus pneumonia*, *Salmonella* spp., *Mycobacterium tuberculosis* and *Haemophilus influenza* are more prevalent in HIV-1-infected persons than in uninfected individuals, even if the former are under antiretroviral therapy (78-82). This phenomenon seems to be linked with the HIV-1-mediated immune dysregulation affecting both adaptive and innate immunity. Indeed, HIV-1-infected persons fail to control and eliminate bacterial infections that can become recurrent and invasive. Opportunistic infections are also commonly present in HIV-1-infected individuals due to their immunodeficiency status. When the number of CD4⁺ T cells decreases and viremia goes up, commensal bacteria can become pathogenic and cause opportunistic infections, a

problem frequently seen in persons carrying HIV-1. Several diseases are commonly afflicting HIV-1-infected persons like pneumonia (caused by *Pneumocystis carini*), tuberculosis (caused by *Mycobacterium tuberculosis*), toxoplasmosis (caused by *Toxoplasma gondii*), cytomegalovirus infections, encephalitis and Kaposi's sarcoma. The majority of these human pathogens are present in the normal flora of the digestive tract. In individuals who have contracted HIV-1, the immune system is unable to control these opportunist microorganisms because memory CD4⁺ T cells are eliminated and other cell types suffer from several functional deficiencies (e.g. CD8⁺ T cells and macrophages). Treatment of these patients with potent antibiotics might lead to the release of microbial products like peptidoglycans, bacterial lipoproteins, lipoteichoic acid and lipopolysaccharides. Based on our findings, it is possible that the liberation of these microbial products in the periphery can modulate HIV-1-mediated disease progression by activating naïve and memory CD4⁺ T cells and rendering them more permissive to productive infection with both X4 and R5 isolates of HIV-1. Therefore, therapeutic approaches aimed at controlling bacterial infections in HIV-1 patients deserve to be re-evaluated in light of this new information.

In summary, bacterial infection and the ensuing microbial translocation might act as factors accelerating HIV-1 disease progression by promoting the transformation of naïve and memory CD4⁺ T cells into effector cells and increasing the pool of cells permissive to HIV-1 infection. A better comprehension of this phenomenon and the various interactions

between immune cells, bacterial commensal flora and pathogenic bacteria is needed to shed light on their possible impact on HIV-1-mediated immune dysregulation and pathogenesis.

Acknowledgments

We are grateful to Ms. Sylvie Méthot for editorial assistance, Dr. Maurice Dufour for flow cytometry analyses, Dr. Marc Bergeron for his help with statistical analyses and Dr. Michel Ouellet and Mr. Michael Imbeault for their help in graphism conception. This study was performed by S.T. in partial fulfilment of her Ph.D. degree in the Microbiology-Immunology Program, Faculty of Medicine, Laval University.

References

1. Brenchley, J. M., T. W. Schacker, L. E. Ruff, D. A. Price, J. H. Taylor, G. J. Beilman, P. L. Nguyen, A. Khoruts, M. Larson, A. T. Haase, and D. C. Douek. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 200:749-759.
2. Hel, Z., J. R. McGhee, and J. Mestecky. 2006. HIV infection: first battle decides the war. *Trends Immunol.* 27:274-281.
3. Stebbing, J., B. Gazzard, and D. C. Douek. 2004. Where does HIV live? *N. Engl. J. Med.* 350:1872-1880.
4. Mackay, C. R., W. L. Marston, and L. Dudler. 1990. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171:801-817.
5. Marvel, J., E. Lightstone, N. L. Samberg, D. Ettinghausen, and H. J. Stauss. 1991. The CD45RA molecule is expressed in naive murine CTL precursors but absent in memory and effector CTL. *Int. Immunol.* 3:21-28.
6. Campbell, J. J., E. P. Bowman, K. Murphy, K. R. Youngman, M. A. Siani, D. A. Thompson, L. Wu, A. Zlotnik, and E. C. Butcher. 1998. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J. Cell Biol.* 141:1053-1059.

7. Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.
8. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22:745-763.
9. Kunkel, E. J., J. Boisvert, K. Murphy, M. A. Vierra, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, H. B. Greenberg, M. R. Hodge, L. Wu, E. C. Butcher, and J. J. Campbell. 2002. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 160:347-355.
10. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
11. Sprent, J., and C. D. Surh. 2002. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 20:551-579.
12. Brenchley, J. M. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Retrovirology* 3 Suppl 1:S98.
13. Ioannidis, J., and D. Wilkinson. 2003. HIV: opportunistic infections. *Clin. Evid.*:795-816.

14. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A. S. Fauci. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 328:327-335.
15. Hopkins, P. A., and S. Sriskandan. 2005. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin. Exp. Immunol.* 140:395-407.
16. Janeway, C. A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1:1-13.
17. Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168:4531-4537.
18. Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164:5998-6004.
19. Bowie, A., and L. A. O'Neill. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67:508-514.

20. Akashi-Takamura, S., and K. Miyake. 2006. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *J. Infect. Chemother.* 12:233-240.
21. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
22. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
23. Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, and D. Malo. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* 189:615-625.
24. Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski, and D. Golenbock. 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163:1-5.
25. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274:17406-17409.

26. Means, T. K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D. T. Golenbock, and M. J. Fenton. 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol.* 163:6748-6755.
27. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169:10-14.
28. Massari, P., P. Henneke, Y. Ho, E. Latz, D. T. Golenbock, and L. M. Wetzler. 2002. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J. Immunol.* 168:1533-1537.
29. Massari, P., A. Visintin, J. Gunawardana, K. A. Halmen, C. A. King, D. T. Golenbock, and L. M. Wetzler. 2006. Meningococcal porin PorB binds to TLR2 and requires TLR1 for signaling. *J. Immunol.* 176:2373-2380.
30. Caron, G., D. Duluc, I. Fremaux, P. Jeannin, C. David, H. Gascan, and Y. Delneste. 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 175:1551-1557.
31. Xu, D., M. Komai-Koma, and F. Y. Liew. 2005. Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol.* 233:85-89.

32. Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59:284-291.
33. 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.
34. 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.* 71:3588-3596.
35. 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.* 76:1004-1014.
36. Platt, E. J., K. Wehrly, S. E. Kuhmann, B. Chesebro, and D. Kabat. 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:2855-2864.

37. Barat, C., and M. J. Tremblay. 2002. Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation. *J. Biol. Chem.* 277:28714-28724.
38. Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, USA.
39. Sokal, R. R. a. R., F. James. 1995. *Biometry*. W. H. Freeman and Company, New York, USA.
40. Goerdts, S., O. Politz, K. Schledzewski, R. Birk, A. Gratchev, P. Guillot, N. Hakiy, C. D. Klemke, E. Dippel, V. Kodelja, and C. E. Orfanos. 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67:222-226.
41. Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.
42. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194:863-869.
43. Castellanos Mdel, C., S. Lopez-Giral, M. Lopez-Cabrera, and M. O. de Landazuri. 2002. Multiple cis-acting elements regulate the expression of the early T cell activation antigen CD69. *Eur. J. Immunol.* 32:3108-3117.

44. Hughes-Fulford, M., E. Sugano, T. Schopper, C. F. Li, J. B. Boonyaratanakornkit, and A. Cogoli. 2005. Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cell Signal*. 17:1111-1124.
45. Reinherz, E. L., P. C. Kung, J. M. Pesando, J. Ritz, G. Goldstein, and S. F. Schlossman. 1979. Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody. Activation stimuli required for expression. *J. Exp. Med.* 150:1472-1482.
46. Roebuck, K. A., and A. Finnegan. 1999. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 66:876-888.
47. Ghosh, S., and M. Karin. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.
48. Angel, P., and M. Karin. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072:129-157.
49. Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 5:472-484.
50. Roy, J., M. Audette, and M. J. Tremblay. 2001. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene expression in human T cells is regulated by phosphotyrosyl phosphatase activity. Involvement of NF-kappaB, Ets, and palindromic interferon-gamma-responsive element-binding sites. *J. Biol. Chem.* 276:14553-14561.

51. Ostrowski, M. A., T. W. Chun, S. J. Justement, I. Motola, M. A. Spinelli, J. Adelsberger, L. A. Ehler, S. B. Mizell, C. W. Hallahan, and A. S. Fauci. 1999. Both memory and CD45RA+/CD62L+ naive CD4(+) T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 73:6430-6435.
52. Fritz, J. H., S. E. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lecreulx, M. Caroff, J. M. Cavaillon, D. J. Philpott, and M. Adib-Conquy. 2005. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 35:2459-2470.
53. Okugawa, S., S. Yanagimoto, K. Tsukada, T. Kitazawa, K. Koike, S. Kimura, H. Nagase, K. Hirai, and Y. Ota. 2006. Bacterial flagellin inhibits T cell receptor-mediated activation of T cells by inducing suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1). *Cell Microbiol.* 8:1571-1580.
54. Kabelitz, D. 2007. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 19:39-45.
55. Matsumoto, M., K. Atarashi, E. Umemoto, Y. Furukawa, A. Shigeta, M. Miyasaka, and T. Hirata. 2005. CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells. *J. Immunol.* 175:8042-8050.
56. Foger, N., R. Marhaba, and M. Zoller. 2000. CD44 supports T cell proliferation and apoptosis by apposition of protein kinases. *Eur. J. Immunol.* 30:2888-2899.

57. Koopman, G., Y. van Kooyk, M. de Graaff, C. J. Meyer, C. G. Figdor, and S. T. Pals. 1990. Triggering of the CD44 antigen on T lymphocytes promotes T cell adhesion through the LFA-1 pathway. *J. Immunol.* 145:3589-3593.
58. Staunton, D. E., M. L. Dustin, and T. A. Springer. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339:61-64.
59. Fawcett, J., C. L. Holness, L. A. Needham, H. Turley, K. C. Gatter, D. Y. Mason, and D. L. Simmons. 1992. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 360:481-484.
60. Bachmann, M. F., K. McKall-Faienza, R. Schmits, D. Bouchard, J. Beach, D. E. Speiser, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. 1997. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 7:549-557.
61. Xingyuan, M., Z. Wenyun, and W. Tianwen. 2006. Leukocyte function-associated antigen-1: structure, function and application prospects. *Protein Pept. Lett.* 13:397-400.
62. Croft, M., L. M. Bradley, and S. L. Swain. 1994. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J. Immunol.* 152:2675-2685.

63. Liew, F. Y., M. Komai-Koma, and D. Xu. 2004. A toll for T cell costimulation. *Ann. Rheum. Dis.* 63 Suppl 2:ii76-ii78.
64. Nabel, G., and D. Baltimore. 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 326:711-713.
65. Cron, R. Q., S. R. Bartz, A. Clausell, S. J. Bort, S. J. Klebanoff, and D. B. Lewis. 2000. NFAT1 enhances HIV-1 gene expression in primary human CD4 T cells. *Clin. Immunol.* 94:179-191.
66. Kingsman, S. M., and A. J. Kingsman. 1996. The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *Eur. J. Biochem.* 240:491-507.
67. Robichaud, G. A., B. Barbeau, J. F. Fortin, D. M. Rothstein, and M. J. Tremblay. 2002. Nuclear factor of activated T cells is a driving force for preferential productive HIV-1 infection of CD45RO-expressing CD4+ T cells. *J. Biol. Chem.* 277:23733-23741.
68. Bassuk, A. G., R. T. Anandappa, and J. M. Leiden. 1997. Physical interactions between Ets and NF-kappaB/NFAT proteins play an important role in their cooperative activation of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *J. Virol.* 71:3563-3573.

69. Kinoshita, S., B. K. Chen, H. Kaneshima, and G. P. Nolan. 1998. Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell* 95:595-604.
70. Stout, R. D., and J. Suttles. 1992. T cells bearing the CD44hi "memory" phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle. *Cell Immunol.* 141:433-443.
71. Zhang, J., G. Li, A. Bafica, M. Pantelic, P. Zhang, H. Broxmeyer, Y. Liu, L. Wetzler, J. J. He, and T. Chen. 2005. Neisseria gonorrhoeae enhances infection of dendritic cells by HIV type 1. *J. Immunol.* 174:7995-8002.
72. Bernstein, M. S., S. E. Tong-Starksen, and R. M. Locksley. 1991. Activation of human monocyte--derived macrophages with lipopolysaccharide decreases human immunodeficiency virus replication in vitro at the level of gene expression. *J. Clin. Invest.* 88:540-545.
73. Equils, O., K. K. Salehi, R. Cornataeanu, D. Lu, S. Singh, K. Whittaker, and G. C. Baldwin. 2006. Repeated lipopolysaccharide (LPS) exposure inhibits HIV replication in primary human macrophages. *Microbes Infect.* 8:2469-2476.
74. Liu, X., A. Mosoian, T. Li-Yun Chang, B. Zerhouni-Layachi, A. Snyder, G. A. Jarvis, and M. E. Klotman. 2006. Gonococcal lipooligosaccharide suppresses HIV infection in human primary macrophages through induction of innate immunity. *J. Infect. Dis.* 194:751-759.

75. Margolis, L., and R. Shattock. 2006. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nat. Rev. Microbiol.* 4:312-317.
76. Mayer, K. D., K. Mohrs, S. R. Crowe, L. L. Johnson, P. Rhyne, D. L. Woodland, and M. Mohrs. 2005. The functional heterogeneity of type 1 effector T cells in response to infection is related to the potential for IFN-gamma production. *J. Immunol.* 174:7732-7739.
77. Bafica, A., C. A. Scanga, M. Schito, D. Chaussabel, and A. Sher. 2004. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. *J. Immunol.* 172:7229-7234.
78. Celum, C. L., R. E. Chaisson, G. W. Rutherford, J. L. Barnhart, and D. F. Echenberg. 1987. Incidence of salmonellosis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 156:998-1002.
79. Gordon, M. A., A. L. Walsh, M. Chaponda, D. Soko, M. Mbwini, M. E. Molyneux, and S. B. Gordon. 2001. Bacteraemia and mortality among adult medical admissions in Malawi--predominance of non-typhi salmonellae and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect.* 42:44-49.
80. Madhi, S. A., K. Petersen, A. Madhi, M. Khoosal, and K. P. Klugman. 2000. Increased disease burden and antibiotic resistance of bacteria causing severe community-acquired lower respiratory tract infections in human immunodeficiency virus type 1-infected children. *Clin. Infect. Dis.* 31:170-176.

81. Ruiz-Contreras, J., J. T. Ramos, T. Hernandez-Sampelayo, M. D. Gurbindo, M. Garcia de Jose, M. J. De Miguel, M. J. Cilleruelo, and M. J. Mellado. 1995. Sepsis in children with human immunodeficiency virus infection. The Madrid HIV Pediatric Infection Collaborative Study Group. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 14:522-526.
82. Maniar, J. K., R. R. Kamath, S. Mandalia, K. Shah, and A. Maniar. 2006. HIV and tuberculosis: partners in crime. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 72:276-282.

Footnotes

1- This work was made possible through a grant to M.J.T from the Canadian Foundation for AIDS Research. S.T holds a Doctoral Award from the Canadian Institute of Health Research HIV/AIDS Research Program and M.J.T. is the recipient of the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (Tier 1 level).

2- Corresponding author, mailing address:

Laboratoire d'Immuno-Rétrovirologie Humaine

Centre de Recherche en Infectiologie, RC709

2705 Boulevard Laurier

Québec (QC), Canada, G1V 4G2

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

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

Figure legends

Figure 1. TLR2 triggering induces homotypic aggregation in both naïve and memory CD4⁺ T cells. Naïve (A) and memory (B) CD4⁺ T cells (1×10^5) were either left untreated (mock) or treated with OKT3 (1 $\mu\text{g/ml}$), Pam₃Csk₄ (5 $\mu\text{g/ml}$) and PHA-L (1 $\mu\text{g/ml}$)/rhIL-2 (30 U/ml) (used as a positive control) for 24 and 72 h. Images are presented at x20 magnification and each is representative of three independent experiments.

Figure 2. NF- κ B is induced upon treatment of naïve and memory CD4⁺ T cells with the TLR2 agonist. A) Naïve and memory CD4⁺ T cells (10×10^6) were either left untreated (mock) or treated with Pam₃Csk₄ (5 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. The positive control consisted of cells treated first with PHA-L (1 $\mu\text{g/ml}$)/rhIL-2 (30 U/ml) and next stimulated with OKT3 (1 $\mu\text{g/ml}$)/CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$). The nuclear extracts were incubated with a NF- κ B-labeled 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) or nonspecific (Oct-2A) oligonucleotides. The data shown are representative of two independent experiments. B) Fold increase over unstimulated cells for naïve and memory CD4⁺ T cells have been determined by estimating the signal band intensities by laser densitometry scanning.

Figure 3. TLR2 engagement promotes replication of X4 virus in naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes. Purified naïve (A) and memory (B) CD4⁺ T cells (1×10^5) were either left untreated (mock) or treated with OKT3 (1 $\mu\text{g/ml}$), Pam₃Csk₄ (5 $\mu\text{g/ml}$), LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$)

(used as a negative control), Pam₃Csk₄ (5 µg/ml)/OKT3 (1 µg/ml) and LPS (0.1 µg/ml)/OKT3 (1 µg/ml) in the absence (left panels) or presence (right panels) of rhIL-2 (30 U/ml) for 24 and 72 h. The positive controls consisted of cells treated with PHA-L and rhIL-2 (upper and lower left panels). Next, cells were incubated with the X4-tropic strain NL4-3 (10 ng of p24 per 1 x 10⁵ cells) for 24 h. Cell-free supernatants were harvested at 3 days post-infection and production of infectious viruses was estimated through the use of the TZM-bl indicator cell line. Two days later, TZM-bl cells were lysed to monitor luciferase activity. Results are expressed as fold increase of luciferase activity of cells treated with the listed stimuli over mock-treated cells. The data shown represent the mean ± standard deviations of quintuplicate samples and are representative of eight separate experiments.

Figure 4. Replication of R5 virus is augmented following treatment of quiescent naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes with the TLR2 ligand. Purified naïve (A) and memory (B) CD4⁺ T cells (1 x 10⁵) were either left untreated (mock) or treated with OKT3 (1 µg/ml), Pam₃Csk₄ (5 µg/ml), LPS (0.1 µg/ml) (used as a negative control), Pam₃Csk₄ (5 µg/ml)/OKT3 (1 µg/ml) and LPS (0.1 µg/ml)/OKT3 (1 µg/ml) in the absence (left panels) or presence (right panels) of rhIL-2 (30 U/ml) for 24 and 72 h. The positive controls consisted of cells treated with PHA-L and rhIL-2 (upper and lower left panels). Next, cells were incubated with the R5-tropic strain NL4-3Balenv (10 ng of p24 per 1 x 10⁵ cells) for 24 h. Cell-free supernatants were harvested at 3 days post-infection and production of infectious viruses was estimated through the use of the TZM-bl indicator cell line. Two

days later, TZM-bl cells were lysed to monitor luciferase activity. Results are expressed as fold increase of luciferase activity of cells treated with the listed stimuli over mock-treated cells. The data shown represent the mean \pm standard deviations of quintuplicate samples and are representative of five separate experiments.

Figure 5. Cytokine profiles in stimuli-treated naïve and memory CD4⁺ T cells using a multiplex bead array test. Purified naïve (A) and memory (B) CD4⁺ T cells (1×10^5) were either left untreated (i.e. mock) or treated for 24 h at 37°C with Pam₃Csk₄ (5 µg/ml), LPS (0.1 µg/ml) and cross-linked OKT3 (1 µg/ml). Next, cell-free supernatants were harvested and analyzed with a Bio-Plex assay that can detect the 10 different listed cytokines. The results shown are representative of two separate experiments performed with different donors.

Table I. Expression of CD69, CD25, ICAM-1 and HLA-DR in both naïve and memory

CD4+ T cells after treatment with the TLR2 ligand

| Conditions | Naïve (%) | | | | Memory (%) | | | |
|--------------------|-----------|------|--------|--------|------------|------|--------|--------|
| | CD69 | CD25 | ICAM-1 | HLA-DR | CD69 | CD25 | ICAM-1 | HLA-DR |
| Isotype | 3.9 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Mock | 5.2 | 1.6 | 3.5 | 3.6 | 2.6 | 0.9 | 1.0 | 5.7 |
| OKT3 | 9.0 | 5.5 | 5.0 | 4.4 | 4.4 | 2.2 | 3.4 | 8.9 |
| Pam3Csk4 | 15.8 | 6.0 | 5.8 | 4.8 | 14.6 | 9.2 | 8.5 | 13.2 |
| Pam3Csk4 + OKT3 | 18.9 | 9.4 | 9.2 | 6.6 | 17.8 | 8.7 | 9.8 | 17.2 |
| PHA-L | 22.7 | 10.8 | 26.2 | 8.7 | 27.6 | 12.0 | 43.4 | 18.5 |

#: Percentage of cells expressing the studied cells surface marker was defined by flow cytometry

Table II. CCR5 expression on naïve and memory CD4+ T cells following treatment with the TLR2 agonist

| Conditions | Naïve (%) | Memory (%) |
|--------------------|-----------|------------|
| | CCR5 | CCR5 |
| Isotype | 1.0 | 1.0 |
| Mock | 1.4 | 0.6 |
| OKT3 | 2.5 | 3.6 |
| Pam3Csk4 | 2.6 | 10.0 |
| Pam3Csk4 + OKT3 | 5.2 | 15.5 |
| PHA-L | 10.1 | 13.7 |

#: Percentage of cells expressing CCR5 was monitored by flow cytometry

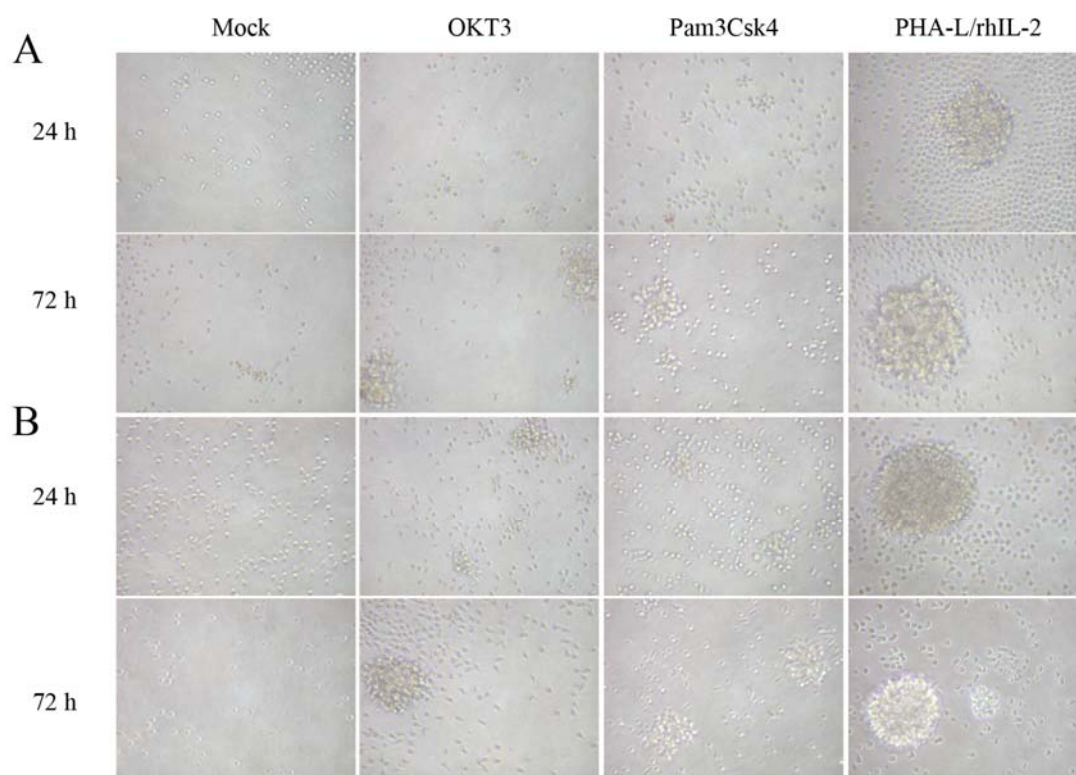
Figure 1.

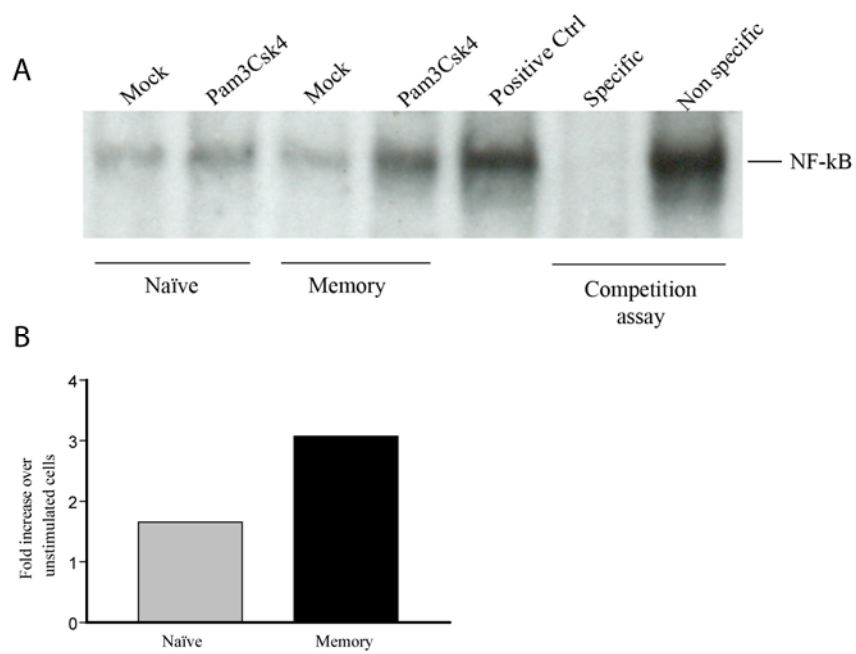
Figure 2.

Figure 3.

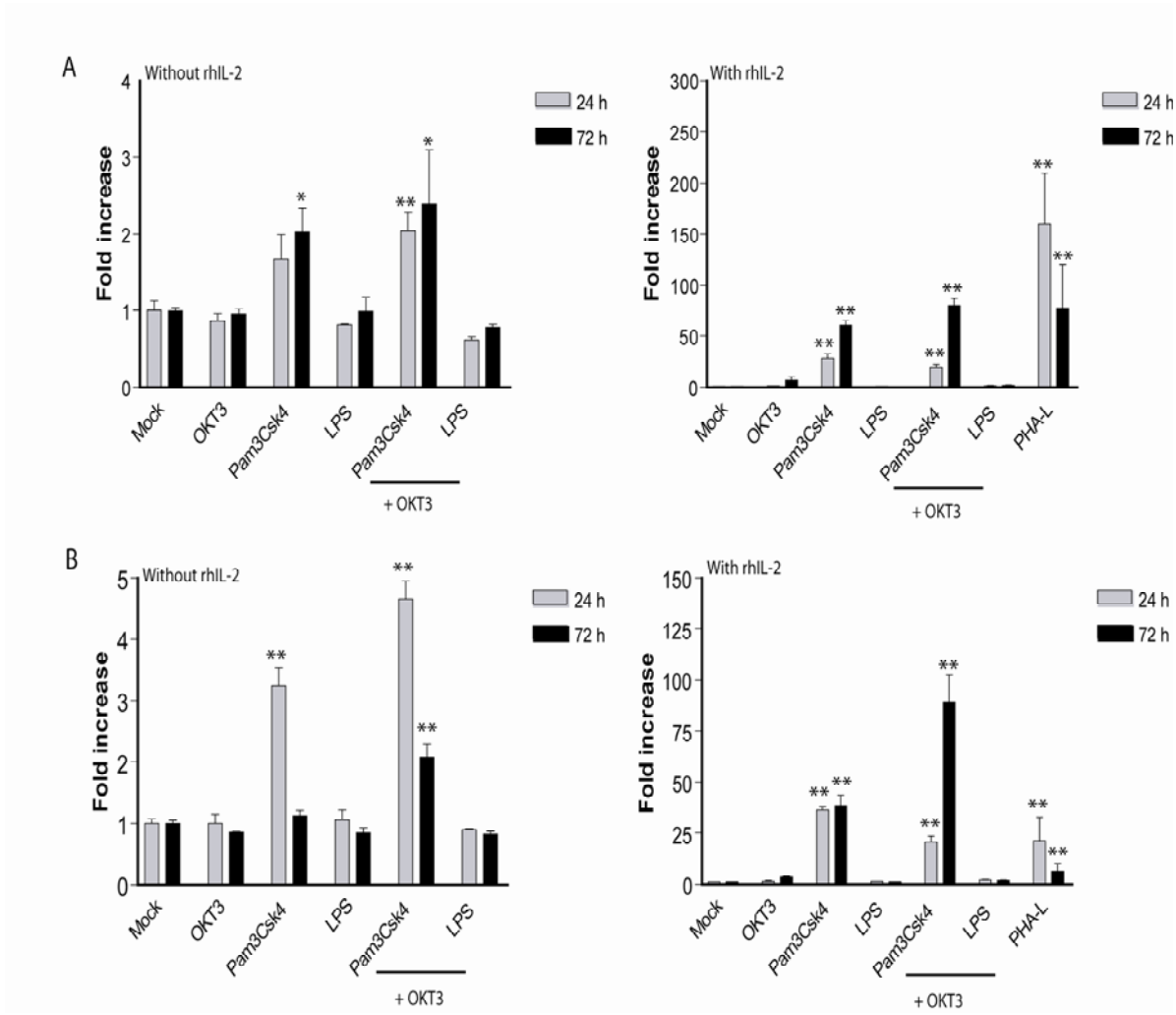
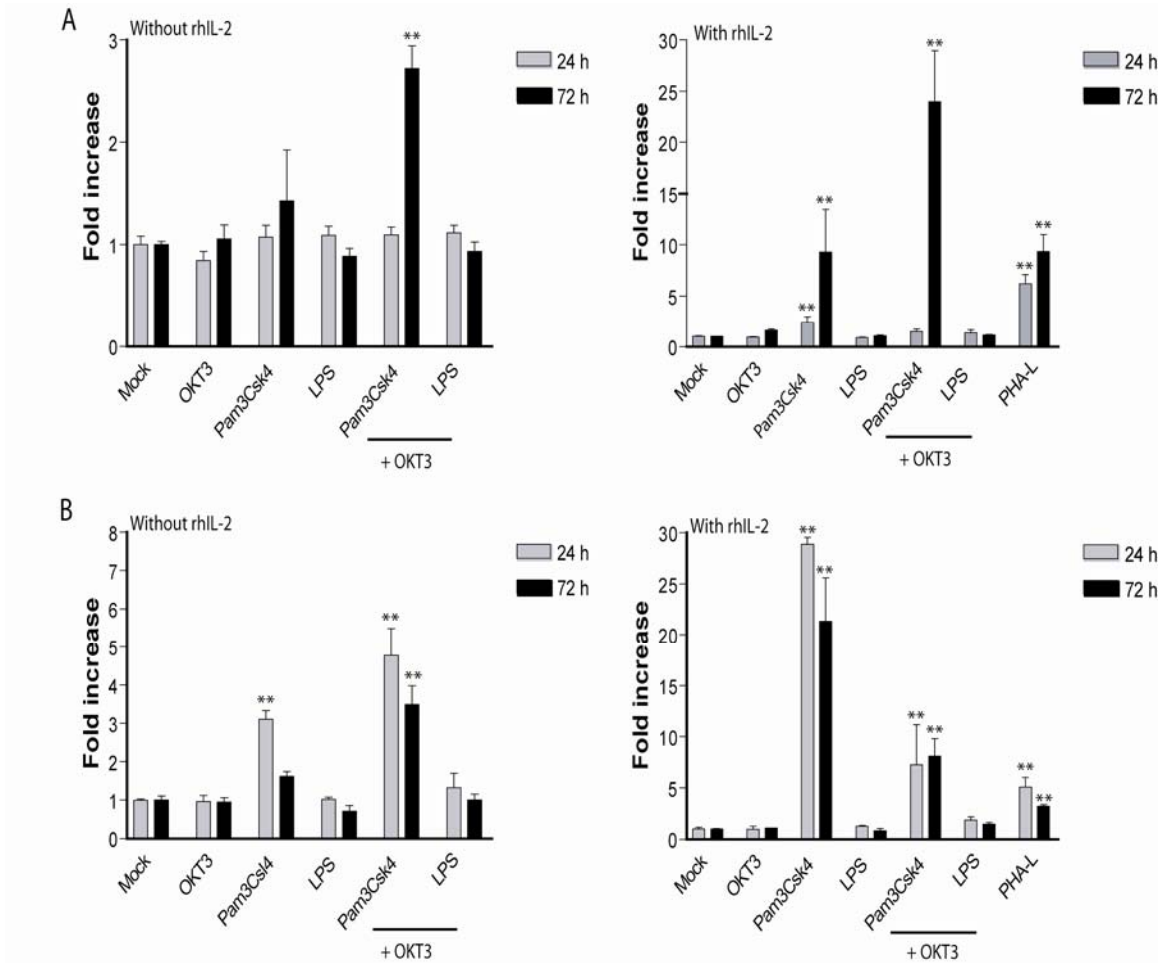


Figure 4.



Chapitre V. La stimulation des TLR2 et TLR4 exerce des effets contraires sur l'infection par le VIH-1 des cellules dendritiques humaines et le transfert subséquent aux lymphocytes T CD4+

Ce chapitre a été soumis pour publication dans la revue *The Journal of Virology* et est constitué de la version soumise.

5.1 Résumé

La reconnaissance des produits microbiens via les TLR initie une réponse inflammatoire orchestrée par les cellules immunes comme les cellules dendritiques (CDs). Puisque ces cellules patrouillent les muqueuses, porte d'entrée pour plusieurs pathogènes dont le VIH-1, nous avons investigué l'impact de la stimulation sur l'infection productive des CDs et la propagation aux lymphocytes T CD4+. Nous rapportons ici que l'engagement du TLR2 sur les CDs augmente les transferts précoce et tardif du VIH-1 aux lymphocytes T CD4+ ainsi que la susceptibilité des CDs à l'infection. Bien que la stimulation du TLR2 entraîne la phosphorylation de $I\kappa B\alpha$, un signe de l'activation de NF- κ B, ce facteur cellulaire de transcription n'est pas impliqué dans l'infection productive des CDs. De plus, aucun effet constant et notable n'a été observé suivant la stimulation des TLR 5, 7 et 9, alors que l'infection des CDs et la transmission du VIH-1 aux lymphocytes T CD4+ s'est avérée réduite suite à la stimulation du TLR4. Ainsi, il peut être avancé que l'exposition des CDs aux produits bactériens qui lient le TLR2, comme certains pathogènes causant les infections transmissibles sexuellement, peut influencer le procédé de dissémination virale via les CD, un phénomène qui peut contribuer à une propagation plus rapide de la maladie.

5.2 Article

TLR2 and TLR4 Triggering Exerts Contrasting Effects with Regard to HIV-1 Infection of Human Dendritic Cells and Subsequent Transfer to CD4⁺ T Cells

Sandra Thibault, Rémi Fromentin, Mélanie R. Tardif, and Michel J. Tremblay*

*Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval,
and Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada, G1V 4G2*

Running title: TLR2/4 stimulation affects HIV-1/dendritic cell interactions

*Corresponding author

Laboratoire d'Immuno-Rétrovirologie Humaine

Centre de Recherche en Infectiologie, RC-709

2705, Boulevard Laurier

Québec (QC), Canada, G1V 4G2

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

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

Abstract

Recognition of microbial products through Toll-like receptors (TLRs) initiates inflammatory responses orchestrated by innate immune cells such as dendritic cells (DCs). As these cells are patrolling mucosal surfaces, a portal of entry for various pathogens including human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1), we investigated the impact of TLR stimulation on productive HIV-1 infection of DCs and viral spreading to CD4⁺ T cells. We report here that engagement of TLR2 on DCs increases HIV-1 transmission toward CD4⁺ T cells by primarily affecting *de novo* virus production by DCs. Although TLR2 stimulation triggers phosphorylation of I κ B α , a sign of NF- κ B activation, this ubiquitous cellular transcription factor is not involved in the more important productive infection of DCs. No noticeable and consistent effect was observed following engagement of TLR5, 7 and 9, whereas both HIV-1 infection of DCs and DC-mediated virus transmission to CD4⁺ T cells were reduced upon TLR4 engagement. Therefore, it can be proposed that exposure of DCs to TLR2-binding bacterial constituents derived, for example, from pathogens causing sexually transmissible infections, might influence the process of DC-mediated viral dissemination, a phenomenon that might contribute to a more rapid disease progression.

Introduction

Myeloid dendritic cells (mDCs) play a dominant role in the induction and regulation of the adaptive immune response. It has been demonstrated that immature mDCs reside in submucosal tissues that are in contact with the external environment. These cells act as sentinels and continuously monitor the surrounding environment to detect potential invaders. Upon encountering a pathogen, they scavenge and internalize the intruder before migrating to the draining lymph nodes, where they present processed antigens to CD4⁺ T cells, thus initiating an immune response (44).

Pathogens express signature motifs better known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are recognized by immature mDCs through several pathogen-recognition receptors (28, 32) such as Toll-like receptors (TLRs) (43, 71). These specialized receptors provide a first line of defence against a pathogen attack and rapidly activate defence signalling pathways following initial infection. TLRs are considered as playing a crucial role in the switch from innate to adaptive immunity in mammals. To date, at least 10 distinct TLRs have been characterized in humans and they are classified according to which PAMPs they recognize (2). For example, TLR2, 4 and 5 mainly recognize bacterial components, whereas TLR3, 7, 8 and 9 detect nucleic acids derived from microorganisms (3). The detection of PAMPs by TLRs triggers biochemical events resulting in the activation of NF- κ B and the induction of a pro-inflammatory response. The latter is characterized by the migration of immature mDCs to secondary lymphoid organs where they mature and efficiently present the nominal antigen to CD4⁺ T cells (15, 22, 44, 49).

Due to their strategic localization in mucosal epithelia, immature mDCs are among the first cells to encounter HIV-1 after sexual transmission (26, 29, 60, 72) and they play a crucial role during the initial stages of infection and viral dissemination (50). HIV-1 can productively infect immature mDCs, although not at a rate sufficient to affect viral load. Nonetheless, this cell subpopulation is thought to contribute to viral propagation, as they migrate to lymph nodes, where they efficiently transfer of newly produced virions to CD4⁺ T cells through the immunological synapse (42). This specific type of virus propagation is called transfer in *cis* or late transfer. Another type of transfer can take place when virions, either surface-bound or inside intracellular vesicles, are released following an intimate contact between DCs and CD4⁺ T cells. This type of virus transmission is termed transfer *in trans* or early transfer (19, 23). Thus, by capturing HIV-1 at sites of viral entry into the body and by transferring viruses to CD4⁺ T cells, immature mDCs may be critical to the process of HIV-1 transmission.

Due to the rather unique location of TLRs and their numerous contacts with foreign antigens, studies have previously monitored the impact of TLR stimulation on DCs. For example, a direct link between *Porphyromonas gingivalis*, *Mycoplasma fermentans* and TLR2 stimulation has already been established (37, 46). However, we are only beginning to study the putative effect(s) of bacterial products that can bind TLRs in DCs in the context of HIV-1 infection (74, 75). It has been recently reported that productive HIV-1 infection of immature monocyte-derived DCs (IM-MDDCs) is enhanced following TLR2 engagement by *Neisseria gonorrhoeae* (74). Moreover, stimulation of TLR4, 7 and 9 in DCs has been reported to lead to secretion of type-I interferons such as interferon (IFN)- α and IFN- β , two

soluble factors that can repress HIV-1 replication. It has been demonstrated that type-I IFNs display pleiotropic effects which affect several steps in the virus life cycle from the initial viral uptake to the release of newly formed virions (6, 27, 33, 54).

Considering the key role played by mDCs in the pathogenesis of HIV-1 infection and knowing that mDCs are constantly exposed to microbial components from different pathogens, we investigated whether TLR2, 4, 5, 7 and 9 agonists can directly modulate the ability of IM-MDDCs, which are considered as myeloid-like DCs, to be productively infected with HIV-1 and transfer virus to susceptible CD4⁺ T cells.

Material and Methods

Antibodies and reagents. Anti-phospho-I κ B α and anti-I κ B α were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA), whereas anti-actin was obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Hybridomas producing 183-H12-5C and 31-90-25, two antibodies recognizing different epitopes of the HIV-1 major viral core protein p24, were supplied by the AIDS Repository Reagent Program (Germantown, MD) and ATCC (Manassas, VA), respectively. Antibodies obtained from these cells were purified using mAbTrap protein G affinity columns according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Pam3Csk4 (a synthetic tripalmitoylated lipopeptide that mimicks the acylated amino terminus of bacterial lipoproteins) (TLR2 agonist), lipoteichoic acid (LTA) from *Staphylococcus aureus* (a purified bacterial component) (TLR2 agonist), ultra-purified lipopolysaccharide (LPS) (a purified bacterial component) (TLR4 agonist), flagellin (a purified bacterial component) (TLR5 agonist), R837 (an imidazoquinoline compound that mimics single-stranded RNA) (TLR7 agonist) and purified *E. coli* DNA (a purified bacterial component) (TLR9 agonist) were all purchased from InvivoGen (San Diego, CA). The anti-HIV-1 compound Efavirenz was obtained through the AIDS Repository Reagent Program. IL-4 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN) and GM-CSF was a kind gift from Cangene (Winnipeg, MA). The soluble vaccinia virus-encoded recombinant protein B18R was purchased from eBioscience (San Diego, CA). Phytohemagglutinin-L (PHA-L) and recombinant human IL-2 (rhIL-2) were obtained from Sigma (St-Louis, MO) and AIDS Repository Reagent Program, respectively.

Cells. Human embryonic kidney 293T cells, provided by W. C. Greene (The J. Gladstone Institutes, San Francisco, CA), were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS) (Wisent, St-Bruno, QC). HEK-Blue™ IFN α/β cells were purchased from InvivoGen (San Diego, CA) and were cultured in DMEM supplemented with 10 % FBS, zeocin (100 $\mu\text{g/ml}$) and blasticidin (10 $\mu\text{g/ml}$). Autologous CD4⁺ T cells were isolated using a negative selection kit according to the manufacturer's instructions (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC). Purified CD4⁺ T cells were cultured for five days in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS before their activation with PHA-L (1 $\mu\text{g/ml}$) and rhIL-2 (30 U/ml) for two days. Monocytes (CD14⁺) were purified from freshly isolated PBMCs by immunomagnetic positive selection using the MACS CD14 micro beads kit (Stem Cell Technologies Inc). Purified CD14⁺ cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, GM-CSF (1000 U/ml) and IL-4 (200 U/ml) for 7 days to obtain IM-MDDCs as previously described (20).

Plasmids and production of viral stocks. pNL4-3 (1) and pNL4-3Balenv (14) are full-length infectious molecular clones of HIV-1. In pNL4-3Balenv, the *env* gene of the X4 (T)-tropic NL4-3 strain has been replaced with that of the R5 (macrophage)-tropic Bal strain. Recombinant luciferase-expressing single-cycle pseudotyped HIV-1 particles were made upon co-transfection of 293T cells with pNL4-3Luc⁺E⁻ (obtained from the AIDS Repository Reagent Program) and pHCMV-G as described previously (17). The latter molecular construct codes for the broad-host-range vesicular stomatitis virus envelope

glycoprotein G (VSV-G) under the control of the human cytomegalovirus promoter (73). Progeny viruses were also produced upon acute infection of purified CD4⁺ T cells for 7 days with the R5-tropic clinical HIV-1 isolate 93TH054 (obtained from the AIDS Repository Reagent Program). The virus-containing supernatants were filtered through a 0.22 µm cellulose acetate syringe filter and normalized for virion content using a homemade p24 test. In this enzymatic assay, 183-H12-5C and 31-90-25 antibodies are used in combination to quantify p24 levels (7).

Virus transfer experiments. IM-MDDCs (5×10^4 in 100 µl of culture medium) were either left untreated or treated with one of the studied TLR agonists for 2 h, washed twice and pulsed with virus preparations (2.5 ng of p24) for 1 h at 37°C. In some studies, Efavirenz (25 nM) was added to inhibit direct productive infection and left for 30 min before pulsing with viruses. Next, the virus-cell mixture was washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) to remove free virions. For estimating early HIV-1 transfer, IM-MDDCs were cocultured with autologous activated CD4⁺ T lymphocytes at a 1:2 ratio in complete RPMI-1640 medium supplemented with rhIL-2 (30 U/ml) in 96-well flat-bottom tissue culture plates in a final volume of 200 µl. Cell-free supernatants (half of the medium) were harvested 48 h following virus infection and kept frozen at -20°C. Virus production was estimated by measuring p24 levels in such culture supernatants.

Virus infection studies. IM-MDDCs (5×10^4 in 100 µl of culture medium) were either left untreated or treated with a TLR agonist for 2 h, washed twice and pulsed with virus preparations (2.5 ng of p24) for 1 h at 37°C. Next, the virus-cell mixture was washed twice

with PBS to remove free virions. Inverse kinetic was also performed where IM-MDDCs were first infected for 1 h and then stimulated with a TLR2 agonist. Thereafter, IM-MDDCs were cultured in complete RPMI 1640 medium in 96-well flat-bottom tissue culture plates in a final volume of 200 μ l. Supernatants (half of medium) were harvested either on day 3 (infection with NL4-3Balenv) or 5 (infection with 93TH054) following HIV-1 infection and kept at -20°C until assayed for p24 levels. For studies aimed at defining the contribution of type-I IFNs, the same experimental procedure was followed except that the medium was supplemented with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of B18R, a vaccinia virus-derived soluble receptor that blocks the effect of biologically functional type-I IFNs (e.g. IFN α , IFN β and IFN ω). In some experiments, IM-MDDCs were infected with VSV-G pseudotyped reporter virus (2.5 ng of p24) for 2 h and washed to remove free virions. Next, the virus-cell mixture was cultured for 48 h before stimulation with the TLR2 agonist for 2 h. Cells were then washed and luciferase activity was monitored 48 h later.

Quantification of IFN α/β . IM-MDDCs were either left untreated or treated for 2, 4 and 6 h with the TLR4 agonist LPS. Next, levels of IFN α/β in cell-free supernatants were determined through the use of HEK-BlueTM IFN α/β cells according to the manufacturer's protocol (InvivoGen). These cells allow the detection of bioactive IFN- α and IFN- β by monitoring the activation of the ISGF3 pathway. HEK-BlueTM IFN α/β cells are stably transfected with a SEAP promoter gene under the control of the IFN α/β -inducible ISG54 promoter. Stimulation of these cells with type-I IFNs activates the JAK/STAT/ISGF3 pathway and induces subsequently the secretion of SEAP in the supernatant. A standard

curve of IFN α ranging from 1 to 1,000 Units/ml was used to quantify the amounts of type-I IFNs released in the culture medium. Controls consisted of HEK-Blue™ IFN α / β cells exposed to IFN γ (100 Units).

Electrophoresis and western blotting. IM-MDDCs (5×10^6) were either left untreated or treated with a TLR agonist for 0, 2, 5, 15 and 30 min. For each time point, the equivalent of 2.5×10^4 cells was transferred into 2X sample buffer. Samples were boiled for 7 min and kept at -20°C until subjected to a western blot analysis. In brief, samples were loaded onto sodium dodecyl sulphate (SDS)-10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Proteins were then transferred to Immobilon membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Immunoblotting was performed first with anti-phospho-I κ B α (dilution 1:1000) overnight at 4°C . Next, the membrane was stripped and blotted with anti-I κ B α (dilution 1:1000) overnight at 4°C . To measure the amount of protein loaded in the gel, the membrane was stripped again and immunoblotted with anti-actin (dilution 1:5000) for 1 h at room temperature. Proteins were detected with an enhanced chemiluminescence reagent (Pierce) (7), followed by exposure to Kodak films.

Virus entry assay. IM-MDDCs (4.5×10^6 in 1.8 ml of culture medium) were either left untreated or treated with TLR2 or 4 agonist for 2 h and washed twice. Then, cells (5×10^5 in 200 μl of complete culture medium) were pulsed with HIV-1 (12.5 ng of p24) for 15, 30 and 60 min at 37°C . The virus-cell mixture was washed extensively with PBS and treated with trypsin to remove uninternalized virions. Finally, cells were lysed with 250 μl of lysis

buffer (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM and Triton 0.5%). Viral entry was estimated by measuring p24 levels in lysed cells.

Detection and quantification of integrated viral DNA copies. IM-MDDCs (3×10^6) were either left untreated or treated with the TLR2 agonist for 2 h and washed twice. Then, cells were pulsed with HIV-1 (5 ng of p24 per 1×10^5 cells) for 1 h and washed twice again. IM-MDDCs were cultured for 2 days. Then, genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Mississauga, ON). Integrated proviral DNA copies were quantified using a combined *Alu*-HIV-1 PCR and real-time PCR test as described by Suzuki and colleagues (62). Briefly, genomic DNA (100 ng) was first amplified with an *Alu*-sequence-specific sense primer and HIV-1-specific antisense primer (i.e., M661) (10). Next, 5 μ l of 25-fold diluted PCR products were subjected to a real-time PCR assay in 25 μ l reaction containing 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 μ M of the sense primer M667, 2 μ M of the antisense primer AA55, and 0.3 μ M of the TaqMan probe HIV-5'-carboxyfluorescein (Biosearch Technologies, Novato, USA). The cycling conditions, performing with Applied Biosystems 7500 sequence detection system, included a hot start (50°C for 2 min and 95°C for 10 min), followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 1 min) and extension (63°C for 1 min) with end point acquisition. NL4-3/*Balenv* DNA was used for the standard curve (i.e., from 469 to 30,000 copies). HIV-1 standards contain 1 ng of DNA from uninfected cells as carrier.

Statistical analysis. Statistical analyses were carried out according to the methods outlined in Zar and Sokal and Rohlf. Briefly, homoscedasticity was determined using the variance

ratio test and the means were compared using a single factor ANOVA followed by appropriate *post hoc* multiple comparisons (Tukey's or Dunnett's). P values lower than 0.01 were considered highly significant. Computations were carried out using GraphPad PRISM ® version 3.03 statistical software.

Results

In this study, we made use of agonists specific for various TLRs known to be expressed in DCs, namely Pam3Csk4 and LTA for TLR2, LPS for TLR4, flagellin for TLR5, R837 for TLR7, and bacteria-derived unmethylated DNA for TLR9. Our experiments were all performed with immature DCs because these cells have been proposed to be among the first potential targets that encounter HIV-1 during sexual transmission and also because productive infection is absent or very low in mature DCs. Importantly, IM-MDDCs were selected based on the observation that their characteristics resemble those of the different DC subsets found *in vivo* (e.g. mDCs, immature dermal DCs and interstitial DCs) (16, 31, 66), including their TLR expression patterns (30).

TLR2 triggering affects primarily de novo virus production in IM-MDDCs. To define whether TLR stimulation can affect HIV-1 transfer, IM-MDDCs were first treated with one of the tested TLR agonists before pulsing with the R5-using HIV-1 strain NL4-3/Balenv. Thereafter, the cell-virus mixture was cocultured with autologous CD4⁺ T cells for a short time period (i.e. 48 h) in order to measure primarily the early virus transfer phase. As depicted in Fig. 1A (left panel), transmission of HIV-1 was found to be increased following TLR2 stimulation, whereas a diminution was seen following engagement of TLR4. The DC-mediated propagation of HIV-1 was minimally affected by TLR5, 7 and 9 triggering. Similar patterns of HIV-1 transfer were obtained when experiments were conducted with multiple donors (Fig. 1A, right panel). Furthermore, although it is well accepted that primary HIV-1 infection is caused by R5-tropic viruses, some experiments were also

carried out with an X4 isolate of HIV-1 (i.e. NL4-3). A TLR2-mediated enhancement in virus transfer was also seen with the X4-tropic variant (Fig. 1B). The possible effect of the studied TLR agonists on cell viability was monitored using the fluorescent cytotoxic MTS assay. Cell viability was not affected by all the studied TLR ligands used at concentrations known to modulate DC-mediated transfer of HIV-1 (data not shown). Next, we evaluated whether the observed modulation of virus transfer could be attributable to some extent to *de novo* virus production by IM-MDDCs (i.e. late transfer). This issue was solved by adding the inhibitor of reverse transcription Efavirenz before pulsing IM-MDDCs with virions. Results illustrated in Fig. 1C indicate that TLR2/4-mediated signalling events are affecting primarily direct productive infection of IM-MDDCs (i.e. late transfer due to newly formed viral entities) since the efficiency of virus propagation is markedly affected upon treatment with Efavirenz.

To corroborate the role played by TLR2/4 triggering in late virus transfer, we measured the effect of TLR2 and 4 ligands upon acute virus infection of IM-MDDCs. Data shown in Fig. 2A (left panel) demonstrate that HIV-1 replication in IM-MDDCs is enhanced by TLR2 triggering and a small decrease is seen upon treatment with the TLR4 ligand, which is in agreement with our previous observations in transfer studies. Similar distribution patterns were obtained when acute HIV-1 infection studies were performed with IM-MDDCs from different donors (Fig. 2A, right panel). Again, flagellin (TLR5), R837 (TLR7) and unmethylated DNA (TLR9) showed no noticeable and consistent effect on HIV-1 replication. The TLR2-mediated increase in *de novo* virus production in IM-MDDCs cultured alone is no longer seen in presence of Efavirenz (data not shown), thus confirming

that the effect is primarily due to *cis* replication in the DC population. To provide additional *in vivo* significance to our findings and considering that Pam3Csk4 is a synthetic TLR2 agonist, we tested also the effect of the prototypic TLR2 agonist LTA that is isolated directly from *Staphylococcus aureus*. Results depicted in Fig. 2B illustrate that both TLR2 agonists (i.e. synthetic and isolated bacterial constituent) can increase virus production in IM-MDDCs. To more closely parallel natural conditions, acute infection experiments were conducted with a R5-tropic field isolate of HIV-1 (i.e. 93TH054). As shown in Fig. 3, both Pam3Csk4 and LTA were able to enhance HIV-1 replication in IM-MDDCs.

TLR2, 4 and 5 triggering results in nuclear translocation of NF- κ B. The transcription factor NF- κ B is recognized as a powerful inducer of HIV-1 transcription and gene expression due to the presence of two NF- κ B binding sites located within the enhancer domain. Therefore, we next studied the possible TLR2-, 4-, 5-, 7- and 9-mediated induction of NF- κ B by analyzing the phosphorylation state of I κ B α , a sign of NF- κ B activation. IM-MDDCs were stimulated with the studied TLR agonists for 0, 2, 5, 15 and 30 min and lysed. Phosphorylation and degradation of I κ B α were monitored by western blotting analyses. Data shown in Fig. 4 suggest that I κ B α is rapidly phosphorylated following TLR2, 4 and 5 triggering. For example, a band specific for the phosphorylated form of I κ B α is detected following a 5 min exposure of IM-MDDCs to the TLR2 agonist. This rapid I κ B α phosphorylation is accompanied by a rapid and extensive degradation of I κ B α at 5 and 15 min. A weaker but detectable phosphorylation of I κ B α was also seen upon engagement of TLR4, but this time, 15 min following treatment with the agonist. The

degradation of I κ B α was also delayed, as compared to TLR2 triggering, since the protein starts to disappear only 15 min after treatment. Furthermore, engagement of TLR5 resulted in a pattern of I κ B α phosphorylation and degradation comparable to the situation prevailing in the presence of TLR2 ligand. TLR7 and 9 triggering resulted in little impact on I κ B α , which is not surprising considering the reported low expression levels of TLR7 and 9 on the surface of IM-MDDCs (30, 57).

TLR2 triggering promotes an early step in HIV-1 replication. To provide information on the mechanism(s) by which TLR2 engagement can promote virus production, IM-MDDCs were either treated first with the TLR2 agonist prior to virus infection or, alternatively, pulsed first with HIV-1 before Pam3Csk4 treatment. As shown in Fig. 5A, a TLR2-mediated enhancement of virus replication was seen only when stimulation took place before HIV-1 infection, thus suggesting that the signalling cascade triggered by the agonist acts most likely on the early steps in the virus life cycle. To confirm that TLR2 triggering is not affecting more downstream events in HIV-1 replication (i.e. subsequent to integration), IM-MDDCs were infected with single-cycle reporter virus pseudotyped with VSV-G for a time period sufficient to allow integration within host genome of the viral genetic material (i.e. 48 h) (53). The use of such viruses prevents re-infection events and bypasses the natural mode of HIV-1 entry (namely via a CD4- and CCR5- or CXCR4-dependent pathway) (36). Thereafter, cells were treated with Pam3Csk4 before monitoring the virus-directed luciferase activity. Results from Fig. 5B demonstrate that integrated viral DNA is not activated upon engagement of TLR2, thus corroborating that TLR2 triggering is primarily affecting an early event in the virus life cycle (i.e. before virus integration).

To shed light on the mechanism(s) by which TLR2 triggering can promote *de novo* virus production, the extent of virus entry was quantified in IM-MDDCs. Data displayed in Fig. 6 indicate that virus internalization is increased by both TLR2 and 4 agonists as compared to untreated cells. Given that integration of HIV-1 DNA is essential both for productive viral replication and for viral persistence in patients, we next quantified the amount of integrated viral DNA using a quantitative real-time PCR assay. Results displayed in Fig. 7 indicate that treatment of IM-MDDCs with a TLR2 agonist increases integration of proviral DNA within the host chromosome.

TLR4 stimulation induces secretion of type-I IFNs. Knowing that TLR4 stimulation can lead to secretion of type-I IFNs (i.e. IFN- α and IFN- β), we next wanted to see whether the observed TLR4-dependent diminution in virus replication was attributable to this antiviral agent. We made use of the soluble vaccinia virus-encoded protein B18R, which can inhibit the antiviral activity and cellular binding of the type-I IFNs. Results depicted in Fig. 8A demonstrate that the TLR4-mediated reduction in *de novo* virus production seen in IM-MDDCs is indeed associated with secretion of type-I IFNs. To corroborate the participation of type-I IFNs in the LPS-dependent modulatory effect on virus production in IM-MDDCs, we performed an additional series of investigations with HEK-Blue™ IFN α/β cells. Results depicted in Fig. 8B demonstrate that, as expected, the TLR4 ligand LPS acts as a strong inducer of IFN α/β in IM-MDDCs.

Discussion

It has been demonstrated that capture of HIV-1 by mDCs can result in several distinct processes that can occur concurrently. For example, a cytosolic delivery of viral material can take place, a phenomenon leading to productive infection (39, 40). Alternatively, incoming virions can either remain in an infectious state within intracellular vesicles for a subsequent transmission through the virological synapse (4, 19, 52) or be degraded by lysosomal enzymes inside the endosomal machinery (67). There is also evidence that some viruses can remain associated in membrane protrusions and microvilli found in the plasma membrane of DCs (8). Therefore it is expected that exposure of immature DCs to stimuli such as microbial-derived PAMPs might influence the uptake pathway and eventual fate of HIV-1 in these cells.

In the present study, we first assessed the capacity of TLR2, 4, 5, 7 and 9 ligands to modulate the early transfer of HIV-1 from IM-MDDCs to CD4⁺ T cells. This type of transfer occurs when viruses either trapped into endosomal compartments or adsorbed onto the plasma membrane due to interactions with several cell surface receptors like DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-DIGN) (4, 19, 68) or syndecan-3 (12) are released into the synaptic space between IM-MDDCs and CD4⁺ T cells. We found that the TLR2 agonist Pam3Csk4 increases the early HIV-1 transfer phase from IM-MDDCs to autologous CD4⁺ T cells, whereas the process remains almost unaffected upon TLR5, 7 and 9 triggering. In contrast, TLR4 engagement leads to a reduction in DC-mediated propagation. Our findings are perfectly in line with a recent study showing that the TLR2

ligand Pam3Csk4 strongly enhanced HIV-1 transmission by Langerhans cells (11). However, the TLR2-mediated increased virus transmission by Langerhans cells was due to a more important HIV1 capture and not to a superior virus replication in this cell type as we demonstrate here in the present work.

To define the exact contribution of *de novo* virus production from DCs in the TLR2-dependent effect on HIV-1 transfer, coculture experiments were performed in presence of the reverse transcriptase inhibitor Efavirenz. The efficient transmission of surface-bound virions as well as viruses concentrated in endosomal vacuoles are unaffected by this antiretroviral agent. According to our results, it can be proposed that TLR2 triggering is mostly affecting the direct productive infection of IM-MDDCs with HIV-1 since treatment with Efavirenz reduced the level of viral transfer close to that observed for cells left untreated with the tested TLR ligands. Acute infection studies in IM-MDDCs confirmed that TLR2 engagement is modulating primarily *de novo* virus production in this cell type. These results are consistent with findings published by Zhang and colleagues who have demonstrated that HIV-1 replication in IM-MDDCs is promoted following engagement of TLR2 with *Neisseria gonorrhoea* (74). The TLR2-mediated enhancement of virus transfer is not completely abolished by Efavirenz, thus suggesting that the early transfer phase is also modulated by TLR2 triggering but at a lower level. With regard to the possible contribution of TLR4 to shaping interactions between HIV-1 and DCs, the interpretation is less evident but overall it seems that TLR4 engagement slightly influences the early transfer and also affects *de novo* virus production by IM-MDDCs since Efavirenz diminished HIV-1 transmission to a level lower than in cells left untreated with the studied TLR ligand.

The validity and clinical relevance of our findings were provided by three sets of experiments. First, the TLR2-mediated augmentation in virus production was detected when using both a synthetic (i.e. Pam3Csk4) and more natural TLR2 agonist (i.e. LTA). Second, similar findings were made when viral infection studies were carried out with a field isolate of HIV-1. Third, the TLR2-dependent up-regulatory effect on HIV-1 propagation was seen with both R5- and X4-using virions and virus production was even more important with X4-tropic viruses. This observation seems surprising since X4 virus replicates at a lower level in DCs compared to R5 isolates. However, it should be noted that CD4⁺ T cells express higher surface levels of CXCR4 than CCR5. Moreover, virus production was assessed at an early time point following initiation of coculture and, therefore, our virus transfer studies measure primarily transmission of endocytosed virus and not transfer of virus produced by infected IM-MDDCs.

Sensing PAMPs through TLRs usually triggers signalling cascades resulting in the activation of the transcription factor NF- κ B and the induction of proinflammatory responses which are required to fight the invaders. It is well known that induction of NF- κ B drives HIV-1 transcription and production of newly synthesized virions in both CD4⁺ T lymphocytes and monocytes/macrophages (reviewed in (48, 56)). Although the exact role played by NF- κ B in the process of acute HIV-1 infection of IM-MDDCs remains unclear, we hypothesized that it is the same for all myeloid lineage cells. In order to define if the tested TLR agonists can trigger signalling cascades resulting in NF- κ B activation, we measured phosphorylation and ensuing degradation of the natural repressor of NF- κ B, i.e.

I κ B α . Our results indicate that I κ B α is rapidly phosphorylated following TLR2 stimulation. Although DC-mediated virus transfer was not modulated upon TLR5 triggering, a potent induction of NF- κ B was seen following ligation of TLR5. It can thus be proposed that there is no direct relationship between these two events. This postulate is confirmed by our findings that TLR4 signalling results in a quite different outcome since a reduced HIV-1 propagation was detected concomitantly with an induction of NF- κ B. This observation is not surprising considering that TLR4 stimulation can activate pathways resulting in both NF- κ B activation and secretion of type-I IFNs (5, 63). Interestingly, it has been established that exposure of macrophages to LPS or gonococcal lipooligosaccharide reduces HIV-1 replication through a mechanism relying on production of type-I IFNs (35, 58, 64). We showed here the direct involvement of type-I IFNs in TLR4-dependent decrease in HIV-1 replication through the use of the recombinant B18R protein and HEK-Blue™ IFN α / β cells. Data from studies performed with B18R suggest that secretion of type-I IFNs, which is seen following TLR4 triggering, may counteract the likely positive effect of NF- κ B on virus gene expression.

Considering the up-regulatory effect of NF- κ B with regard to HIV-1 transcription and the potent induction of this transactivator by TLR2 stimulation, we thought that the TLR2-mediated augmentation in *de novo* virus production by IM-MDDCs would be similar if TLR2 triggering would occur after viral uptake. Surprisingly, virus production was not affected under such experimental conditions. This suggests that engagement of TLR2 in IM-MDDCs carrying integrated viral DNA is not sufficient *per se* to drive HIV-1 gene

expression and therefore the signal transduction pathway that is engaged following TLR2 occupancy is affecting an early event in the replicative cycle of HIV-1 (i.e. prior to integration or integration).

In an attempt to shed light on the exact mechanism(s) by which TLR2 triggering can increase HIV-1 productive infection of IM-MDDCs, we performed viral entry assays. We found that internalization of HIV-1 within IM-MDDCs was augmented upon treatment with TLR2 and 4 agonists. It can be postulated that the TLR4-mediated increase in HIV-1 entry is totally neutralized by secretion of $\text{IFN}\alpha/\beta$. With regard to the TLR2-mediated enhancement in virus entry, several hypotheses can be proposed. Previous studies have revealed that HIV-1 entry into DCs can result either in cytosolic delivery that leads to productive infection (39, 40), preservation into intracellular vesicles in an infectious state for a subsequent transmission through the virological synapse (4, 19, 52), or degradation by lysosomal enzymes in the endosomal compartments (67). It can be proposed that the route of virus entry is affected upon TLR2 triggering. Knowing that the vast majority of viruses entering DCs is degraded rapidly (i.e. up to 95%) (18, 45, 47, 67, 70), it is possible that TLR2 stimulation increases the overall percentage of virions that can evade the degradation process by a yet to be defined mechanism. Alternatively, it can also be postulated that TLR2 triggering prior to virus exposure favors HIV-1 entry through a pH-independent fusion of viral and cellular membranes. It is known that this mechanism of HIV-1 internalization into target cells results in productive infection (39, 40, 51). Interestingly, a previous study has shown that TLR2 engagement by a bacterial product results in recruitment of this pattern-recognition receptor within specialized microdomains called

lipid rafts (65). The lateral diffusion of TLR2 inside lipid rafts might result in a more efficient virus entry through such specific microdomains, which are recognized as a significant portal of entry for a broad range of pathogens including HIV-1 (25, 34, 38, 55, 69). The possibility that TLR2 triggering is positively affecting the early steps of HIV-1 infection in IM-MDDCs is confirmed by measurements of integrated viral DNA copies.

Under physiological conditions, mDCs are localized in mucosa-like genital and intestinal tracts and act as sentinels to prevent host invasion by certain pathogens. Upon a physical contact with an invader carrying PAMPs, mDCs become activated and migrate to the most proximal lymph nodes to prime CD4⁺ T cells. The recognition of PAMPs by the appropriate TLRs triggers an intracellular signalling pathway, which culminates in secretion of proinflammatory cytokines, chemokines and type-I IFNs (e.g. IFN- α and IFN- β) and maturation of DCs (24). The genital mucosa is often in contact with external pathogens like *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Treponema pallidum*, which respectively cause gonorrhoea, chlamydial infection and syphilis. Normally, resident flora of the vaginal mucosa is constituted primarily of lactobacilli that contribute to the equilibrium of the vagina flora by inhibiting harmful bacteria. However, when this equilibrium is broken (often following a pH decrease), the amount of lactobacilli is reduced and pathogenic bacteria will prevail. This phenomenon is common and results in a pathological condition called bacterial vaginosis (BV) (21). This type of vaginosis is the most widespread and about 50% of women are susceptible to this particular type of infection. It should be noted that BV is associated with an increased risk for contracting HIV-1 infection and several other sexually transmitted infections, including herpes simplex

virus type 2 (HSV-2) (9, 41, 59). Moreover, BV is associated with increased levels of proinflammatory cytokines (e.g. IL-1 β and IL-8) and these cytokines induce the secretion of other proinflammatory cytokines or recruit other immune cells, thus possibly increasing the number of cells permissive for HIV-1 infection (13, 61). Knowing this, it can be hypothesized that such bacteria-derived TLR ligands as well as others pathogen-encoded TLR agonists can modulate HIV-1 propagation by mDCs.

In summary, this work provides new insights into the complex interconnections between HIV-1 and DCs. Our results reveal that some members of the TLR family can modulate the multifaceted interactions that are established between HIV-1 and DCs.

Acknowledgments

This work was supported by an operating grant to M.J.T. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) under the HIV/AIDS research program (grant MOP-79542). S.T. is the recipient of a Doctoral Award from the CIHR HIV/AIDS Research Program while M.J.T. holds the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (Tier 1 level). This study was performed by S.T. in partial fulfillment of her Ph.D. degree in the Microbiology-Immunology Program, Faculty of Medicine, Laval University. The authors wish to thank Sylvie Méthot for her technical assistance in writing this manuscript. None of the authors has potential conflicts of interest concerning the submitted material.

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. **Akashi-Takamura, S., and K. Miyake.** 2006. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *J Infect Chemother* **12**:233-40.
3. **Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
4. **Arrighi, J. F., M. Pion, E. Garcia, J. M. Escola, Y. van Kooyk, T. B. Geijtenbeek, and V. Piguet.** 2004. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* **200**:1279-88.
5. **Asselin-Paturel, C., and G. Trinchieri.** 2005. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med* **202**:461-5.
6. **Baca-Regen, L., N. Heinzinger, M. Stevenson, and H. E. Gendelman.** 1994. Alpha interferon-induced antiretroviral activities: restriction of viral nucleic acid synthesis and progeny virion production in human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes. *J Virol* **68**:7559-65.

7. **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.
8. **Cavrois, M., J. Neidleman, J. F. Kreisberg, and W. C. Greene.** 2007. In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathog* **3**:e4.
9. **Cherpes, T. L., L. A. Meyn, M. A. Krohn, J. G. Lurie, and S. L. Hillier.** 2003. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* **37**:319-25.
10. **Chun, T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, and A. S. Fauci.** 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13193-7.
11. **de Jong, M. A., L. de Witte, M. J. Oudhoff, S. I. Gringhuis, P. Gallay, and T. B. Geijtenbeek.** 2008. TNF-alpha and TLR agonists increase susceptibility to HIV-1 transmission by human Langerhans cells ex vivo. *J Clin Invest* **118**:3440-3452.
12. **de Witte, L., M. Bobardt, U. Chatterji, G. Degeest, G. David, T. B. Geijtenbeek, and P. Gallay.** 2007. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:19464-9.

13. **Dinarelo, C. A.** 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**:2095-147.
14. **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**:10-6.
15. **Drakes, M., T. Blanchard, and S. Czinn.** 2004. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun* **72**:3299-309.
16. **Ebner, S., Z. Ehammer, S. Holzmann, P. Schwingshackl, M. Forstner, P. Stoitzner, G. M. Huemer, P. Fritsch, and N. Romani.** 2004. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol* **16**:877-87.
17. **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.
18. **Garcia, E., M. Pion, A. Pelchen-Matthews, L. Collinson, J. F. Arrighi, G. Blot, F. Leuba, J. M. Escola, N. Demaurex, M. Marsh, and V. Piguet.** 2005. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* **6**:488-501.

19. **Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-97.
20. **Gilbert, C., C. Barat, R. Cantin, and M. J. Tremblay.** 2007. Involvement of Src and Syk tyrosine kinases in HIV-1 transfer from dendritic cells to CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* **178**:2862-71.
21. **Gordon, M. A., A. L. Walsh, M. Chaponda, D. Soko, M. Mbwini, M. E. Molyneux, and S. B. Gordon.** 2001. Bacteraemia and mortality among adult medical admissions in Malawi--predominance of non-typhi salmonellae and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect* **42**:44-9.
22. **Granelli-Piperno, A., E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, and R. M. Steinman.** 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**:2733-7.
23. **Granelli-Piperno, A., V. Finkel, E. Delgado, and R. M. Steinman.** 1999. Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Curr Biol* **9**:21-9.

24. **Granucci, F., and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2003. Interactions of bacterial pathogens with dendritic cells during invasion of mucosal surfaces. *Curr Opin Microbiol* **6**:72-6.
25. **Guyader, M., E. Kiyokawa, L. Abrami, P. Turelli, and D. Trono.** 2002. Role for human immunodeficiency virus type 1 membrane cholesterol in viral internalization. *J Virol* **76**:10356-64.
26. **Haase, A. T.** 2005. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol* **5**:783-92.
27. **Hansen, B. D., P. L. Nara, R. K. Maheshwari, G. S. Sidhu, J. G. Bernbaum, D. Hoekzema, M. S. Meltzer, and H. E. Gendelman.** 1992. Loss of infectivity by progeny virus from alpha interferon-treated human immunodeficiency virus type 1-infected T cells is associated with defective assembly of envelope gp120. *J Virol* **66**:7543-8.
28. **Hopkins, P. A., and S. Sriskandan.** 2005. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* **140**:395-407.
29. **Hu, J., M. B. Gardner, and C. J. Miller.** 2000. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol* **74**:6087-95.

30. **Iwasaki, A., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**:987-95.
31. **Jameson, B., F. Baribaud, S. Pohlmann, D. Ghavimi, F. Mortari, R. W. Doms, and A. Iwasaki.** 2002. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* **76**:1866-75.
32. **Janeway, C. A., Jr.** 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**:1-13.
33. **Kornbluth, R. S., P. S. Oh, J. R. Munis, P. H. Cleveland, and D. D. Richman.** 1990. The role of interferons in the control of HIV replication in macrophages. *Clin Immunol Immunopathol* **54**:200-19.
34. **Liao, Z., L. M. Cimakasky, R. Hampton, D. H. Nguyen, and J. E. Hildreth.** 2001. Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:1009-19.
35. **Liu, X., A. Mosoian, T. Li-Yun Chang, B. Zerhouni-Layachi, A. Snyder, G. A. Jarvis, and M. E. Klotman.** 2006. Gonococcal lipooligosaccharide suppresses HIV infection in human primary macrophages through induction of innate immunity. *J Infect Dis* **194**:751-9.

36. **Luo, T., J. L. Douglas, R. L. Livingston, and J. V. Garcia.** 1998. Infectivity enhancement by HIV-1 Nef is dependent on the pathway of virus entry: implications for HIV-based gene transfer systems. *Virology* **241**:224-33.
37. **Makimura, Y., Y. Asai, Y. Taiji, A. Sugiyama, R. Tamai, and T. Ogawa.** 2006. Correlation between chemical structure and biological activities of *Porphyromonas gingivalis* synthetic lipopeptide derivatives. *Clin Exp Immunol* **146**:159-68.
38. **Manes, S., G. del Real, R. A. Lacalle, P. Lucas, C. Gomez-Mouton, S. Sanchez-Palomino, R. Delgado, J. Alcami, E. Mira, and A. C. Martinez.** 2000. Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep* **1**:190-6.
39. **Marechal, V., F. Clavel, J. M. Heard, and O. Schwartz.** 1998. Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**:2208-12.
40. **Marechal, V., M. C. Prevost, C. Petit, E. Perret, J. M. Heard, and O. Schwartz.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* **75**:11166-77.
41. **Martin, H. L., B. A. Richardson, P. M. Nyange, L. Lavreys, S. L. Hillier, B. Chohan, K. Mandaliya, J. O. Ndinya-Achola, J. Bwayo, and J. Kreiss.** 1999. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* **180**:1863-8.

42. **McDonald, D., L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, and T. J. Hope.** 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* **300**:1295-7.
43. **Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr.** 1998. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* **10**:351-3.
44. **Mellman, I., and R. M. Steinman.** 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**:255-8.
45. **Moris, A., A. Pajot, F. Blanchet, F. Guivel-Benhassine, M. Salcedo, and O. Schwartz.** 2006. Dendritic cells and HIV-specific CD4⁺ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood* **108**:1643-51.
46. **Nishiguchi, M., M. Matsumoto, T. Takao, M. Hoshino, Y. Shimonishi, S. Tsuji, N. A. Begum, O. Takeuchi, S. Akira, K. Toyoshima, and T. Seya.** 2001. *Mycoplasma fermentans* lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J Immunol* **166**:2610-6.
47. **Nobile, C., C. Petit, A. Moris, K. Skrabal, J. P. Abastado, F. Mammano, and O. Schwartz.** 2005. Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J Virol* **79**:5386-99.

48. **Palmieri, C., F. Trimboli, A. Puca, G. Fiume, G. Scala, and I. Quinto.** 2004. Inhibition of HIV-1 replication in primary human monocytes by the IkappaB-alphaS32/36A repressor of NF-kappaB. *Retrovirology* **1**:45.
49. **Palucka, K., and J. Banchereau.** 2002. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* **14**:420-31.
50. **Patterson, S., and S. C. Knight.** 1987. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* **68 (Pt 4)**:1177-81.
51. **Pauza, C. D., and T. M. Price.** 1988. Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **107**:959-68.
52. **Piguet, V., and Q. Sattentau.** 2004. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* **114**:605-10.
53. **Pion, M., R. Stalder, R. Correa, B. Mangeat, G. J. Towers, and V. Piguet.** 2007. Identification of an arsenic-sensitive block to primate lentiviral infection of human dendritic cells. *J Virol* **81**:12086-90.
54. **Poli, G., J. M. Orenstein, A. Kinter, T. M. Folks, and A. S. Fauci.** 1989. Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science* **244**:575-7.

55. **Popik, W., T. M. Alce, and W. C. Au.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* **76**:4709-22.
56. **Rohr, O., C. Marban, D. Aunis, and E. Schaeffer.** 2003. Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells. *J Leukoc Biol* **74**:736-49.
57. **Saikh, K. U., T. L. Kissner, A. Sultana, G. Ruthel, and R. G. Ulrich.** 2004. Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J Immunol* **173**:7426-34.
58. **Simard, S., E. Maurais, C. Gilbert, and M. J. Tremblay.** 2008. LPS reduces HIV-1 replication in primary human macrophages partly through an endogenous production of type I interferons. *Clin Immunol*.
59. **Spear, G. T., E. P. St John, and M. R. Zariffard.** 2007. Bacterial vaginosis and human immunodeficiency virus infection. *AIDS Res Ther* **4**:25.
60. **Spira, A. I., P. A. Marx, B. K. Patterson, J. Mahoney, R. A. Koup, S. M. Wolinsky, and D. D. Ho.** 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**:215-25.
61. **St John, E., D. Mares, and G. T. Spear.** 2007. Bacterial vaginosis and host immunity. *Curr HIV/AIDS Rep* **4**:22-8.

62. **Suzuki, Y., N. Misawa, C. Sato, H. Ebina, T. Masuda, N. Yamamoto, and Y. Koyanagi.** 2003. Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1 DNA dynamics by real-time PCR: integration efficiency in stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virus Genes* **27**:177-88.
63. **Takeda, K., and S. Akira.** 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* **16**:3-9.
64. **Tilton, J. C., A. J. Johnson, M. R. Luskin, M. M. Manion, J. Yang, J. W. Adelsberger, R. A. Lempicki, C. W. Hallahan, M. McLaughlin, J. M. Mican, J. A. Metcalf, C. Iyasere, and M. Connors.** 2006. Diminished production of monocyte proinflammatory cytokines during human immunodeficiency virus viremia is mediated by type I interferons. *J Virol* **80**:11486-97.
65. **Triantafilou, M., S. Morath, A. Mackie, T. Hartung, and K. Triantafilou.** 2004. Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J Cell Sci* **117**:4007-14.
66. **Turville, S. G., P. U. Cameron, A. Handley, G. Lin, S. Pohlmann, R. W. Doms, and A. L. Cunningham.** 2002. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* **3**:975-83.
67. **Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stossel, N. Romani, M. Piatak, Jr., J. D. Lifson, M. Pope, and A. L. Cunningham.** 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* **103**:2170-9.

68. **van Kooyk, Y., and T. B. Geijtenbeek.** 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* **3**:697-709.
69. **Viard, M., I. Parolini, M. Sargiacomo, K. Fecchi, C. Ramoni, S. Ablan, F. W. Ruscetti, J. M. Wang, and R. Blumenthal.** 2002. Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J Virol* **76**:11584-95.
70. **Wang, J. H., A. M. Janas, W. J. Olson, and L. Wu.** 2007. Functionally distinct transmission of human immunodeficiency virus type 1 mediated by immature and mature dendritic cells. *J Virol* **81**:8933-43.
71. **Willment, J. A., and G. D. Brown.** 2008. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol* **16**:27-32.
72. **Wu, L., and V. N. KewalRamani.** 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* **6**:859-68.
73. **Yee, J. K., A. Miyanohara, P. LaPorte, K. Bouic, J. C. Burns, and T. Friedmann.** 1994. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9564-8.

74. **Zhang, J., G. Li, A. Bafica, M. Pantelic, P. Zhang, H. Broxmeyer, Y. Liu, L. Wetzler, J. J. He, and T. Chen.** 2005. *Neisseria gonorrhoeae* enhances infection of dendritic cells by HIV type 1. *J Immunol* **174**:7995-8002.
75. **Zhang, Y., K. Nakata, M. Weiden, and W. N. Rom.** 1995. *Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication by transcriptional activation at the long terminal repeat. *J Clin Invest* **95**:2324-31.

Figures legends

Figure 1. TLR2/4 triggering modulates HIV-1 transfer between IM-MDDCs and CD4⁺ T cells. A) IM-MDDCs were either left untreated (mock) or stimulated for 2 h with the following TLR agonists: Pam3Csk4 (5 µg/ml), LPS (0.1 µg/ml), flagellin (5 µg/ml), R837 (5 µg/ml) and unmethylated DNA (5 µg/ml). Cells were then pulsed with NL4-3/Balenv and cocultured with autologous CD4⁺ T cells. Finally cell-free supernatants were harvested 48 h following initiation of the coculture and the viral content was assessed by a p24 assay. Data depicted in the left panel represent the mean ± standard deviations of quadruplicate samples from a representative single donor, whereas results from multiple different donors are illustrated in the right panel. B) A similar experimental approach was used except that transfer studies were carried out with X4- (NL4-3) and R5-tropic virions (NL4-3/Balenv). Data shown represent the mean ± standard deviations of quadruplicate samples and are representative of 3 different donors. C) IM-MDDCs were initially either left untreated or treated with Efavirenz. Thereafter, cells were treated as described in panel A. Data shown represent the mean ± standard deviations of quadruplicate samples from a single donor and are representative of 8 distinct donors.

Figure 2. De novo virus production in IM-MDDCs is affected by TLR2/4 engagement. (A) IM-MDDCs were either left untreated (mock) or stimulated for 2 h with the listed TLR agonists. Thereafter, cells were washed twice and pulsed with NL4-3/Balenv. Supernatants were harvested 72 h post-infection and the viral content evaluated by a p24 test. Data depicted in the left panel represent the mean ± standard deviations of quadruplicate samples

from a representative single donor, whereas results from multiple different donors are illustrated in the left panel. (B) A similar experimental strategy was used except that cells were either left untreated or exposed to the listed TLR2 ligands. Data shown represent the mean \pm standard deviations of quadruplicate samples from two different donors.

Figure 3. TLR2 agonists increase replication of a clinical variant of HIV-1 in IM-MDDCs. Cells were either left untreated (mock) or stimulated for 2 h with the listed TLR2 agonists. Thereafter, cells were washed twice and pulsed with the clinical HIV-1 isolate 93TH054. Supernatants were harvested at 5 days post-infection and the viral content evaluated by a p24 test. The data shown represent the mean of quadruplicate samples from 2 different donors.

Figure 4. NF- κ B is activated in IM-MDDCs following TLR2, 4 and 5 triggering. Cells were either left untreated (mock) or stimulated for 0, 2, 5, 15 and 30 min with the listed TLR ligands. Cells were then lysed and proteins were loaded on a 12% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a membrane, and revealed by anti-phospho-I κ B α , anti-I κ B α , or anti-actin. Data from a single donor representative of 4 different donors are displayed.

Figure 5. TLR2 stimulation influences an early step in HIV-1 life cycle. A) IM-MDDCs were either left untreated (mock) or stimulated for 2 h with the TLR2 agonist Pam3Csk4 (5 μ g/ml) before or after exposure for 1 h to NL4-3/Balenv. Supernatants were harvested 72 h post-infection and the viral content was evaluated by a p24 test. B) Cells were infected with VSV-G pseudotyped reporter viruses for 2 h, washed twice and put in culture for 48 h. Next, IM-MDDCs were either left untreated (mock) or stimulated for 2 h with the TLR2

ligand. Cells were then washed twice, cultured for 48 h and lysed to monitor luciferase activity (expressed in relative light units/RLU). The data shown represent the mean \pm standard deviations of quadruplicate samples from a single donor representative of 3 distinct donors.

Figure 6. TLR2 and 4 triggering increases viral entry in IM-MDDCs. A) IM-MDDCs were either left untreated (mock) or treated with TLR2 and 4 ligands for 2 h and washed twice. Then, cells were pulsed with NL4-3/Balenv for 15, 30 and 60 min at 37°C. Next, the virus-cell mixture was washed extensively with PBS and trypsinized to remove uninternalized virus. Finally, cells were lysed and the p24 contents were measured by ELISA. The data shown represent the mean \pm standard deviations of triplicate samples from 3 different donors. (B) Results are depicted as fold increase relative to p24 levels in untreated control cells (considered as 1).

Figure 7. HIV-1 integration is increased in IM-MDDCs following TLR2 stimulation. IM-MDDCs were either left untreated (mock) or stimulated for 2 h with the TLR2 ligand Pam3Csk4. Cells were then washed twice and pulsed with NL4-3/Balenv. IM-MDDCs were cultured for 2 days. At this time, DNA was isolated and used for the detection and quantification of integration events using a real-time PCR test. The data shown represent the mean \pm standard deviations of triplicate samples from two distinct donors. Results are depicted as fold increase over unstimulated cells (considered as 1).

Figure 8. TLR4-mediated decrease in de novo virus production involves type-I IFNs. A) IM-MDDCs were either left untreated (mock) or stimulated for 2 h with the TLR4 ligand

LPS. Cells were then washed twice and pulsed with NL4-3/*Balenv*. IM-MDDCs were cultured in absence or presence of B18R (0.1 $\mu\text{g/ml}$). Supernatants were harvested at 72 h post-infection and the viral content evaluated by a p24 test. The data shown represent the mean \pm standard deviations of quadruplicate samples from a single donor representative of 4 different donors. B) IM-MDDCs were either left untreated (mock) or stimulated for 2, 4 and 6 h with the TLR4 ligand LPS or $\text{IFN}\gamma$. Cell-free supernatants were harvested and the levels of $\text{IFN}\alpha/\beta$ were quantified through the use of HEK-Blue™ $\text{IFN}\alpha/\beta$ cells. The data shown represent the mean \pm standard deviations of quadruplicated samples from 3 different donors.

Figure 1.

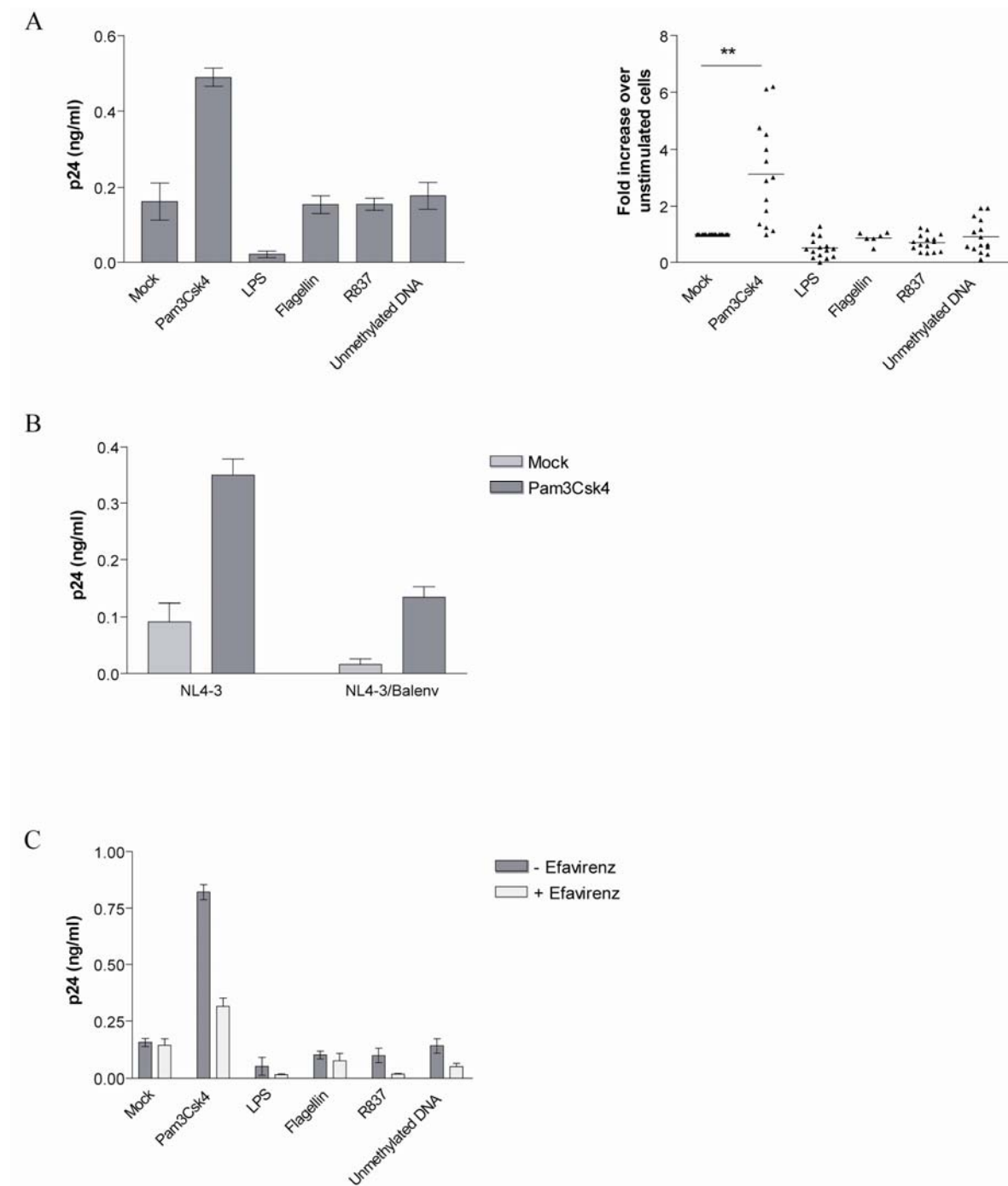


Figure 2.

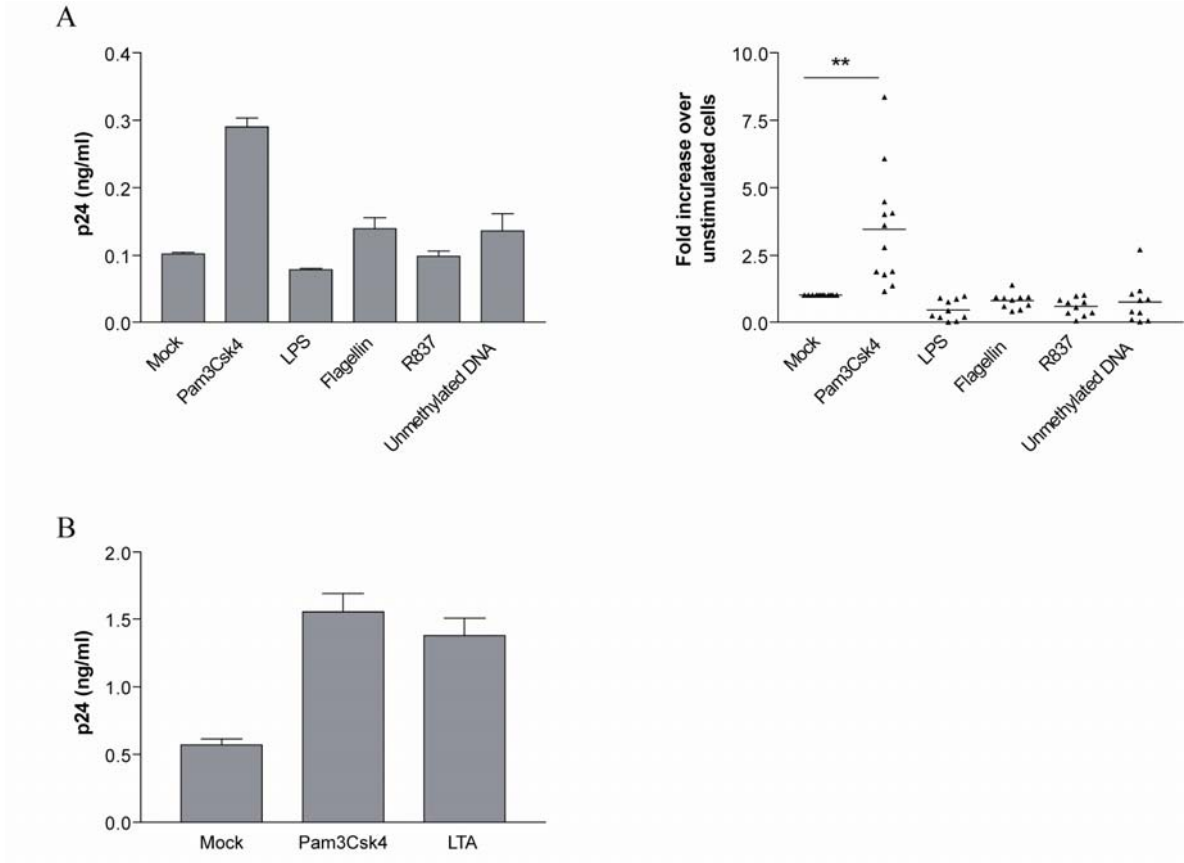


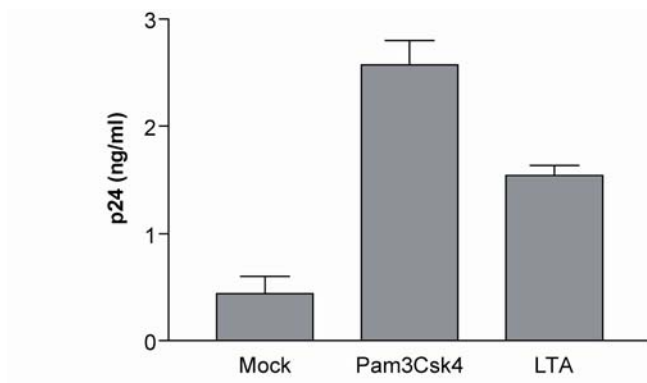
Figure 3.

Figure 5.

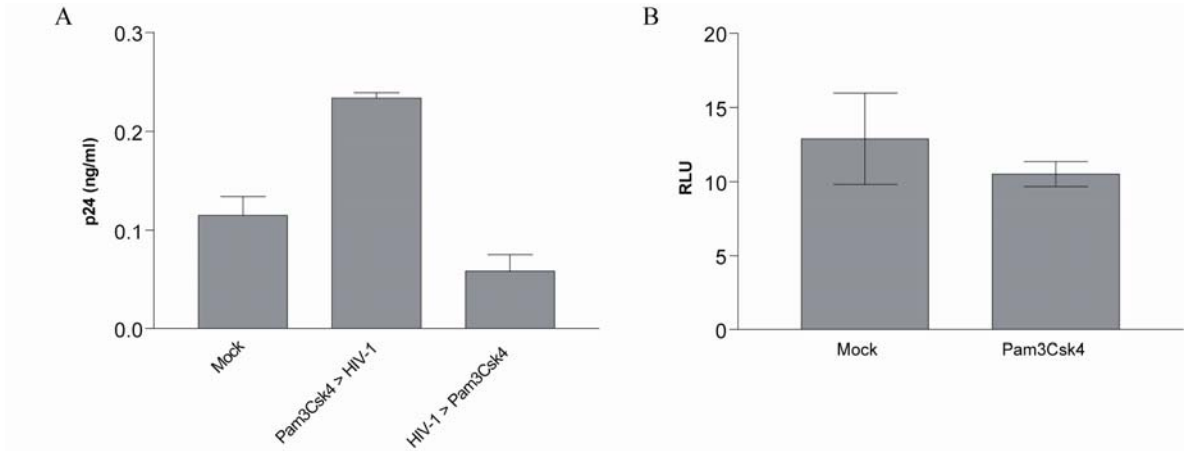
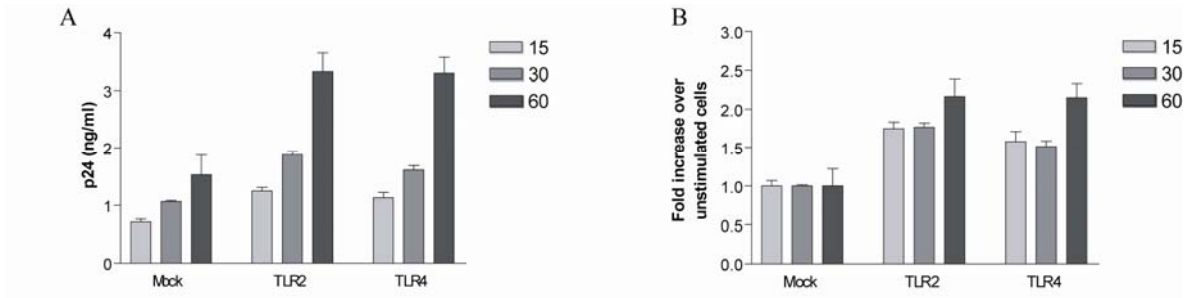


Figure 6.



Chapitre VI. La stimulation du TLR5 est suffisante pour activer NF- κ B et réactiver les provirus VIH-1 latents dans les lymphocytes T CD4+

Ce chapitre a été soumis pour publication dans la revue *Journal of Infectious Diseases* et est constitué de la version soumise.

6.1 Résumé

Lorsque les lymphocytes T CD4+ effecteurs contenant des provirus VIH-1 intégrés reviennent à un état de cellule mémoire quiescente, le virus peut demeurer silencieux dans ces cellules pendant des années. Suivant la ré-exposition à un antigène ou en réponse à d'autres stimuli (cytokines pro-inflammatoires), ces cellules peuvent alors produire du virus. Nous démontrons ici que la stimulation du TLR5 entraîne l'activation de NF- κ B et réactive les VIH-1 latents dans les cellules T CD4+. Cette étude supporte l'hypothèse que la translocation de microbes qui engagent les récepteurs Toll-like peut jouer un rôle important dans l'activation immune chronique observée chez les patients VIH-1 et peut ainsi promouvoir la réplication du virus et sa dissémination.

6.2 Article

TLR5 Stimulation is Sufficient to Activate NF- κ B and Trigger Reactivation of Latent HIV-1 Provirus in CD4⁺ T Cells

Sandra Thibault, Michaël Imbeault, Mélanie R. Tardif and Michel J. Tremblay*

*Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval,
and Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada, G1V 4G2*

Running title: TLR5 triggering activates latent HIV-1 expression

Keywords: HIV-1, T cells, Latency, TLR

Abstract: 100 words; Text: 1,493 words

*Corresponding author, mailing address:

Laboratoire d'Immuno-Rétrovirologie Humaine

Centre de Recherche en Infectiologie, RC709

2705 Boulevard Laurier, Québec (QC), Canada, G1V 4G2

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

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

Abstract

When effector CD4⁺ T cells carrying integrated HIV-1 proviruses revert back to a resting memory state, the virus can remain silent in those cells for years. Following re-exposure to the nominal antigen or in response to other stimuli (e.g. proinflammatory cytokines), these cells can begin to produce virus. Here we demonstrate that TLR5 stimulation triggers activation of NF- κ B and reactivates latent HIV-1 in CD4⁺ T cells. This study supports the hypothesis that translocation of microbes that can engage pathogens recognition receptors might play a dominant role in chronic immune activation seen in HIV-1-infected individuals and promote virus replication and dissemination.

Replication of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) is intimately linked with the activation status of target cells. Ligation of both T-cell receptor (TCR)/CD3 complex and CD28 triggers different signaling pathways, which culminates in the activation of transcription factors such as nuclear factor- κ B (NF- κ B), nuclear factor for activated T cells (NFAT), and activator protein-1 (AP-1) (3, 11, 17). NF- κ B is one of the main cellular mediators of HIV-1 transcription since it binds the two NF- κ B-binding motifs located in the enhancer sequence of the long terminal repeat (LTR) promoter (21). These various binding sites mediate combinatorial DNA-protein and protein-protein interactions that form a complex network through which HIV-1 regulates its levels of positive and negative sense gene expression.

Although the virus can enter into resting CD4⁺ T lymphocytes, the absence of active transcriptional factors in the nuclei prevents the ensuing transcription and replication steps. However, it seems that reverse transcription and integration events are still occurring in quiescent cells (5). The presence of a small pool of resting memory CD4⁺ T cells that contain transcriptionally silent HIV-1 proviruses constitute a drug-insensitive viral reservoir, a phenomenon that is thought to prevent eradication of HIV-1 from an infected individual by current drug regimens (24).

The immune system senses invading pathogens via receptors recognizing microbial components known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (12). These receptors are identified as pathogen recognition receptors (PRRs) and act as primary sensors of microbial products. (15). Recent evidence shows that this recognition can mainly

be attributed to the Toll-like family of receptors (TLRs), which have emerged as one of the major components of the immune system and are largely expressed on innate immune cells (2, 13, 20). Recently, however, mRNAs coding for TLR1, 2, 3, 4, 5, 7, and 9 were detected in human primary CD4⁺ T cells. Moreover, engagement of TLR2, 4, and 5 triggers production of interferon- γ , thus suggesting that some TLR ligands can activate resting CD4⁺ T cells (7, 27). Accordingly, we postulated that exposure of human T lymphoid cells latently infected with HIV-1 to some bacteria-derived TLR ligands might induce reactivation of virus gene expression.

We first asked whether TLR2, 4, and 5 triggering can induce NF- κ B in Jurkat E6-1 clone, a human T-cell line capable of mounting biologically relevant responses to TCR stimulation (1). Cells (10×10^6) were electroporated with 5 μ g of DNA from plasmids coding for NF- κ B-LUC, κ B-TATA-LUC, or LTRX-LUC. Briefly, NF- κ B-LUC contains five consensus NF- κ B-binding sequences placed in front of the luciferase gene along with a minimal promoter (Stratagene), κ B-TATA-LUC carries the HIV-1 κ B enhancer region (-105/-70) and a TATA box placed upstream of the luciferase reporter gene (generous gift from W. C. Greene, The J. Gladstone Institute), and LTRX-LUC plasmid contains a 722-pb Xho (-644)-*Hind*III (+78) fragment from HIV-1_{LAI} placed in front of the luciferase reporter gene (kindly provided by O. Schwartz, Unité d'Oncologie Virale, Institut Pasteur). Thereafter, cells were either left untreated or treated for 8 h with TLR2 agonist Pam₃Csk₄ (5 μ g/ml), TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS) (0.1 μ g/ml), TLR5 agonist flagellin (5 μ g/ml), or a combination of anti-TCR (clone OKT3)/anti-CD28 (clone 9.3) antibodies (used as a

positive control). It is of interest to note that LPS was used as a negative control since Jurkat cells are negative for TLR4 (see below) (22, 28).

Results depicted in Fig. 1 indicate that flagellin is the only TLR agonist tested that can mediate NF- κ B activation. As expected, TCR/CD28 triggering results in a potent activation of NF- κ B. Similar observations were made when using expression vectors driven either by HIV-1 minimal promoter or complete viral regulatory sequences. The lack of responsiveness following exposure to the TLR2 ligand was unexpected knowing that this PRR is expressed in primary human CD4⁺ T cells (27) and TLR2 engagement has been reported to mediate nuclear translocation of NF- κ B in this cell subpopulation (25). To solve this issue, we quantified TLR2, 4, and 5 mRNA levels in Jurkat cells using activated human CD4⁺ T cells as a positive control. Expression levels of TLR2, 4 and 5 transcripts were determined using a Rotor-Gene system (Corbett Life Science). Total RNA (2 x 10⁶ cells) was isolated using a RNA extraction kit (Qiagen) and then digested with Turbo DNase (Ambion) to remove any contaminating genomic DNA. RNA was reverse-transcribed using AMV reverse transcriptase (Promega). We then proceeded to qRT-PCR quantification of transcripts using AmpliTaq Gold ® DNA Polymerase (Applied Biosystems) and Sybr Green detection with primers sets designed for TLR2 (TLR2-F [GATGCCTACTGGGTGGAGAAA] and TLR2-R [CCTACTTGCCAGGAATGAAGT]), TLR4 (TLR4-F [TGAGCAGTCGTGCTGGATC] and TLR4-R [CTGTCCTCCCACTCCAGGTA]), TLR5 (TLR5-F [GCTCCTGCTGAGCTTCAACT] and TLR5-R [TAAGGTTGGGCAGGTTTCTG]), and 18S (18S-F [TGGTCGCTCGCTCCTCTCCTA] and 18S-R [CGCGCCTGCTGCCTTCCTTGG]).

Normalization on 18S mRNA levels was performed to obtain final expression values. A standard curve was drawn for each gene of interest using serial dilutions of pooled RNA from all samples. As illustrated in Fig. 2, Jurkat cells displayed very low levels of TLR2 mRNA compared to activated CD4⁺ T cells, which might help to explain the unresponsiveness to TLR2 stimulation. As expected, TLR4 mRNA is not present in Jurkat cells and abundant TLR5 mRNA is seen in the leukemic cell line. Our results are in accordance with a previous study, which has demonstrated that Jurkat cells do not significant levels of TLR2 and TLR4 mRNAs (28). Knowing that TLR5 stimulation results in NF- κ B induction and considering that virus gene expression is promoted by this ubiquitous transcription factor, we next tested if TLR5 stimulation could induce latent proviral expression in a Jurkat derivative called J-Lat. These cells contain integrated but transcriptionally silent HIV-1 proviruses and the green fluorescent protein (GFP) gene replacing Nef. Transcriptional activation of the latent provirus can be monitored by detection of GFP expression using flow cytometry (26). J-Lat cells (1×10^6) were exposed to increasing concentrations of the non-tumor-promoting ester phorbol prostratin for various time periods to delineate the optimal conditions for GFP expression in this experimental model system. As illustrated in Figs. 3A and 3B, prostratin potently activates latent proviruses at a final concentration of 10 μ M and a time-dependent induction is seen until 20 h following stimulation. Interestingly, the TLR5 ligand was found to drive HIV-1 gene expression in such latently infected cells (Fig. 3C). The proportion of cells that displayed GFP epifluorescence is not affected upon TLR2 and 4 triggering, which is in line with our previous observations using Jurkat E6-1 cells. Finally, we tested the capacity of

flagellin to up-regulate HIV-1 expression from purified CD4⁺ T cells of two aviremic patients (kindly provided by Dr. R.-P. Sékaly, Université de Montréal). Purified CD4⁺ T lymphocytes were isolated immediately following thawing using a magnetic-based negative selection procedure (StemCell). Next, cells were either left unstimulated or stimulated with flagellin (5 µg/ml), prostratin (10 µM), and PHA-L (1 µg/ml) for 21 days. Supernatants were harvested every 3 days to determine the p24 content with a homemade ELISA test (4). Unfortunately, virus gene expression could not be detected following exposure either to flagellin or prostratin, while PHA-L was able to reactivate latent proviral DNA in one of the two donors tested (data not shown). The inability of flagellin to antagonize HIV-1 latency in patient samples might be associated with the reduced ability of this TLR5 agonist to drive virus expression in J-Lat cells as compared to prostratin (Fig. 3C). Moreover, our results are not surprising considering that prostratin induced HIV-1 expression in cells isolated from only 4 out of a total of 6 patients when such patient samples were co-cultured with HIV-1-seronegative donor cells to amplify virus infection (16).

Viral latency is a feature of many viruses, including retroviruses, adenoviruses and many members of the *herpesviridae* family (10). HIV-1 latency is mainly a consequence of the natural propensity of this virus to replicate actively in CD4⁺ T lymphocytes (8). In fact, following immune activation, some activated CD4⁺ T cells return to a resting state and become memory cells that carry dormant integrated proviruses (8, 9). As such, the integrated provirus persists throughout the lifespan of the infected memory T cell, which may be years, given that these cells form the basis of the immunologic memory (18, 19). Because of these long-lived viral reservoirs, current antiretroviral regimens cannot fully

purge HIV-1 from the system (23). When the therapeutic goal is viral eradication, every latent reservoir must be targeted and cleared. Our results show that stimulation with the TLR5 agonist flagellin alone is sufficient to reactivate latent proviruses contained within a previously developed model of HIV-1 latency termed J-Lat. Although our preliminary and limited findings demonstrate that TLR5 ligation is not sufficient *per se* to reactivate latent HIV-1 provirus in purified CD4⁺ T cells from infected individuals, it can be proposed that activation of quiescent proviral genomes might be possible when TLR5 triggering mediated by pathogen-derived microbial products is combined with costimulatory factors such as proinflammatory cytokines (e.g. TNF- α and IL-1 β). Interestingly, expression and production of several cytokines have been reported to be dysregulated in the context of HIV-1 infection. Additional experiments are needed to address this possibility.

The physiological relevance of the present findings is high considering that the HIV-1-related systemic immune activation is due to circulating microbial products (6) that can possibly engage TLRs. In addition, our results raise concerns about the safety of vaccination in the setting of HIV-1 infection. Many successful vaccines contain adjuvants that appear to be ligands for TLRs (14). Therefore, some vaccines, particularly those engaging TLR5, can possibly worsen HIV-1-associated diseases by promoting CD4⁺ T cell activation and reactivation of latent HIV-1 proviruses from the host genome.

This study was performed by S.T. in partial fulfilment of her Ph.D. degree in the Microbiology-Immunology Program, Faculty of Medicine, Laval University. S.T and M.I hold Doctoral Awards from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Research Program. This work was made possible through a grant to M.J.T and M.R.T. from the Canadian Foundation for AIDS Research (#019 015). M.J.T is the recipient of the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (Tier 1 level).

Bibliography

1. **Abraham, R. T., and A. Weiss.** 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* **4**:301-8.
2. **Akashi-Takamura, S., and K. Miyake.** 2006. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *J Infect Chemother* **12**:233-40.
3. **Angel, P., and M. Karin.** 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**:129-57.
4. **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.
5. **Brenchley, J. M., B. J. Hill, D. R. Ambrozak, D. A. Price, F. J. Guenaga, J. P. Casazza, J. Kuruppu, J. Yazdani, S. A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup.** 2004. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* **78**:1160-8.
6. **Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M.**

- Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek.** 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* **12**:1365-71.
7. **Caron, G., D. Duluc, I. Fremaux, P. Jeannin, C. David, H. Gascan, and Y. Delneste.** 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* **175**:1551-7.
8. **Chun, T. W., D. Finzi, J. Margolick, K. Chadwick, D. Schwartz, and R. F. Siliciano.** 1995. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* **1**:1284-90.
9. **Chun, T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, and A. S. Fauci.** 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13193-7.
10. **Geeraert, L., G. Kraus, and R. J. Pomerantz.** 2008. Hide-and-seek: the challenge of viral persistence in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* **59**:487-501.
11. **Ghosh, S., and M. Karin.** 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109** Suppl:S81-96.
12. **Hopkins, P. A., and S. Sriskandan.** 2005. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* **140**:395-407.

13. **Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann.** 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**:4531-7.
14. **Ishii, K. J., and S. Akira.** 2007. Toll or toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development. *J Clin Immunol* **27**:363-71.
15. **Janeway, C. A., Jr.** 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**:1-13.
16. **Kulkosky, J., D. M. Culnan, J. Roman, G. Dornadula, M. Schnell, M. R. Boyd, and R. J. Pomerantz.** 2001. Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood* **98**:3006-15.
17. **Macian, F.** 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**:472-84.
18. **McLean, A. R., and C. A. Michie.** 1995. In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:3707-11.
19. **Michie, C. A., A. McLean, C. Alcock, and P. C. Beverley.** 1992. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* **360**:264-5.
20. **Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A.**

- Mantovani.** 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**:5998-6004.
21. **Nabel, G., and D. Baltimore.** 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**:711-3.
22. **Okugawa, S., S. Yanagimoto, K. Tsukada, T. Kitazawa, K. Koike, S. Kimura, H. Nagase, K. Hirai, and Y. Ota.** 2006. Bacterial flagellin inhibits T cell receptor-mediated activation of T cells by inducing suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1). *Cell Microbiol* **8**:1571-80.
23. **Siliciano, J. D., J. Kajdas, D. Finzi, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. B. Margolick, C. Kovacs, S. J. Gange, and R. F. Siliciano.** 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* **9**:727-8.
24. **Stebbing, J., B. Gazzard, and D. C. Douek.** 2004. Where does HIV live? *N Engl J Med* **350**:1872-80.
25. **Thibault, S., M. R. Tardif, C. Barat, and M. J. Tremblay.** 2007. TLR2 signaling renders quiescent naive and memory CD4+ T cells more susceptible to productive infection with X4 and R5 HIV-type 1. *J Immunol* **179**:4357-66.

26. **Williams, S. A., L. F. Chen, H. Kwon, D. Fenard, D. Bisgrove, E. Verdin, and W. C. Greene.** 2004. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *J Biol Chem* **279**:42008-17.
27. **Xu, D., M. Komai-Koma, and F. Y. Liew.** 2005. Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol* **233**:85-9.
28. **Ye, Z., and Y. H. Gan.** 2007. Flagellin contamination of recombinant heat shock protein 70 is responsible for its activity on T cells. *J Biol Chem* **282**:4479-84.

Figure legends

Figure 1. TLR5 triggering induces activation of NF- κ B, HIV-1 promoter and viral regulatory sequences. Jurkat E6-1 cells were transiently transfected with pNF- κ B-LUC, p κ B-TATA-LUC or pLTRX-LUC and then, 24 h later, either left untreated (mock) or stimulated with the listed stimuli. Luciferase activity (as expressed in Relative Light Units/RLU) was measured 8 h following stimulation. The data shown represent the mean \pm standard deviations of quadruplicate samples and are representative of four independent experiments.

Figure 2. TLR2, 4, and 5 mRNA levels in activated human primary CD4⁺ T cells and Jurkat E6-1 cells. Total RNA was isolated from purified activated CD4⁺ T lymphocytes and Jurkat E6-1 cells. Thereafter, cDNA was synthesized and used to determine mRNA levels of ribosomal 18S as well as TLR2, 4, and 5 by qRT-PCR. Data shown are the means \pm standard deviations of duplicate samples normalized on ribosomal 18S (N.D.: not detectable).

Figure 3. Latent HIV-1 proviruses are activated in J-Lat cells following TLR5 stimulation. (A) J-Lat cells were either left untreated (mock) or treated for 24 h with a dilution of DMSO (diluent) corresponding to the one used to prepare the highest concentration of prostratin tested (i.e. 10 μ M) and the indicated concentrations of prostratin. (B) In some experiments, J-Lat cells were either left untreated or treated for the indicated time periods with the appropriate concentration of the diluent (i.e. 10 μ M) and

prostratin (final concentration of 10 μ M). (C) J-Lat cells were either left untreated (mock) or treated for the indicated time periods with prostratin (10 μ M), TLR2 ligand Pam₃Csk₄, TLR4 agonist LPS, and TLR5 ligand flagellin. The percentage of GFP-expressing cells was measured by flow cytometry. Results are representative of four different experiments.

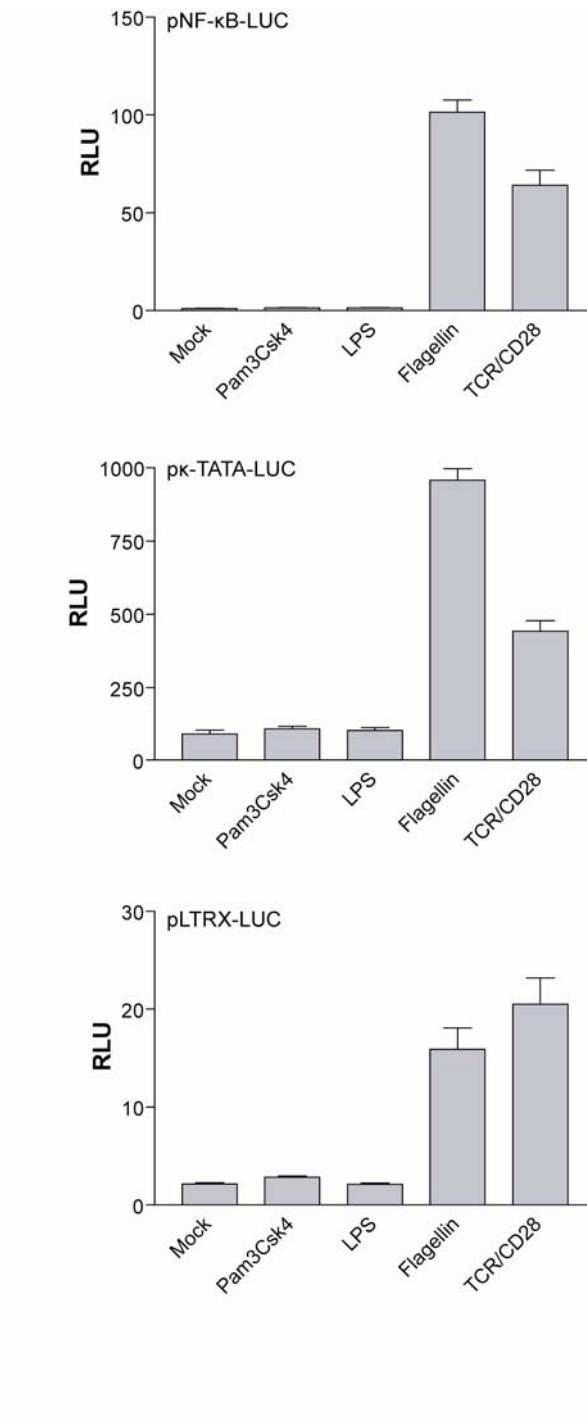
Figure 1.

Figure 2.

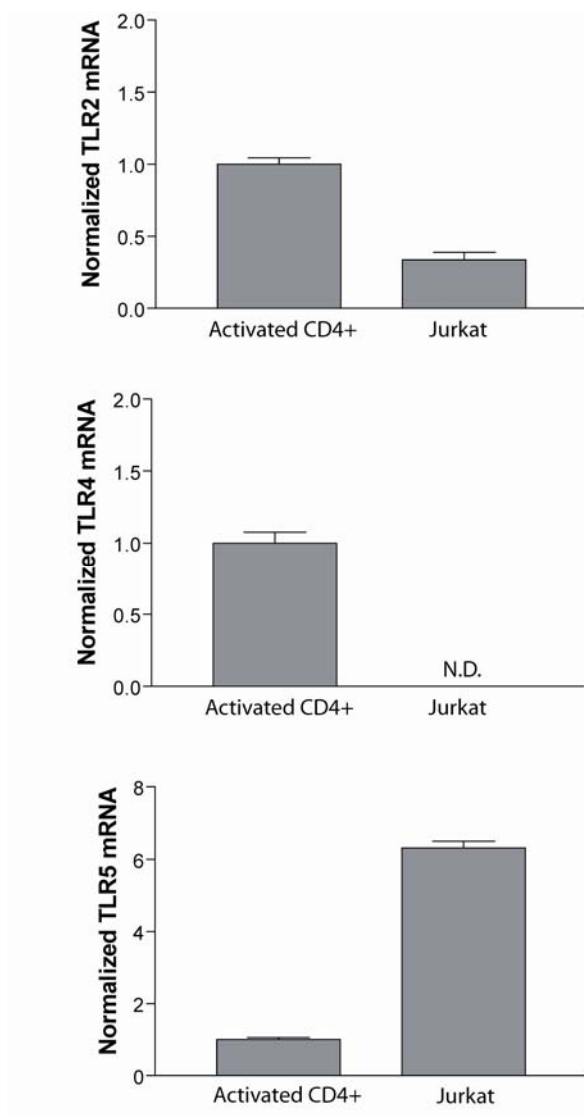
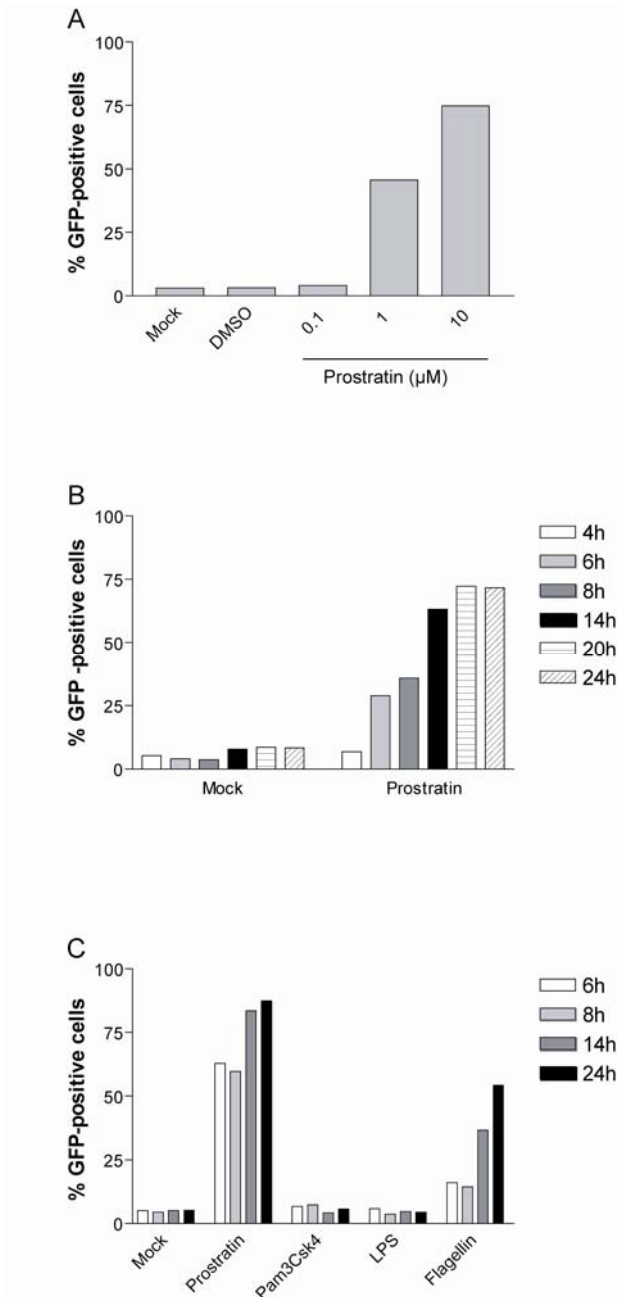


Figure 3.



Chapitre VII. Discussion générale

Les données que nous avons obtenues montrent clairement que la stimulation des divers TLR module certaines étapes du cycle réplicatif du VIH-1. Non seulement les effets de ces stimulations sont visibles avec les lignées lymphocytaires mais également avec divers types de cellules primaires, ce qui démontre la pertinence de nos travaux dans un cadre beaucoup plus physiologique. En fait, en plus de moduler l'infection dans les lymphocytes T CD4+, la stimulation des TLR a engendré les mêmes effets avec les cellules dendritiques, ce qui révèle que le tropisme de la souche virale utilisée importe peu et que ce sont plutôt certaines étapes précises du cycle viral qui sont modulées.

Nos résultats ont également permis d'éclaircir, en partie, les mécanismes sous-jacents aux modulations observées, à la fois chez les lymphocytes T CD4+ et les CD. Dans le cas des lymphocytes T, nos résultats ont premièrement permis d'observer que la stimulation du TLR2 menait à une activation générale des cellules, à la fois chez les cellules naïves et mémoires. L'agrégation, un phénomène caractéristique de l'activation lymphocytaire, était présente ainsi que l'expression de divers marqueurs d'activation. Le changement d'état d'activation ainsi que l'expression de ces marqueurs a permis d'observer que l'infection des cellules T naïves et mémoires était augmentée suite à la stimulation du TLR2, menant à une infection productive à la fois avec des virus de tropisme X4 et R5. De plus, nous avons identifié que le facteur de transcription cellulaire NF- κ B était activé et transloqué au noyau, toujours suite à la stimulation du TLR2. Sachant que les lymphocytes T quiescents sont présents dans la circulation sanguine et que la translocation microbienne est caractérisée par la présence de produits bactériens dans le sang, nos résultats suggèrent que l'infection par le VIH-1 peut rapidement être modulée à la hausse, ce qui favorise ainsi la dissémination. Le fait que les résultats soient semblables dans le cas des CD suggère également que la présence de pathogènes causant entre autre des infections transmises sexuellement peut encore une fois favoriser la propagation de l'infection. De plus, la formation d'agrégats

observée suite à la stimulation du TLR2 pourrait grandement favoriser la transmission du virus suite à la formation de la synapse virologique entre un lymphocyte infecté et un autre qui ne l'est pas.

Les mêmes études ont par la suite été effectuées sur un autre type cellulaire, les CD immatures dérivées de monocytes. Dans le même ordre d'idée que la translocation microbienne et sachant que les cellules dendritiques sont très présentes dans les muqueuses, site d'entrée de divers pathogènes, nous avons vérifié si la stimulation de certains TLR pouvait moduler certaines étapes du cycle viral, dont l'infection. Encore une fois, la stimulation du TLR2, avant l'infection par le VIH, entraîne une augmentation de celle-ci. Sachant que les CD sont impliquées dans le transfert du virus aux lymphocytes T CD4+ lors de la création de la synapse immunologique, nous avons étudié si l'exposition de ces dernières à différents ligands de TLR module la capture du VIH-1 et son transfert à la fois précoce et tardif. Nos résultats ont démontré que suite à la stimulation du TLR2, ces 2 types de transfert sont augmentés, ce qui renforce notre théorie que la présence de composés microbiens peut moduler grandement le cycle viral du VIH-1. Dans le même ordre d'idée, nous avons pu observer que la stimulation du TLR4 mène plutôt à une inhibition de l'infection des CD et du transfert aux lymphocytes T. Nos résultats ont également permis de conclure que cette inhibition était due à la sécrétion d'IFN de type I par les CD suite à la stimulation du TLR4. L'étude a aussi été élargie à d'autres TLR, dont les TLR 5, 7 et 9, afin de vérifier si les mêmes réponses pouvaient être obtenues. Cependant, aucune tendance n'a été décelée à la suite de la stimulation de ces TLR. Bien que, comme dans le cas des lymphocytes T, une activation de NF- κ B a été observée suite à la stimulation des TLR 2, 4 et 5, cette activation n'est toutefois pas responsable de l'augmentation de l'infection. En fait, nous avons noté que lorsque la stimulation du TLR2 se tenait après l'infection, aucune augmentation n'était observée et ce, même lorsque la stimulation avait lieu deux jours suivant l'infection, lorsque tous les virus étaient intégrés.

Le fait que le TLR2 est exprimé par plusieurs types cellulaires renforce nos résultats en ce sens que les effets observés ne sont probablement pas exclusifs aux cellules étudiées.

D'un tout autre point de vue, nous avons étudié l'effet de la stimulation de certains TLR et leur capacité à réactiver les virus latents. Nos résultats ont permis d'affirmer que la stimulation du TLR5 était effectivement capable de réactiver ces virus et dans un ordre de grandeur comparable à celui du contrôle positif, la prostratine.

7.1 Pourquoi le choix du TLR2?

La stimulation du TLR2 est celle que nous avons le plus approfondi au cours de notre étude. Ce TLR a été choisi premièrement pour nos études portant sur les lymphocytes T. Puisque le TLR2 est exprimé différemment selon que les cellules sont naïves ou mémoires ou quiescentes versus activées, il représentait un candidat intéressant. Comme il est un des TLR exprimé par le plus de types cellulaires, son utilisation nous permettait de comparer les effets obtenus entre autre par les CD. De plus, outre le TLR4, il est le TLR le plus étudié et le mieux caractérisé. Ceci dit, nous avons également étudié l'ensemble des TLR exprimés chez les lymphocytes T et les CD. Aussi, le vaste choix d'agonistes pouvant mener à l'activation du TLR2 rendait les expériences intéressantes.

7.2 Les ligands du TLR2

Chaque TLR peut être stimulé par différents ligands, qu'ils soient synthétiques ou purifiés de bactéries. Le TLR2 ne fait pas exception à cette règle. Ainsi, toutes nos études ont été menées en utilisant un agoniste synthétique, le Pam₃Csk₄. Cet agoniste mime à la perfection un lipide tri-acylé, menant à la stimulation de l'hétérodimère TLR1/2. Sachant que le TLR2 peut également s'associer au TLR6 et reconnaître cette fois des lipides di-acylés, nous avons effectué la majorité de nos expériences en utilisant des acides lipotechoïques purifiés

de bactéries. Le TLR6 n'étant pas exprimé par les lymphocytes T, aucun résultat n'a pu être observé. Par contre, l'utilisation de ce composé dans le cadre de nos expériences avec les CD a donné des résultats similaires à ceux obtenus avec le produit synthétique. Évidemment, les résultats fournis par le Pam₃Csk₄ ont toujours été très constants, contrairement aux produits purifiés de bactéries. Sans doute que cela peut s'expliquer par le fait qu'un produit fabriqué en usine est sûrement plus stable et plus pur qu'un produit isolé de produits vivants, où les lots présentent certainement un plus haut taux de variation. L'important par contre est d'avoir réussi à obtenir les mêmes résultats avec un ligand synthétique et un ligand naturel. Nous avons également fait quelques expériences en utilisant des bactéries entières inactivées à la chaleur. Notre choix s'est arrêté sur des bactéries respectivement Gram-positives et Gram-négatives et disponibles sur le marché soit *Staphylococcus aureus* et *Porphyromonas gingivalis*. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu de différences avec ces 2 agonistes. Même si ces bactéries sont entières, nous pouvons penser que leur traitement à de fortes chaleurs est peut-être suffisant pour les abîmer et détruire certaines structures. De plus, bien qu'elles soient identifiées pour activer spécifiquement le TLR2, ces bactéries contiennent de l'ADN qui peut activer le TLR9. Ainsi, peut-être que l'effet de ces autres TLR pourrait venir contrer celui occasionné par la stimulation du TLR2. Il est possible qu'il soit plus difficile pour une cellule de reconnaître des structures précises d'une bactérie plutôt qu'un produit purifié présent dans le milieu extracellulaire.

Finalement, comme la majorité des études portant sur la translocation microbienne analysent les niveaux de LPS, nous n'avons pas trouvé de valeurs réelles pour les concentrations de PG et LTA. Par conséquent, la concentration utilisée de 5 µg/ml est sûrement au-delà de ce qui se retrouve normalement dans l'organisme. Malgré tout, en regardant dans la littérature au moment de nos expérimentations, c'est la concentration la plus faible que nous avons trouvée.

7.3 La latence et le TLR2

Nos dernières expériences nous ont permis de constater que suite à la stimulation du TLR5, les provirus latents contenus dans les cellules de la lignée Jurkat-lat étaient réactivés. De plus, l'utilisation de la prostratine, un composé connu pour ses capacités à activer les virus latents, a également donné d'excellents résultats. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à tester si la stimulation du TLR2 pouvait également réactiver les virus latents puisque les Jurkat sont des cellules qui n'expriment pas ce TLR et nous ne sommes pas parvenus à les transfecter, malgré l'utilisation de diverses techniques. Cependant, à la lumière de nos résultats, il est possible de croire que la présence de composés bactériens pourrait, en plus d'activer les cellules quiescentes et de les rendre plus susceptibles à l'infection, activer les cellules mémoires et permettre la sortie des virus latents.

Donc, si nos résultats se répétaient *in vivo*, nous pouvons penser que la stimulation des TLR 2 et 5 pourrait permettre l'activation des cellules réservoirs, et par conséquent la réactivation des virus latents. Ceci aurait pour effet d'accroître la quantité de virus dans le sang mais par contre ils deviendraient alors des cibles pour la tri-thérapie. Comme il a déjà été mentionné, la tri-thérapie fonctionne bien mais ne parvient pas à éradiquer les cellules réservoirs.

7.4 Les variations dans l'expression du TLR2 pendant une infection VIH-1

Bien que certaines études aient déjà rapporté des modulations dans l'expression du TLR2 dans certaines maladies telles que l'athérosclérose et la lèpre (508, 509), la régulation de l'expression de ce récepteur et l'importance clinique de celle-ci demeure méconnue.

Les patients infectés par le VIH-1 peuvent présenter des anomalies dans l'état d'activation de leur système immunitaire, malgré l'utilisation de la HAART et un compte normal de CD4+ (510). Même si récemment il a été rapporté que la stimulation du TLR2 pouvait augmenter la réplication du VIH-1 dans les cellules de souris transgéniques ainsi que dans les lymphocytes T humains, presque rien n'est connu sur l'expression de ce TLR et sa fonctionnalité chez les patients VIH-1 (511-513).

Récemment, une étude a démontré que l'expression du TLR2 à la surface des monocytes était variable selon les stades de la maladie. Bien qu'aucune corrélation ne soit observée entre la charge virale et l'expression du TLR2, des études *in vitro* ont pourtant démontré que suite à la stimulation des monocytes en utilisant de la gp120 soluble, l'expression du TLR2 était augmentée de manière significative, surtout chez les monocytes isolés de patients infectés. Ces résultats supportent un possible lien entre l'infection par le VIH-1 et l'expression du TLR2 (514).

Ces résultats soulèvent bien entendu des questions et des hypothèses. En effet, l'expression plus élevée du TLR2 chez les patients infectés se traduit par une sécrétion plus importante de TNF α suite à la stimulation de ce récepteur, suggérant un effet inflammatoire. D'ailleurs, il a récemment été démontré qu'une activation soutenue par le TNF α est présente chez les patients, même en présence de HAART, contribuant possiblement à l'immunodéficience et aux nombreuses complications métaboliques (515-517). Ainsi, il est possible que le TLR2 contribue à l'inflammation chez les patients VIH-1. Finalement, comme les niveaux d'ARN viraux corrélaient positivement avec les niveaux d'expression du TLR2 chez les monocytes et qu'il est maintenant bien connu que les antigènes microbiens peuvent promouvoir la réplication virale chez les patients atteints (518), nous pouvons conclure que la stimulation du TLR2 peut entraîner une réplication virale massive, spécialement chez les patients présentant une immunodéficience marquée.

Dans un autre ordre d'idée, une publication a récemment mentionné l'existence d'une forme soluble du TLR2 (sTLR2) dans le plasma et le lait maternel, suggérant également que la source majeure de sTLR2 proviendrait des monocytes qui convertissent le TLR2 exprimé à la surface en sTLR2 (519). De plus, le sTLR2 pourrait servir de marqueur d'activation des monocytes, sachant que l'activation de ceux-ci ainsi que la libération de cytokines inflammatoires ont des conséquences néfastes sur l'infection par le VIH-1 (520). Cette étude rapporte que les patients atteints du SIDA ont des niveaux réduits de sTLR2 comparé aux autres patients infectés par le VIH-1 ou les donneurs sains (521). Bien que la pertinence clinique du sTLR2 demeure méconnue, il semble qu'il existe une association entre le sTLR2 et la progression de la maladie ainsi qu'un rôle possible du sTLR2 dans la pathogenèse du VIH-1. De plus, une autre étude a démontré une augmentation de la sécrétion de cytokines en réponse aux lipoprotéines bactériennes suite à une déplétion du sTLR2 (519). En d'autres mots, une diminution de la concentration de sTLR2 dans le plasma, dû à un clivage moindre, fait en sorte qu'il y a plus de TLR2 à la surface cellulaire. Ainsi, les cellules répondent plus en présence de produits bactériens, ce qui favorise la sécrétion de cytokines et donc l'activation des cellules, menant à la progression de la maladie.

7.5 L'utilisation des ligands des récepteurs Toll-like comme adjuvants

Le concept de base d'un vaccin consiste à activer le système immunitaire de l'hôte et à développer une réponse immune acquise durable incluant une production d'anticorps par les lymphocytes B et/ou une réponse cellulaire spécifique des lymphocytes T, de manière à prévenir les infections ou réduire leur pathologie. Les vaccins efficaces doivent contenir non seulement un antigène protecteur, mais aussi un bon adjuvant qui activera efficacement le système immunitaire inné. Récemment, il a été démontré que les TLR jouaient des rôles importants dans les premières réponses pro-inflammatoires mais également dans les

réponses immunes antigène-spécifique, lesquelles sont toutes deux cruciales pour la protection contre les pathogènes (392, 522, 523).

Plusieurs composés connus pour lier les TLR incluant les protéines, les lipides, les carbohydrates et les acides nucléiques sont actuellement en cours d'études expérimentales ou cliniques, couplés aux formules vaccinales en tant qu'adjuvant. Cependant, de récentes évidences ont démontré que les adjuvants conventionnels comme l'hydroxyde d'aluminium (Alum), l'adjuvant de Freund complet ou incomplet ou les véhicules contenant des adjuvants non conventionnels comme les cellules apoptotiques et les virus, pouvaient mener à une réponse immune acquise efficace en absence des TLR (524-526).

Plusieurs ligands de TLR et plus spécifiquement ceux pouvant être synthétisés chimiquement ou génétiquement modifiés sont en cours de développement pour leur utilisation en tant qu'adjuvant (527, 528). Parmi ceux-ci, notons le Pam₃Csk₄ (agoniste du TLR2 utilisé dans toutes nos études *in vitro*), la flagelline et les imidazoquinolines (529-533). Ces agonistes des TLR sont de très bons adjuvants puisqu'ils ont la capacité d'activer les cellules qui expriment les TLR concernés, en particulier les CD, lesquelles sont des cellules présentatrices clés. Les CD produisent des cytokines, des chimiokines et des IFN de type I et augmentent leurs fonctions, incluant le processing d'antigène et la présentation aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Il a été démontré que la co-administration d'un vaccin (antigène) et d'un agoniste de TLR, dans une forme directe de conjugaison ou inclus dans un véhicule commun (particule virale, liposome) dans une cellule présentatrice d'antigènes via la voie des endosomes est nécessaire pour obtenir un vaccin optimal (534, 535).

Outre le LPS, dont la réelle efficacité en tant qu'adjuvant a été prouvée bien que son extrême toxicité empêche son utilisation chez l'humain, l'utilisation des agonistes du TLR2 semble réellement très prometteuse. En effet, à la fois le Pam₃Csk₄ et le MALP-2 (de l'anglais *macrophage-activating lipopeptide 2*) ont prouvé leur efficacité en tant qu'adjuvants (536, 537).

Dans le cas plus précis des vaccins contre le VIH-1, la majorité des approches exploitent les antigènes de l'enveloppe afin d'induire des anticorps neutralisants qui seraient capables d'empêcher l'infection (538, 539). Malheureusement, aucun vaccin prototype basé sur les antigènes de l'enveloppe n'a encore atteint son but. Ceci semble entre autre dû à la très grande variabilité des enveloppes entre les différentes classes de VIH-1. Cependant, une étude récente chez la souris, et utilisant un agoniste du TLR2 (MALP-2) comme adjuvant couplé à la protéine p17 du VIH-1 a présenté des résultats très intéressants. En fait, il est connu que des anticorps dirigés contre certains épitopes de la p17 sont capables d'inhiber la réplication du virus et sa propagation (540-542). De plus, des études cliniques ont montré que la présence en grande quantité d'anticorps contre la p17 corrélait avec une progression plus lente vers le stade SIDA (543, 544). Cette étude a démontré que lors d'une administration intranasale chez la souris, de fortes concentrations d'IgG dans le sérum ainsi que d'IgA dans les différentes muqueuses, incluant celle du tractus génital, avaient été observées (545).

7.6 Tirer profit des récepteurs Toll-like solubles

Puisque le TLR2 potentialise l'infection du VIH-1 de manière aussi claire et ce, dans différents types cellulaires, il est tentant de penser à bloquer son action ou plutôt d'empêcher sa stimulation. Premièrement, il est important de garder en tête que outre le fait que le TLR2, et plusieurs autres, est très important pour détecter les pathogènes et développer une réponse immune efficace, sa stimulation favorise l'infection par le VIH-1 mais n'est aucunement essentielle pour l'infection. Dans le meilleur des cas, l'empêchement de sa stimulation, en limitant les agonistes disponibles, diminuerait l'activation des cellules et par conséquent la progression de la maladie.

Bloquer une molécule humaine très utile risque toutefois de nuire à l'organisme. Les TLR, remplissent différentes fonctions dont la détection des pathogènes, la sécrétion de cytokines

inflammatoires et d'IFN de type I, l'activation de diverses cellules, le tout dans le but de potentialiser la réponse immune. Cependant, il semble bien que ces fonctions ne soient pas essentielles à la vie puisque les modèles de souris déficientes pour le TLR2, par exemple, sont parfaitement viables. Ainsi, il est possible de conclure que les rôles attribués aux TLR ne leur sont pas exclusifs et peuvent être remplis, entre autre, par d'autres récepteurs du même type. En d'autres termes, peut-être que le fait de bloquer les TLR n'entraînerait pas de problèmes importants pour l'organisme.

Cependant, il peut être plutôt complexe de bloquer des protéines aussi abondantes et largement distribuées sur autant de cellules. De plus, il faudra choisir entre le fait de bloquer les TLR ou leurs ligands (produits microbiens). En ce qui a trait au fait de bloquer les TLR eux-mêmes, la tâche pourrait être très ardue vu leur distribution dans tout l'organisme. De plus, bien qu'ils présentent tous un haut niveau d'homologie, celui-ci est surtout dû à la partie intracytoplasmique, la partie extracellulaire étant la plus variable de toute. Du coup, cette possibilité n'est sûrement pas envisageable. L'autre possibilité, bloquer les ligands, pourrait peut-être être plus logique et un peu plus simple à réaliser. En fait, comme il a été démontré que certains TLR, notamment les TLR2 et 4, sont déjà présents sous forme soluble, il serait possible de tirer profit de ce phénomène naturel en l'amplifiant. Ces récepteurs solubles agissent en quelque sorte comme des « decoil receptors », en liant les ligands avant même qu'ils n'atteignent les TLR présents à la surface des cellules. Il serait donc intéressant de penser à développer une façon de faire pour que de plus grandes quantités de TLR solubles se retrouvent en circulation. Ainsi, les produits microbiens, liés à ces récepteurs solubles, ne pourraient aller activer les TLR cellulaires, ce qui réduirait l'activation de ces cellules et tout ce qui s'ensuit. Par contre, nous avons mentionné que les TLR étaient somme toute des récepteurs très importants pour leur rôle dans l'immunité innée. Le fait d'empêcher la liaison de leur ligand réduirait du même coup le développement efficace d'une réponse immune. Ainsi, il serait sûrement plus avantageux de tenter d'utiliser les TLR solubles en des endroits précis où la liaison des ligands aux TLR cellulaires cause problème, comme par exemple dans les muqueuses où la

stimulation des CD favorise grandement leur infection et le transfert des virus aux lymphocytes T.

Cette alternative, d'utiliser les TLR solubles en des endroits stratégiques, c'est-à-dire localisés et au moment précis de l'infection, présenterait sans aucun doute moins de problèmes qu'une utilisation systémique et soutenue. Dans un tel scénario, l'utilisation des TLR solubles dans un véhicule, par exemple un microbicide, pourrait donc être une bonne idée. Cependant, comme mentionné précédemment, la stimulation des TLR n'est pas essentielle à l'infection, elle ne fait que l'accentuer. Dans cette optique, l'infection ne serait pas inhibée mais elle demeurerait à un niveau de base, sans être augmentée. De plus, sachant que la prise de trithérapie, lorsqu'entreprise dans les heures suivant une exposition au virus, empêche l'infection, toute stratégie visant à contenir l'infection peut devenir intéressante.

Finalement, les microbicides ne sont pas des médicaments/traitements mais plutôt des agents qui se doivent d'être utilisés en prophylaxie. En ce sens, ils ne sont pas différents des condoms et doivent obligatoirement être utilisés au moment même de la relation sexuelle.

7.7 Autres perspectives

Nous avons clairement démontré que la stimulation du TLR2 augmente l'infection par le VIH-1 à la fois chez les lymphocytes T CD4+ et les CD, deux acteurs très importants dans la propagation de l'infection. Cependant, les mécanismes réellement impliqués et faisant en sorte que les phénomènes d'infection et de transfert sont augmentés demeurent nébuleux. Il serait très intéressant de faire la lumière sur les facteurs impliqués dans la modulation de la réplication virale car ceci pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans le cas des lymphocytes T, la première étape consisterait donc à vérifier si l'entrée virale est modulée suite à la stimulation du TLR2. Il est très important de s'assurer que l'augmentation de l'infection observée n'est pas due à une entrée massive du virus suite à la stimulation. Dans le même ordre d'idée, comme les tests d'entrée sont quantifiés en mesurant la p24, rien n'indique donc que les virus dosés sont bel et bien infectieux. Ainsi, une plus grande présence de p24 ne peut permettre de conclure qu'il y aura plus d'infection. Une alternative serait donc de lyser les cellules autrement, en utilisant par exemple un piston permettant de séparer le cytosol des organelles et membranes et par la suite de déposer ce surnageant sur une lignée indicatrice, les TZM-bl, ce qui permettrait de réellement savoir si les virus entrés sont encore infectieux. Bien sûr, tous les virus qui entrent ne mènent pas à une infection productive. Seuls ceux entrés par fusion le font et non pas ceux qui pénètrent par la voie d'endocytose. Ainsi, une autre technique serait d'utiliser le virus β Lam afin de mesurer réellement la quantité de virus entrés par fusion (546). La protéine Vpr du virus étant couplée à l'enzyme β -lactamase, lorsque les cellules sont incubées avec le substrat de cet enzyme, s'il y a fusion il y aura un changement de coloration du milieu. Un simple test colorimétrique permet donc de savoir si la fusion est modulée par nos stimulations. Par la suite, il serait intéressant de suivre le cycle viral et de s'attarder à chacune des autres étapes. La rétro-transcription (RT) est l'étape en aval de la fusion. Il existe différentes techniques pour mesurer la RT dont une enzymatique qui permet de quantifier le niveau d'activité de l'enzyme en soi, et une autre qui utilise plutôt le PCR quantitatif en temps réel. Comme une augmentation de l'activité de la transcriptase inverse, TI, ne se traduit pas nécessairement par une augmentation du procédé, nous croyons que l'approche par PCR serait plus sûre. Ainsi, il existe différentes amorces permettant à la fois de détecter les transcrits complets (où les amorces se situent dans le LTR et au début de Gag) et les transcrits précoces (les deux amorces sont situées dans le LTR). Il est ainsi possible de vérifier si une stimulation via le TLR2 favorise ou non la RT.

L'intégration peut aussi être quantifiée par PCR en utilisant encore une fois des paires d'amorces différentes. Dans ce cas, une première ronde de PCR amplifie d'abord tout

l'ADN viral présent et une deuxième ronde, où les amorces sont situées dans le génome cellulaire et dans le LTR, permet de détecter uniquement les provirus intégrés.

L'étape de transcription qui suit peut être étudiée en vérifiant si les facteurs de transcription cellulaire connus pour activer le VIH-1 (NF- κ B, NFAT, AP-1) sont activés et transloqués au noyau. Nous avons déjà montré que NF- κ B était activé suite à la stimulation du TLR2, et il serait approprié de mesurer l'activation potentielle de certains autres facteurs de transcription. Il serait aussi intéressant de tenter de bloquer la signalisation engendrée par le TLR2 en utilisant soit des petits ARN interférants ou des drogues spécifiques à certaines protéines impliquées dans la signalisation.

Finalement, il est également possible de croire qu'outre le VIH-1, des facteurs cellulaires pourraient être impliqués et favoriser en quelque sorte l'infection des lymphocytes T. Parmi ces facteurs, nous croyons que l'enzyme A3G pourrait jouer un rôle important. En fait, il est connu que cet enzyme, présent dans les cellules T quiescentes, mène à un blocage de l'infection. Nous posons donc l'hypothèse que la stimulation du TLR2 est sûrement suffisante pour retirer ce blocage post-entrée et ainsi permettre une meilleure TI. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en stimulant les cellules et en déposant leur lysat sur un gradient de densité permettant de séparer les deux formes d'A3G (bas et haut poids moléculaire). Sachant que le complexe de bas poids restreint l'infection, si nous observons (par immunobuvardage) un « switch » du complexe vers le haut poids moléculaire, nous saurons que la stimulation du TLR2 est efficace. Une autre hypothèse à vérifier serait d'analyser le cycle cellulaire des cellules stimulées. Ainsi, il est connu que la majorité des cellules quiescentes circulantes sont en G₀. Sachant que la stimulation du TLR2 active les cellules, il serait très intéressant de tenter de corroborer nos résultats en analysant le cycle cellulaire. De cette manière, nous pourrions affirmer que l'activation des cellules est vraiment essentielle pour l'infection par le VIH-1 et voir s'il y a une possible corrélation avec notre théorie d'A3G.

Bien que nous ayons étudié deux sous-populations de lymphocytes T CD4+, naïfs et mémoires, il serait très pertinent d'approfondir les données en répétant les mêmes expériences avec des T régulateurs (Treg) et des Th17 (un sous-type très présent dans les muqueuses intestinales et qui est rapidement déplété suite à la primo-infection). Les lymphocytes T CD8+, qui expriment aussi le TLR2 pourraient aussi faire l'objet d'études approfondies. Leur niveau d'activation pourrait donc être étudié selon les mêmes techniques mais aussi en analysant leur sécrétion d'IFN γ , de perforines et de granzymes.

Finalement, dans un autre ordre d'idée, il serait intéressant de tenter d'établir la voie de signalisation du TLR2 dans les lymphocytes T et ce, en absence d'infection. Les voies de signalisation des TLR ont été clairement identifiées pour les cellules de types myéloïdes comme les macrophages et les CD mais très peu de choses ont été faites avec les lymphocytes T. Des résultats préliminaires nous ont permis de constater certaines différences dans les patrons de phosphorylation suite à la stimulation du TLR2, reste donc à identifier ces différences.

Dans le cas des CD, il a déjà été mentionné que la stimulation des différents TLR favorise la macropinocytose, une voie d'entrée possible pour le virus. La première expérience rapide et simple serait donc de vérifier encore une fois si l'entrée des virus est modulée chez les cellules stimulées. Il serait grandement intéressant d'aller vérifier par microscopie électronique si de larges vacuoles remplies de virus peuvent être observées dans les cellules ayant été stimulées par le TLR2. De plus, sachant que la macropinocytose implique beaucoup le cytosquelette d'actine, une autre expérience pourrait être de traiter ou non les CD avec certaines drogues qui inhibent des voies d'activation ou des protéines importantes dans le réarrangement du cytosquelette comme la PI3K. En ajoutant ces drogues avant, pendant ou après la stimulation du TLR2, nous pourrions tirer profit d'informations supplémentaires. Évidemment, toutes les étapes du cycle viral, telles que mentionnées pour les lymphocytes T, s'appliquent aussi pour les CD.

À long terme, il serait très pertinent d'étudier tout le contexte de cytokines sécrétées suite à l'infection par le VIH-1, à la stimulation du TLR2 ou des deux phénomènes ensemble. Sachant que les cytokines sont très importantes puisqu'elles entraînent la maturation entre autre des lymphocytes T et dictent le type de réponse immune, une plus grande connaissance dans ce domaine ferait grandement avancer la recherche.

Bien entendu, comme plusieurs types cellulaires expriment le TLR2 il serait également très pertinent de répéter ces expériences avec entre autres les macrophages, d'autres acteurs très important de l'infection par le VIH-1, mais également avec les microglies, des macrophages retrouvés dans le cerveau.

Comme l'ont démontré les expériences faites en stimulant les TLR4, 5, 7 et 9, tous les TLR n'ont pas le même impact sur l'infection par le VIH-1. Ainsi, une autre perspective intéressante de cette étude serait de vérifier l'impact d'autres TLR comme le TLR3 et le TLR8. De plus, sachant que le TLR3 peut être activé par le VIH-1, une étude où seule l'activation du TLR3 et ses fonctions suite à l'infection par le VIH-1 pourrait mener à des résultats pertinents.

Chapitre VIII. Conclusions générales

Nous avons démontré que la stimulation du TLR2 augmente l'infection par le VIH-1 à la fois dans les cellules T CD4⁺ et les CD. Nous avons également montré que le transfert du virus des CD aux lymphocytes T CD4⁺ était aussi augmenté. Bien que nous sachions déjà que la stimulation du TLR2 activait les cellules, notre travail est original en ce sens que notre étude est l'une des premières qui a prouvé que cette stimulation était suffisante pour rendre les cellules T CD4⁺ naïves et mémoires plus permissives à l'infection à la fois par des virus X4 et R5. Nos études ont également démontré pour la première fois que les CD étaient aussi plus susceptibles à l'infection et que même le transfert aux lymphocytes T CD4⁺ était modulé à la hausse. Cette découverte indique encore une fois que le virus s'adapte et parvient à tirer profit de tout phénomène présent chez l'hôte.

Cependant, même si l'infection ne dépend pas de la stimulation du TLR2, le fait d'empêcher la stimulation ferait en sorte que l'augmentation de l'infection observée n'aurait tout simplement pas lieu, ce qui peut être une bonne chose. De là, l'utilisation de TLR2 soluble pourrait produire des résultats intéressants, en particulier si l'impact de cette molécule sur les événements précoces de l'infection se confirme.

Ce nouveau courant de pensée qui consiste à cibler des protéines humaines plutôt que virales est très prometteur et certainement promis à un bel avenir puisque la majorité des tentatives de vaccination actuelles, ciblant des protéines virales, ont échoué en raison du fort taux de mutation du virus. Après plus de 25 ans, il est grandement temps de commencer à développer d'autres stratégies en gardant en tête les grandes capacités du virus à contourner tous les obstacles qui bloqueront sa route. La communauté scientifique doit absolument parvenir du moins à ralentir ou mieux stabiliser la progression de la pandémie.

Bibliographie

1. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
2. Zagury, D., J. Bernard, J. Leibowitch, B. Safai, J. E. Groopman, M. Feldman, M. G. Sarngadharan, and R. C. Gallo. 1984. HTLV-III in cells cultured from semen of two patients with AIDS. *Science* 226:449-451.
3. Arya, S. K., R. C. Gallo, B. H. Hahn, G. M. Shaw, M. Popovic, S. Z. Salahuddin, and F. Wong-Staal. 1984. Homology of genome of AIDS-associated virus with genomes of human T-cell leukemia viruses. *Science* 225:927-930.
4. UNAIDS, www.unaids.org, Consulté en juillet 2008
5. Hymes, K. B., T. Cheung, J. B. Greene, N. S. Prose, A. Marcus, H. Ballard, D. C. William, and L. J. Laubenstein. 1981. Kaposi's sarcoma in homosexual men—a report of eight cases. *Lancet* 2:598-600.
6. Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter, and H. Wagner. 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11416-11421.
7. Marmor, M., A. E. Friedman-Kien, L. Laubenstein, R. D. Byrum, D. C. William, S. D'Onofrio, and N. Dubin. 1982. Risk factors for Kaposi's sarcoma in homosexual men. *Lancet* 1:1083-1087.
8. Jonassen, T. O., K. Stene-Johansen, E. S. Berg, O. Hungnes, C. F. Lindboe, S. S. Froland, and B. Grinde. 1997. Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology* 231:43-47.
9. Froland, S. S., P. Jenum, C. F. Lindboe, K. W. Wefring, P. J. Linnestad, and T. Bohmer. 1988. HIV-1 infection in Norwegian family before 1970. *Lancet* 1:1344-1345.
10. Corbitt, G., A. S. Bailey, and G. Williams. 1990. HIV infection in Manchester, 1959. *Lancet* 336:51.
11. Williams, G., T. B. Stretton, and J. C. Leonard. 1983. AIDS in 1959? *Lancet* 2:1136.

12. Williams, G., T. B. Stretton, and J. C. Leonard. 1960. Cytomegalic inclusion disease and *Pneumocystis carinii* infection in an adult. *Lancet* 2:951-955.
13. Zhu, T., B. T. Korber, A. J. Nahmias, E. Hooper, P. M. Sharp, and D. D. Ho. 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391:594-597.
14. Nahmias, A. J., J. Weiss, X. Yao, F. Lee, R. Kodosi, M. Schanfield, T. Matthews, D. Bolognesi, D. Durack, A. Motulsky, and et al. 1986. Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. *Lancet* 1:1279-1280.
15. Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397:436-441.
16. Chen, Z., A. Luckay, D. L. Sodora, P. Telfer, P. Reed, A. Gettie, J. M. Kanu, R. F. Sadek, J. Yee, D. D. Ho, L. Zhang, and P. A. Marx. 1997. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol* 71:3953-3960.
17. Chen, Z., P. Telfer, A. Gettie, P. Reed, L. Zhang, D. D. Ho, and P. A. Marx. 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* 70:3617-3627.
18. Marx, P. A., C. Apetrei, and E. Drucker. 2004. AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. *J Med Primatol* 33:220-226.
19. Takehisa, J., Y. Harada, N. Ndembi, I. Mboudjeka, Y. Taniguchi, C. Ngansop, S. Kuate, L. Zekeng, K. Ibuki, T. Shimada, B. Bikandou, Y. Yamaguchi-Kabata, T. Miura, M. Ikeda, H. Ichimura, L. Kaptue, and M. Hayami. 2001. Natural infection of wild-born mandrills (*Mandrillus sphinx*) with two different types of simian immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1143-1154.
20. Smith, S. M., M. Makuwa, F. Lee, A. Gettie, C. Russo, and P. A. Marx. 1998. SIVrcm infection of macaques. *J Med Primatol* 27:94-98.
21. Marx, P. A., P. G. Alcabes, and E. Drucker. 2001. Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:911-920.
22. Drucker, E., P. G. Alcabes, and P. A. Marx. 2001. The injection century: massive unsterile injections and the emergence of human pathogens. *Lancet* 358:1989-1992.

23. Knipe, D., Howley, PM. 2007. *Fundamental Virology*.
24. Gao, F., L. Yue, A. T. White, P. G. Pappas, J. Barchue, A. P. Hanson, B. M. Greene, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn. 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358:495-499.
25. Gao, F., L. Yue, D. L. Robertson, S. C. Hill, H. Hui, R. J. Biggar, A. E. Neequaye, T. M. Whelan, D. D. Ho, G. M. Shaw, and et al. 1994. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* 68:7433-7447.
26. Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, and P. R. Johnson. 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339:389-392.
27. Peeters, M., K. Fransen, E. Delaporte, M. Van den Haesevelde, G. M. Gershy-Damet, L. Kestens, G. van der Groen, and P. Piot. 1992. Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate cpz-ant) from a wild-captured chimpanzee. *Aids* 6:447-451.
28. Peeters, M., C. Honore, T. Huet, L. Bedjabaga, S. Ossari, P. Bussi, R. W. Cooper, and E. Delaporte. 1989. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *Aids* 3:625-630.
29. Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-346.
30. Levy, J. A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 57:183-289.
31. Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon. 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326:662-669.
32. Marlink, R., P. Kanki, I. Thior, K. Travers, G. Eisen, T. Siby, I. Traore, C. C. Hsieh, M. C. Dia, E. H. Gueye, and et al. 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265:1587-1590.
33. Ancelle, R., O. Bletry, A. C. Baglin, F. Brun-Vezinet, M. A. Rey, and P. Godeau. 1987. Long incubation period for HIV-2 infection. *Lancet* 1:688-689.
34. Simon, F., S. Matheron, C. Tamalet, I. LouSSERT-Ajaka, S. Bartczak, J. M. Pepin, C. Dhiver, E. Gamba, C. Elbim, J. A. Gastaut, and et al. 1993. Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *Aids* 7:1411-1417.

35. Holmes, E. C. 2001. On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). *Biol Rev Camb Philos Soc* 76:239-254.
36. MWCHO, www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html, Consulté en juillet 2008
37. Pereira, L. A., K. Bentley, A. Peeters, M. J. Churchill, and N. J. Deacon. 2000. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* 28:663-668.
38. Gaynor, R. 1992. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *Aids* 6:347-363.
39. Rosen, C. A., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1985. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* 41:813-823.
40. Siekevitz, M., S. F. Josephs, M. Dukovich, N. Pfeffer, F. Wong-Staal, and W. C. Greene. 1987. Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the transactivator protein of HTLV-I. *Science* 238:1575-1578.
41. Stowell, D., www.mclld.co.uk, Consulté en juillet 2008
42. Gonda, M. A., F. Wong-Staal, R. C. Gallo, J. E. Clements, O. Narayan, and R. V. Gilden. 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227:173-177.
43. Encarta, www.encycarta.msn.com, Consulté en juillet 2008
44. Massiah, M. A., M. R. Starich, C. Paschall, M. F. Summers, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist. 1994. Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Mol Biol* 244:198-223.
45. Orenstein, J. M., M. S. Meltzer, T. Phipps, and H. E. Gendelman. 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol* 62:2578-2586.
46. Pelchen-Matthews, A., G. Raposo, and M. Marsh. 2004. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* 12:310-316.
47. Cosson, P. 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *Embo J* 15:5783-5788.
48. Murakami, T., and E. O. Freed. 2000. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol* 74:3548-3554.

49. Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, and M. Stevenson. 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365:666-669.
50. Gamble, T. R., S. Yoo, F. F. Vajdos, U. K. von Schwedler, D. K. Worthylake, H. Wang, J. P. McCutcheon, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. 1997. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 278:849-853.
51. Wiegers, K., G. Rutter, U. Schubert, M. Grattinger, and H. G. Krausslich. 1999. Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid. *Virology* 257:261-274.
52. Bess, J. W., Jr., P. J. Powell, H. J. Issaq, L. J. Schumack, M. K. Grimes, L. E. Henderson, and L. O. Arthur. 1992. Tightly bound zinc in human immunodeficiency virus type 1, human T-cell leukemia virus type I, and other retroviruses. *J Virol* 66:840-847.
53. South, T. L., P. R. Blake, R. C. Sowder, 3rd, L. O. Arthur, L. E. Henderson, and M. F. Summers. 1990. The nucleocapsid protein isolated from HIV-1 particles binds zinc and forms retroviral-type zinc fingers. *Biochemistry* 29:7786-7789.
54. Liu, B., R. Dai, C. J. Tian, L. Dawson, R. Gorelick, and X. F. Yu. 1999. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *J Virol* 73:2901-2908.
55. Rey, O., J. Canon, and P. Krogstad. 1996. HIV-1 Gag protein associates with F-actin present in microfilaments. *Virology* 220:530-534.
56. Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3195-3199.
57. Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin, and E. O. Freed. 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* 69:6810-6818.
58. Paxton, W., R. I. Connor, and N. R. Landau. 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol* 67:7229-7237.
59. Wu, X., J. A. Conway, J. Kim, and J. C. Kappes. 1994. Localization of the Vpx packaging signal within the C terminus of the human immunodeficiency virus type 2 Gag precursor protein. *J Virol* 68:6161-6169.

60. Stein, B. S., and E. G. Engleman. 1990. Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J Biol Chem* 265:2640-2649.
61. Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory. 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* 265:10373-10382.
62. Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-659.
63. Burton, D. R., and D. C. Montefiori. 1997. The antibody response in HIV-1 infection. *Aids* 11 Suppl A:S87-98.
64. Wyatt, R., J. Moore, M. Accola, E. Desjardin, J. Robinson, and J. Sodroski. 1995. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J Virol* 69:5723-5733.
65. Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, and J. Sodroski. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* 65:2119-2123.
66. White, J. M. 1992. Membrane fusion. *Science* 258:917-924.
67. Dorfman, T., F. Mammano, W. A. Haseltine, and H. G. Gottlinger. 1994. Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* 68:1689-1696.
68. Freed, E. O., and M. A. Martin. 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* 69:1984-1989.
69. Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T. H. Lee, and M. Essex. 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* 66:4966-4971.
70. Ott, D. E. 1997. Cellular proteins in HIV virions. *Rev Med Virol* 7:167-180.
71. Cantin, R., S. Methot, and M. J. Tremblay. 2005. Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J Virol* 79:6577-6587.
72. Seelamgari, A., A. Maddukuri, R. Berro, C. de la Fuente, K. Kehn, L. Deng, S. Dadgar, M. E. Bottazzi, E. Ghedin, A. Pumfery, and F. Kashanchi. 2004. Role of

- viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* 9:2388-2413.
73. Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin, and J. M. Orenstein. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 64:621-629.
 74. Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* 66:226-234.
 75. Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman. 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7311-7315.
 76. Lu, Y. L., P. Spearman, and L. Ratner. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* 67:6542-6550.
 77. Andersen, J. L., and V. Planelles. 2005. The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res* 3:43-51.
 78. Kino, T., A. Gragerov, A. Valentin, M. Tsopanomialou, G. Ilyina-Gragerova, R. Erwin-Cohen, G. P. Chrousos, and G. N. Pavlakis. 2005. Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. *J Virol* 79:2780-2787.
 79. Chowers, M. Y., C. A. Spina, T. J. Kwoh, N. J. Fitch, D. D. Richman, and J. C. Guatelli. 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol* 68:2906-2914.
 80. Goldsmith, M. A., M. T. Warmerdam, R. E. Atchison, M. D. Miller, and W. C. Greene. 1995. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol* 69:4112-4121.
 81. Garcia, J. V., and A. D. Miller. 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 350:508-511.
 82. Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J. M. Heard. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2:338-342.
 83. Bour, S., R. Geleziunas, and M. A. Wainberg. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev* 59:63-93.

84. Dalglish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-767.
85. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-768.
86. Maddon, P. J., A. G. Dalglish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47:333-348.
87. Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272:1955-1958.
88. Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85:1135-1148.
89. Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-666.
90. Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-877.
91. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270:1811-1815.
92. Rucker, J., A. L. Edinger, M. Sharron, M. Samson, B. Lee, J. F. Berson, Y. Yi, B. Margulies, R. G. Collman, B. J. Doranz, M. Parmentier, and R. W. Doms. 1997. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 71:8999-9007.
93. Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700.
94. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, A. Cara, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1996. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 2:1244-1247.

95. Farzan, M., H. Choe, L. Vaca, K. Martin, Y. Sun, E. Desjardins, N. Ruffing, L. Wu, R. Wyatt, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1998. A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5. *J Virol* 72:1160-1164.
96. Platt, E. J., S. E. Kuhmann, P. P. Rose, and D. Kabat. 2001. Adaptive mutations in the V3 loop of gp120 enhance fusogenicity of human immunodeficiency virus type 1 and enable use of a CCR5 coreceptor that lacks the amino-terminal sulfated region. *J Virol* 75:12266-12278.
97. Lapham, C. K., J. Ouyang, B. Chandrasekhar, N. Y. Nguyen, D. S. Dimitrov, and H. Golding. 1996. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 274:602-605.
98. Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon, and J. P. Moore. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384:184-187.
99. Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384:179-183.
100. Akbar, A. N., L. Terry, A. Timms, P. C. Beverley, and G. Janossy. 1988. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 140:2171-2178.
101. Merckenschlager, M., L. Terry, R. Edwards, and P. C. Beverley. 1988. Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur J Immunol* 18:1653-1661.
102. Macallan, D. C., D. Wallace, Y. Zhang, C. De Lara, A. T. Worth, H. Ghattas, G. E. Griffin, P. C. Beverley, and D. F. Tough. 2004. Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *J Exp Med* 200:255-260.
103. Farber, D. L. 2003. Remembrance of antigens past: new insights into memory T cells. *Scand J Immunol* 58:145-154.
104. Brenchley, J. M., B. J. Hill, D. R. Ambrozak, D. A. Price, F. J. Guenaga, J. P. Casazza, J. Kuruppu, J. Yazdani, S. A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup. 2004. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* 78:1160-1168.
105. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-763.

106. Askenasy, N., A. Kaminitz, and S. Yarkoni. 2008. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 7:370-375.
107. Korn, T., M. Oukka, V. Kuchroo, and E. Bettelli. 2007. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19:362-371.
108. Aujla, S. J., P. J. Dubin, and J. K. Kolls. 2007. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol* 19:377-382.
109. Kunkel, E. J., J. Boisvert, K. Murphy, M. A. Vierra, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, H. B. Greenberg, M. R. Hodge, L. Wu, E. C. Butcher, and J. J. Campbell. 2002. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol* 160:347-355.
110. Sanders, M. E., M. W. Makgoba, S. O. Sharrow, D. Stephany, T. A. Springer, H. A. Young, and S. Shaw. 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* 140:1401-1407.
111. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
112. Schnittman, S. M., H. C. Lane, J. Greenhouse, J. S. Justement, M. Baseler, and A. S. Fauci. 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* 87:6058-6062.
113. Cayota, A., F. Vuillier, D. Scott-Algara, V. Feuillie, and G. Dighiero. 1993. Differential requirements for HIV-1 replication in naive and memory CD4 T cells from asymptomatic HIV-1 seropositive carriers and AIDS patients. *Clin Exp Immunol* 91:241-248.
114. Cayota, A., F. Vuillier, D. Scott-Algara, and G. Dighiero. 1990. Preferential replication of HIV-1 in memory CD4+ subpopulation. *Lancet* 336:941.
115. Spina, C. A., H. E. Prince, and D. D. Richman. 1997. Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest* 99:1774-1785.
116. Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387:183-188.
117. Hermankova, M., J. D. Siliciano, Y. Zhou, D. Monie, K. Chadwick, J. B. Margolick, T. C. Quinn, and R. F. Siliciano. 2003. Analysis of human

- immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4⁺ T lymphocytes in vivo. *J Virol* 77:7383-7392.
118. Loetscher, P., M. Ugucioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser, C. Chizzolini, and J. M. Dayer. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-345.
 119. Verani, A., G. Gras, and G. Pancino. 2005. Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol* 42:195-212.
 120. Naif, H. M., S. Li, M. Alali, A. Sloane, L. Wu, M. Kelly, G. Lynch, A. Lloyd, and A. L. Cunningham. 1998. CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 72:830-836.
 121. Verani, A., E. Pesenti, S. Polo, E. Tresoldi, G. Scarlatti, P. Lusso, A. G. Siccardi, and D. Vercelli. 1998. CXCR4 is a functional coreceptor for infection of human macrophages by CXCR4-dependent primary HIV-1 isolates. *J Immunol* 161:2084-2088.
 122. Yi, Y., S. Rana, J. D. Turner, N. Gaddis, and R. G. Collman. 1998. CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:772-777.
 123. Schmidtmayerova, H., M. Alfano, G. Nuovo, and M. Bukrinsky. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 T-lymphotropic strains enter macrophages via a CD4- and CXCR4-mediated pathway: replication is restricted at a postentry level. *J Virol* 72:4633-4642.
 124. Lapham, C. K., M. B. Zaitseva, S. Lee, T. Romanstseva, and H. Golding. 1999. Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. *Nat Med* 5:303-308.
 125. Schmitt, M. P., J. L. Gendrault, C. Schweitzer, A. M. Steffan, C. Beyer, C. Royer, D. Jaeck, J. L. Pasquali, A. Kirn, and A. M. Aubertin. 1990. Permissivity of primary cultures of human Kupffer cells for HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6:987-991.
 126. Lewis, S. H., C. Reynolds-Kohler, H. E. Fox, and J. A. Nelson. 1990. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet* 335:565-568.
 127. Lee, S. C., W. C. Hatch, W. Liu, Y. Kress, W. D. Lyman, and D. W. Dickson. 1993. Productive infection of human fetal microglia by HIV-1. *Am J Pathol* 143:1032-1039.
 128. Martin, J. C., and J. C. Bandres. 1999. Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 22:413-429.

129. Alfano, M., and G. Poli. 2005. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol* 42:161-182.
130. Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. 2005. *Immunobiology*.
131. Steinman, R. M., A. Granelli-Piperno, M. Pope, C. Trumppfeller, R. Ignatius, G. Arrode, P. Racz, and K. Tenner-Racz. 2003. The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 276:1-30.
132. de Witte, L., A. Nabatov, M. Pion, D. Fluitsma, M. A. de Jong, T. de Gruijl, V. Piguet, Y. van Kooyk, and T. B. Geijtenbeek. 2007. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* 13:367-371.
133. Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stossel, N. Romani, M. Piatak, Jr., J. D. Lifson, M. Pope, and A. L. Cunningham. 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103:2170-2179.
134. Lambert, A. A., C. Gilbert, M. Richard, A. D. Beaulieu, and M. J. Tremblay. 2008. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 112:1299-1307.
135. Gummuluru, S., M. Rogel, L. Stamatatos, and M. Emerman. 2003. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to immature dendritic cells can occur independently of DC-SIGN and mannose binding C-type lectin receptors via a cholesterol-dependent pathway. *J Virol* 77:12865-12874.
136. Mommaas, A. M., A. A. Mulder, R. Jordens, C. Out, M. C. Tan, P. Cresswell, P. M. Kluin, and F. Koning. 1999. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol* 29:571-580.
137. Wang, J. H., A. M. Janas, W. J. Olson, and L. Wu. 2007. Functionally distinct transmission of human immunodeficiency virus type 1 mediated by immature and mature dendritic cells. *J Virol* 81:8933-8943.
138. Garcia, E., M. Pion, A. Pelchen-Matthews, L. Collinson, J. F. Arrighi, G. Blot, F. Leuba, J. M. Escola, N. Demaurex, M. Marsh, and V. Piguet. 2005. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* 6:488-501.
139. Izquierdo-Useros, N., J. Blanco, I. Erkizia, M. T. Fernandez-Figueras, F. E. Borrás, M. Naranjo-Gomez, M. Bofill, L. Ruiz, B. Clotet, and J. Martinez-Picado. 2007. Maturation of blood-derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type 1 capture and transmission. *J Virol* 81:7559-7570.

140. McDonald, D., L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, and T. J. Hope. 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300:1295-1297.
141. Cavrois, M., J. Neidleman, and W. C. Greene. 2008. The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog* 4:e1000051.
142. Olinger, G. G., M. Saifuddin, and G. T. Spear. 2000. CD4-Negative cells bind human immunodeficiency virus type 1 and efficiently transfer virus to T cells. *J Virol* 74:8550-8557.
143. Smith, J. A. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56:672-686.
144. Gabali, A. M., J. J. Anzinger, G. T. Spear, and L. L. Thomas. 2004. Activation by inflammatory stimuli increases neutrophil binding of human immunodeficiency virus type 1 and subsequent infection of lymphocytes. *J Virol* 78:10833-10836.
145. Dean, G. A., G. H. Reubel, and N. C. Pedersen. 1996. Simian immunodeficiency virus infection of CD8+ lymphocytes in vivo. *J Virol* 70:5646-5650.
146. Livingstone, W. J., M. Moore, D. Innes, J. E. Bell, and P. Simmonds. 1996. Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. *Lancet* 348:649-654.
147. Zerhouni, B., J. A. Nelson, and K. Saha. 2004. CXCR4-dependent infection of CD8+, but not CD4+, lymphocytes by a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol* 78:12288-12296.
148. Pahwa, S., R. Pahwa, R. A. Good, R. C. Gallo, and C. Saxinger. 1986. Stimulatory and inhibitory influences of human immunodeficiency virus on normal B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9124-9128.
149. 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* 309:453-458.
150. De Silva, F. S., D. S. Venturini, E. Wagner, P. R. Shank, and S. Sharma. 2001. CD4-independent infection of human B cells with HIV type 1: detection of unintegrated viral DNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1585-1598.
151. 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* 192:637-646.
152. Valentin, A., and G. N. Pavlakis. 2003. Natural killer cells are persistently infected and resistant to direct killing by HIV-1. *Anticancer Res* 23:2071-2075.

153. Chehimi, J., S. Bandyopadhyay, K. Prakash, B. Perussia, N. F. Hassan, H. Kawashima, D. Campbell, J. Kornbluth, and S. E. Starr. 1991. In vitro infection of natural killer cells with different human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* 65:1812-1822.
154. Dellabona, P., E. Padovan, G. Casorati, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. 1994. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* 180:1171-1176.
155. Exley, M., J. Garcia, S. P. Balk, and S. Porcelli. 1997. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med* 186:109-120.
156. Moutsinger, A., D. W. Haas, A. K. Stanic, L. Van Kaer, S. Joyce, and D. Unutmaz. 2002. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* 195:869-879.
157. Casale, T. B., D. Wood, H. B. Richerson, B. Zehr, D. Zavala, and G. W. Hunninghake. 1987. Direct evidence of a role for mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction. *J Clin Invest* 80:1507-1511.
158. Bannert, N., M. Farzan, D. S. Friend, H. Ochi, K. S. Price, J. Sodroski, and J. A. Boyce. 2001. Human Mast cell progenitors can be infected by macrophagetropic human immunodeficiency virus type 1 and retain virus with maturation in vitro. *J Virol* 75:10808-10814.
159. Han, Y., C. L. Ventura, K. P. Black, J. E. Cummins, Jr., S. D. Hall, and S. Jackson. 2000. Productive human immunodeficiency virus-1 infection of epithelial cell lines of salivary gland origin. *Oral Microbiol Immunol* 15:82-88.
160. Bomsel, M., and V. David. 2002. Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection. *Nat Med* 8:114-116.
161. Dwinell, M. B., L. Eckmann, J. D. Leopard, N. M. Varki, and M. F. Kagnoff. 1999. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 117:359-367.
162. Bobardt, M. D., A. C. Saphire, H. C. Hung, X. Yu, B. Van der Schueren, Z. Zhang, G. David, and P. A. Gallay. 2003. Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity* 18:27-39.
163. 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* 277:25649-25659.
164. Mondor, I., S. Ugolini, and Q. J. Sattentau. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* 72:3623-3634.

165. Dezzutti, C. S., P. C. Guenther, J. E. Cummins, Jr., T. Cabrera, J. H. Marshall, A. Dillberger, and R. B. Lal. 2001. Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 183:1204-1213.
166. Vidricaire, G., M. Imbeault, and M. J. Tremblay. 2004. Endocytic host cell machinery plays a dominant role in intracellular trafficking of incoming human immunodeficiency virus type 1 in human placental trophoblasts. *J Virol* 78:11904-11915.
167. Vidricaire, G., M. R. Tardif, and M. J. Tremblay. 2003. The low viral production in trophoblastic cells is due to a high endocytic internalization of the human immunodeficiency virus type 1 and can be overcome by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Biol Chem* 278:15832-15841.
168. Lagaye, S., M. Derrien, E. Menu, C. Coito, E. Tresoldi, P. Mauclore, G. Scarlatti, G. Chaouat, F. Barre-Sinoussi, and M. Bomsel. 2001. Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol* 75:4780-4791.
169. Hazan, U., I. A. Romero, R. Canello, S. Valente, V. Perrin, V. Mariot, J. Dumonceaux, C. C. Gerhardt, A. D. Strosberg, P. O. Couraud, and F. Pietri-Rouxel. 2002. Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 [corrected] receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1? *Faseb J* 16:1254-1256.
170. Bouzier-Sore, A. K., M. Merle, P. J. Magistretti, and L. Pellerin. 2002. Feeding active neurons: (re)emergence of a nursing role for astrocytes. *J Physiol Paris* 96:273-282.
171. Perea, G., and A. Araque. 2002. Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *J Physiol Paris* 96:199-207.
172. Price, R. W., B. Brew, J. Sidtis, M. Rosenblum, A. C. Scheck, and P. Cleary. 1988. The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* 239:586-592.
173. Ranki, A., M. Nyberg, V. Ovod, M. Haltia, I. Elovaara, R. Raininko, H. Haapasalo, and K. Krohn. 1995. Abundant expression of HIV Nef and Rev proteins in brain astrocytes in vivo is associated with dementia. *Aids* 9:1001-1008.
174. Tornatore, C., R. Chandra, J. R. Berger, and E. O. Major. 1994. HIV-1 infection of subcortical astrocytes in the pediatric central nervous system. *Neurology* 44:481-487.
175. Wiley, C. A., R. D. Schrier, J. A. Nelson, P. W. Lampert, and M. B. Oldstone. 1986. Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains

- of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7089-7093.
176. He, J., Y. Chen, M. Farzan, H. Choe, A. Ohagen, S. Gartner, J. Busciglio, X. Yang, W. Hofmann, W. Newman, C. R. Mackay, J. Sodroski, and D. Gabuzda. 1997. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 385:645-649.
 177. Rottman, J. B., K. P. Ganley, K. Williams, L. Wu, C. R. Mackay, and D. J. Ringler. 1997. Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am J Pathol* 151:1341-1351.
 178. Liu, Y., H. Liu, B. O. Kim, V. H. Gattone, J. Li, A. Nath, J. Blum, and J. J. He. 2004. CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol* 78:4120-4133.
 179. Sattentau, Q. J., J. P. Moore, F. Vignaux, F. Traincard, and P. Poignard. 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol* 67:7383-7393.
 180. Moebius, U., L. K. Clayton, S. Abraham, S. C. Harrison, and E. L. Reinherz. 1992. The human immunodeficiency virus gp120 binding site on CD4: delineation by quantitative equilibrium and kinetic binding studies of mutants in conjunction with a high-resolution CD4 atomic structure. *J Exp Med* 176:507-517.
 181. Kwong, P. D., R. Wyatt, Q. J. Sattentau, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 2000. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* 74:1961-1972.
 182. Ugolini, S., I. Mondor, and Q. J. Sattentau. 1999. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* 7:144-149.
 183. Staropoli, I., C. Chanel, M. Girard, and R. Altmeyer. 2000. Processing, stability, and receptor binding properties of oligomeric envelope glycoprotein from a primary HIV-1 isolate. *J Biol Chem* 275:35137-35145.
 184. Moulard, M., H. Lortat-Jacob, I. Mondor, G. Roca, R. Wyatt, J. Sodroski, L. Zhao, W. Olson, P. D. Kwong, and Q. J. Sattentau. 2000. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 74:1948-1960.
 185. Larkin, M., R. A. Childs, T. J. Matthews, S. Thiel, T. Mizuochi, A. M. Lawson, J. S. Savill, C. Haslett, R. Diaz, and T. Feizi. 1989. Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *Aids* 3:793-798.

186. Gadella, B. M., D. Hammache, G. Pieroni, B. Colenbrander, L. M. van Golde, and J. Fantini. 1998. Glycolipids as potential binding sites for HIV: topology in the sperm plasma membrane in relation to the regulation of membrane fusion. *J Reprod Immunol* 41:233-253.
187. Curtis, B. M., S. Scharnowske, and A. J. Watson. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8356-8360.
188. Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597.
189. Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585.
190. Pohlmann, S., E. J. Soilleux, F. Baribaud, G. J. Leslie, L. S. Morris, J. Trowsdale, B. Lee, N. Coleman, and R. W. Doms. 2001. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2670-2675.
191. Nguyen, D. G., and J. E. Hildreth. 2003. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur J Immunol* 33:483-493.
192. Saphire, A. C., M. D. Bobardt, and P. A. Gallay. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 hijacks host cyclophilin A for its attachment to target cells. *Immunol Res* 21:211-217.
193. 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* 77:12299-12309.
194. Ouellet, M., S. Mercier, I. Pelletier, S. Bounou, J. Roy, J. Hirabayashi, S. Sato, and M. J. Tremblay. 2005. Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. *J Immunol* 174:4120-4126.
195. Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert, and F. S. Cohen. 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* 151:413-423.

196. Fenouillet, E., R. Barbouche, J. Courageot, and R. Miquelis. 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* 183:744-752.
197. Doms, R. W. 2000. Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology* 276:229-237.
198. Lee, B., M. Sharron, L. J. Montaner, D. Weissman, and R. W. Doms. 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5215-5220.
199. Janes, P. W., S. C. Ley, and A. I. Magee. 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 147:447-461.
200. Millan, J., J. Cerny, V. Horejsi, and M. A. Alonso. 1999. CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains. *Tissue Antigens* 53:33-40.
201. Parolini, I., S. Topa, M. Sorice, A. Pace, P. Ceddia, E. Montesoro, A. Pavan, M. P. Lisanti, C. Peschle, and M. Sargiacomo. 1999. Phorbol ester-induced disruption of the CD4-Lck complex occurs within a detergent-resistant microdomain of the plasma membrane. Involvement of the translocation of activated protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 274:14176-14187.
202. Kozak, S. L., J. M. Heard, and D. Kabat. 2002. Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol* 76:1802-1815.
203. Popik, W., T. M. Alce, and W. C. Au. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* 76:4709-4722.
204. Chazal, N., and D. Gerlier. 2003. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:226-237, table of contents.
205. Schaeffer, E., V. B. Soros, and W. C. Greene. 2004. Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. *J Virol* 78:1375-1383.
206. Grewe, C., A. Beck, and H. R. Gelderblom. 1990. HIV: early virus-cell interactions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3:965-974.
207. Marechal, V., F. Clavel, J. M. Heard, and O. Schwartz. 1998. Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:2208-2212.

208. Blauvelt, A., H. Asada, M. W. Saville, V. Klaus-Kovtun, D. J. Altman, R. Yarchoan, and S. I. Katz. 1997. Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J Clin Invest* 100:2043-2053.
209. Granelli-Piperno, A., E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, and R. M. Steinman. 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* 72:2733-2737.
210. Marechal, V., M. C. Prevost, C. Petit, E. Perret, J. M. Heard, and O. Schwartz. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* 75:11166-11177.
211. Kwon, D. S., G. Gregorio, N. Bitton, W. A. Hendrickson, and D. R. Littman. 2002. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16:135-144.
212. Cambi, A., F. de Lange, N. M. van Maarseveen, M. Nijhuis, B. Joosten, E. M. van Dijk, B. I. de Bakker, J. A. Fransen, P. H. Bovee-Geurts, F. N. van Leeuwen, N. F. Van Hulst, and C. G. Figdor. 2004. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol* 164:145-155.
213. Piguet, V., and Q. Sattentau. 2004. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* 114:605-610.
214. Bomsel, M. 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 3:42-47.
215. Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, and P. Charneau. 2006. Wild-type and central DNA flap defective HIV-1 lentiviral vector genomes: intracellular visualization at ultrastructural resolution levels. *Retrovirology* 3:38.
216. Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, S. Munier, P. Souque, S. Guadagnini, S. Rutherford, M. C. Prevost, T. D. Allen, and P. Charneau. 2007. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J* 26:3025-3037.
217. Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban. 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372:359-362.
218. Lu, X., H. Yu, S. H. Liu, F. M. Brodsky, and B. M. Peterlin. 1998. Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity* 8:647-656.
219. Marquet, R., C. Isel, C. Ehresmann, and B. Ehresmann. 1995. tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie* 77:113-124.

220. Mak, J., and L. Kleiman. 1997. Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* 71:8087-8095.
221. Arts, E. J., and S. F. Le Grice. 1998. Interaction of retroviral reverse transcriptase with template-primer duplexes during replication. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58:339-393.
222. Huthoff, H., K. Bugala, J. Barciszewski, and B. Berkhout. 2003. On the importance of the primer activation signal for initiation of tRNA(lys3)-primed reverse transcription of the HIV-1 RNA genome. *Nucleic Acids Res* 31:5186-5194.
223. von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, and D. Trono. 1994. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6992-6996.
224. Gallay, P., T. Hope, D. Chin, and D. Trono. 1997. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9825-9830.
225. Gallay, P., V. Stitt, C. Mundy, M. Oettinger, and D. Trono. 1996. Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol* 70:1027-1032.
226. Adam, S. A., and L. Gerace. 1991. Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* 66:837-847.
227. Gorlich, D., S. Kostka, R. Kraft, C. Dingwall, R. A. Laskey, E. Hartmann, and S. Prehn. 1995. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* 5:383-392.
228. Enenkel, C., G. Blobel, and M. Rexach. 1995. Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* 270:16499-16502.
229. Popov, S., M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M. A. Lee, L. Ratner, C. M. Lane, M. S. Moore, G. Blobel, and M. Bukrinsky. 1998. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* 17:909-917.
230. Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1989. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2525-2529.
231. Fujiwara, T., and K. Mizuuchi. 1988. Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell* 54:497-504.
232. Wu, Y. 2004. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* 1:13.

233. Jordan, A., D. Bisgrove, and E. Verdin. 2003. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *Embo J* 22:1868-1877.
234. Dayton, A. I., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. C. Goh, and W. A. Haseltine. 1986. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* 44:941-947.
235. Fisher, A. G., M. B. Feinberg, S. F. Josephs, M. E. Harper, L. M. Marselle, G. Reyes, M. A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouk, R. C. Gallo, and et al. 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 320:367-371.
236. 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* 67:6365-6378.
237. Pollard, V. W., and M. H. Malim. 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52:491-532.
238. Stevenson, M., T. L. Stanwick, M. P. Dempsey, and C. A. Lamonica. 1990. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *Embo J* 9:1551-1560.
239. Spina, C. A., J. C. Guatelli, and D. D. Richman. 1995. Establishment of a stable, inducible form of human immunodeficiency virus type 1 DNA in quiescent CD4 lymphocytes in vitro. *J Virol* 69:2977-2988.
240. Panther, L. A., R. W. Coombs, J. E. Zeh, A. C. Collier, and L. Corey. 1998. Unintegrated circular HIV-1 DNA in the peripheral mononuclear cells of HIV-1-infected subjects: association with high levels of plasma HIV-1 RNA, rapid decline in CD4 count, and clinical progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 17:303-313.
241. Freed, E. O. 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251:1-15.
242. Muller, B., U. Tessmer, U. Schubert, and H. G. Krausslich. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J Virol* 74:9727-9731.
243. Bouyac, M., M. Courcoul, G. Bertoia, Y. Baudat, D. Gabuzda, D. Blanc, N. Chazal, P. Boulanger, J. Sire, R. Vigne, and B. Spire. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor. *J Virol* 71:9358-9365.
244. Simon, J. H., N. C. Gaddis, R. A. Fouchier, and M. H. Malim. 1998. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med* 4:1397-1400.

245. Kootstra, N. A., C. Munk, N. Tonnu, N. R. Landau, and I. M. Verma. 2003. Abrogation of postentry restriction of HIV-1-based lentiviral vector transduction in simian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1298-1303.
246. Zimmerman, C., K. C. Klein, P. K. Kiser, A. R. Singh, B. L. Firestein, S. C. Riba, and J. R. Lingappa. 2002. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* 415:88-92.
247. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz. 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7:1313-1319.
248. Brown, D. 2002. Structure and function of membrane rafts. *Int J Med Microbiol* 291:433-437.
249. Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh. 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162:443-455.
250. Raposo, G., M. Moore, D. Innes, R. Leijendekker, A. Leigh-Brown, P. Benaroch, and H. Geuze. 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3:718-729.
251. Nydegger, S., M. Foti, A. Derdowski, P. Spearman, and M. Thali. 2003. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* 4:902-910.
252. Nguyen, D. G., A. Booth, S. J. Gould, and J. E. Hildreth. 2003. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* 278:52347-52354.
253. 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* 78:11916-11925.
254. 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* 324:165-172.
255. 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* 335:286-290.
256. 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* 74:3264-3272.
257. Garnier, L., J. B. Bowzard, and J. W. Wills. 1998. Recent advances and remaining problems in HIV assembly. *Aids* 12 Suppl A:S5-16.

258. Garoff, H., R. Hewson, and D. J. Opstelten. 1998. Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1171-1190.
259. Wilk, T., and S. D. Fuller. 1999. Towards the structure of the human immunodeficiency virus: divide and conquer. *Curr Opin Struct Biol* 9:231-243.
260. Myers, E. L., and J. F. Allen. 2002. Tsg101, an inactive homologue of ubiquitin ligase e2, interacts specifically with human immunodeficiency virus type 2 gag polyprotein and results in increased levels of ubiquitinated gag. *J Virol* 76:11226-11235.
261. Freed, E. O. 2002. Viral late domains. *J Virol* 76:4679-4687.
262. Gross, I., H. Hohenberg, T. Wilk, K. Wieggers, M. Grattinger, B. Muller, S. Fuller, and H. G. Krausslich. 2000. A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *Embo J* 19:103-113.
263. Shehu-Xhilaga, M., H. G. Kraeusslich, S. Pettit, R. Swanstrom, J. Y. Lee, J. A. Marshall, S. M. Crowe, and J. Mak. 2001. Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *J Virol* 75:9156-9164.
264. Lee, K., and V. N. KewalRamani. 2004. In defense of the cell: TRIM5alpha interception of mammalian retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10496-10497.
265. Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427:848-853.
266. Sebastian, S., and J. Luban. 2005. TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid. *Retrovirology* 2:40.
267. Stremlau, M., M. Perron, M. Lee, Y. Li, B. Song, H. Javanbakht, F. Diaz-Griffero, D. J. Anderson, W. I. Sundquist, and J. Sodroski. 2006. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5514-5519.
268. Madani, N., and D. Kabat. 1998. An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J Virol* 72:10251-10255.
269. Cullen, B. R. 2006. Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol* 80:1067-1076.
270. Harris, R. S., and M. T. Liddament. 2004. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 4:868-877.

271. Harris, R. S., K. N. Bishop, A. M. Sheehy, H. M. Craig, S. K. Petersen-Mahrt, I. N. Watt, M. S. Neuberger, and M. H. Malim. 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113:803-809.
272. Lecossier, D., F. Bouchonnet, F. Clavel, and A. J. Hance. 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* 300:1112.
273. Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono. 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424:99-103.
274. Mariani, R., D. Chen, B. Schrofelbauer, F. Navarro, R. Konig, B. Bollman, C. Munk, H. Nymark-McMahon, and N. R. Landau. 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114:21-31.
275. Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam, and L. Gao. 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424:94-98.
276. Yu, X., Y. Yu, B. Liu, K. Luo, W. Kong, P. Mao, and X. F. Yu. 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302:1056-1060.
277. Conticello, S. G., R. S. Harris, and M. S. Neuberger. 2003. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* 13:2009-2013.
278. Kao, S., M. A. Khan, E. Miyagi, R. Plishka, A. Buckler-White, and K. Strebel. 2003. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* 77:11398-11407.
279. Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim. 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9:1404-1407.
280. Cen, S., F. Guo, M. Niu, J. Saadatmand, J. Deflassieux, and L. Kleiman. 2004. The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* 279:33177-33184.
281. Luo, K., B. Liu, Z. Xiao, Y. Yu, X. Yu, R. Gorelick, and X. F. Yu. 2004. Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging. *J Virol* 78:11841-11852.
282. Zennou, V., D. Perez-Caballero, H. Gottlinger, and P. D. Bieniasz. 2004. APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 78:12058-12061.

283. Gupta, P., K. B. Collins, D. Ratner, S. Watkins, G. J. Naus, D. V. Landers, and B. K. Patterson. 2002. Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. *J Virol* 76:9868-9876.
284. Collins, K. B., B. K. Patterson, G. J. Naus, D. V. Landers, and P. Gupta. 2000. Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. *Nat Med* 6:475-479.
285. Kahn, J. O., and B. D. Walker. 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339:33-39.
286. Daar, E. S., S. Little, J. Pitt, J. Santangelo, P. Ho, N. Harawa, P. Kerndt, J. V. Glorgi, J. Bai, P. Gaut, D. D. Richman, S. Mandel, and S. Nichols. 2001. Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network. *Ann Intern Med* 134:25-29.
287. Heberling, R. L., S. S. Kalter, P. A. Marx, J. K. Lowry, and A. R. Rodriguez. 1988. Dot immunobinding assay compared with enzyme-linked immunosorbent assay for rapid and specific detection of retrovirus antibody induced by human or simian acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 26:765-767.
288. Gaines, H., M. von Sydow, P. O. Pehrson, and P. Lundbegh. 1988. Clinical picture of primary HIV infection presenting as a glandular-fever-like illness. *Bmj* 297:1363-1368.
289. Lindback, S., A. C. Karlsson, J. Mittler, A. Blaxhult, M. Carlsson, G. Briheim, A. Sonnerborg, and H. Gaines. 2000. Viral dynamics in primary HIV-1 infection. Karolinska Institutet Primary HIV Infection Study Group. *Aids* 14:2283-2291.
290. Lyles, R. H., A. Munoz, T. E. Yamashita, H. Bazmi, R. Detels, C. R. Rinaldo, J. B. Margolick, J. P. Phair, and J. W. Mellors. 2000. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis* 181:872-880.
291. Buchbinder, S., and E. Vittinghoff. 1999. HIV-infected long-term nonprogressors: epidemiology, mechanisms of delayed progression, and clinical and research implications. *Microbes Infect* 1:1113-1120.
292. Mellors, J. W., L. A. Kingsley, C. R. Rinaldo, Jr., J. A. Todd, B. S. Hoo, R. P. Kokka, and P. Gupta. 1995. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 122:573-579.
293. Markowitz, M., H. Mohri, S. Mehandru, A. Shet, L. Berry, R. Kalyanaraman, A. Kim, C. Chung, P. Jean-Pierre, A. Horowitz, M. La Mar, T. Wrin, N. Parkin, M. Poles, C. Petropoulos, M. Mullen, D. Boden, and D. D. Ho. 2005. Infection with

- multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report. *Lancet* 365:1031-1038.
294. Munoz, A., C. A. Sabin, and A. N. Phillips. 1997. The incubation period of AIDS. *Aids* 11 Suppl A:S69-76.
295. Phair, J., L. Jacobson, R. Detels, C. Rinaldo, A. Saah, L. Schragar, and A. Munoz. 1992. Acquired immune deficiency syndrome occurring within 5 years of infection with human immunodeficiency virus type-1: the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 5:490-496.
296. Clark, S. J., M. S. Saag, W. D. Decker, S. Campbell-Hill, J. L. Roberson, P. J. Veldkamp, J. C. Kappes, B. H. Hahn, and G. M. Shaw. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 324:954-960.
297. Kuritzkes, D. R., S. Bell, and M. Bakhtiari. 1994. Rapid CD4+ cell decline after sexual transmission of a zidovudine-resistant syncytium-inducing isolate of HIV-1. *Aids* 8:1017-1019.
298. Yu, X. F., Z. Wang, D. Vlahov, R. B. Markham, H. Farzadegan, and J. B. Margolick. 1998. Infection with dual-tropic human immunodeficiency virus type 1 variants associated with rapid total T cell decline and disease progression in injection drug users. *J Infect Dis* 178:388-396.
299. Hellerstein, M., M. B. Hanley, D. Cesar, S. Siler, C. Papageorgopoulos, E. Wieder, D. Schmidt, R. Hoh, R. Neese, D. Macallan, S. Deeks, and J. M. McCune. 1999. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med* 5:83-89.
300. Hazenberg, M. D., J. W. Stuart, S. A. Otto, J. C. Borleffs, C. A. Boucher, R. J. de Boer, F. Miedema, and D. Hamann. 2000. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 95:249-255.
301. Valdez, H., and M. M. Lederman. 1997. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin Rev*:187-228.
302. Giorgi, J. V., L. E. Hultin, J. A. McKeating, T. D. Johnson, B. Owens, L. P. Jacobson, R. Shih, J. Lewis, D. J. Wiley, J. P. Phair, S. M. Wolinsky, and R. Detels. 1999. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 179:859-870.
303. Brenchley, J. M., D. A. Price, and D. C. Douek. 2006. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 7:235-239.

304. Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, W. E. Paul, and L. J. Picker. 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12:289-295.
305. Mattapallil, J. J., D. C. Douek, B. Hill, Y. Nishimura, M. Martin, and M. Roederer. 2005. Massive infection and loss of memory CD4⁺ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434:1093-1097.
306. Veazey, R. S., M. DeMaria, L. V. Chalifoux, D. E. Shvetz, D. R. Pauley, H. L. Knight, M. Rosenzweig, R. P. Johnson, R. C. Desrosiers, and A. A. Lackner. 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4⁺ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280:427-431.
307. Mehandru, S., M. A. Poles, K. Tenner-Racz, A. Horowitz, A. Hurley, C. Hogan, D. Boden, P. Racz, and M. Markowitz. 2004. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200:761-770.
308. Cooke, K. R., K. Olkiewicz, N. Erickson, and J. L. Ferrara. 2002. The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease. *J Endotoxin Res* 8:441-448.
309. Macpherson, A. J., and N. L. Harris. 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4:478-485.
310. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
311. Schietroma, M., F. Carlei, S. Cappelli, and G. Amicucci. 2006. Intestinal permeability and systemic endotoxemia after laparotomic or laparoscopic cholecystectomy. *Ann Surg* 243:359-363.
312. Sankaran, S., M. Guadalupe, E. Reay, M. D. George, J. Flamm, T. Prindiville, and S. Dandekar. 2005. Gut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-infected nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9860-9865.
313. Decrion, A. Z., I. Dichamp, A. Varin, and G. Herbein. 2005. HIV and inflammation. *Curr HIV Res* 3:243-259.
314. Stockmann, M., H. Schmitz, M. Fromm, W. Schmidt, G. Pauli, P. Scholz, E. O. Riecken, and J. D. Schulzke. 2000. Mechanisms of epithelial barrier impairment in HIV infection. *Ann N Y Acad Sci* 915:293-303.
315. Buchbinder, S. P., M. H. Katz, N. A. Hessel, P. M. O'Malley, and S. D. Holmberg. 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids* 8:1123-1128.

316. Cao, Y., L. Qin, L. Zhang, J. Safrit, and D. D. Ho. 1995. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 332:201-208.
317. Baltimore, D. 1995. Lessons from people with nonprogressive HIV infection. *N Engl J Med* 332:259-260.
318. Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker, and D. Baltimore. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391:397-401.
319. Le Gall, S., L. Erdtmann, S. Benichou, C. Berlioz-Torrent, L. Liu, R. Benarous, J. M. Heard, and O. Schwartz. 1998. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* 8:483-495.
320. Rowland-Jones, S., R. Tan, and A. McMichael. 1997. Role of cellular immunity in protection against HIV infection. *Adv Immunol* 65:277-346.
321. McMichael, A. 1998. T cell responses and viral escape. *Cell* 93:673-676.
322. Couillin, I., B. Culmann-Penciolelli, E. Gomard, J. Choppin, J. P. Levy, J. G. Guillet, and S. Saragosti. 1994. Impaired cytotoxic T lymphocyte recognition due to genetic variations in the main immunogenic region of the human immunodeficiency virus 1 NEF protein. *J Exp Med* 180:1129-1134.
323. Masur, H., F. P. Ognibene, R. Yarchoan, J. H. Shelhamer, B. F. Baird, W. Travis, A. F. Suffredini, L. Deyton, J. A. Kovacs, J. Falloon, and et al. 1989. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 111:223-231.
324. Fischl, M. A., D. D. Richman, M. H. Grieco, M. S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. E. Groopman, D. Mildvan, R. T. Schooley, and et al. 1987. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 317:185-191.
325. Meng, T. C., M. A. Fischl, A. M. Boota, S. A. Spector, D. Bennett, Y. Bassiakos, S. H. Lai, B. Wright, and D. D. Richman. 1992. Combination therapy with zidovudine and dideoxycytidine in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. A phase I/II study. *Ann Intern Med* 116:13-20.
326. Schooley, R. T., C. Ramirez-Ronda, J. M. Lange, D. A. Cooper, J. Lavelle, L. Lefkowitz, M. Moore, B. A. Larder, M. St Clair, J. W. Mulder, R. McKinnis, K. N. Pennington, P. R. Harrigan, I. Kinghorn, H. Steel, and J. F. Rooney. 1996. Virologic and immunologic benefits of initial combination therapy with zidovudine and zalcitabine or didanosine compared with zidovudine monotherapy. Wellcome Resistance Study Collaborative Group. *J Infect Dis* 173:1354-1366.

327. Cheeseman, S. H., D. Havlir, M. M. McLaughlin, T. C. Greenough, J. L. Sullivan, D. Hall, S. E. Hattox, S. A. Spector, D. S. Stein, M. Myers, and et al. 1995. Phase I/II evaluation of nevirapine alone and in combination with zidovudine for infection with human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 8:141-151.
328. D'Aquila, R. T., M. D. Hughes, V. A. Johnson, M. A. Fischl, J. P. Sommadossi, S. H. Liou, J. Timpone, M. Myers, N. Basgoz, M. Niu, and M. S. Hirsch. 1996. Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Intern Med* 124:1019-1030.
329. Havlir, D., S. H. Cheeseman, M. McLaughlin, R. Murphy, A. Erice, S. A. Spector, T. C. Greenough, J. L. Sullivan, D. Hall, M. Myers, and et al. 1995. High-dose nevirapine: safety, pharmacokinetics, and antiviral effect in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 171:537-545.
330. Gulick, R. M., J. W. Mellors, D. Havlir, J. J. Eron, C. Gonzalez, D. McMahon, D. D. Richman, F. T. Valentine, L. Jonas, A. Meibohm, E. A. Emini, and J. A. Chodakewitz. 1997. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 337:734-739.
331. Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-126.
332. Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard, and D. D. Ho. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271:1582-1586.
333. Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, and et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117-122.
334. Havlir, D. V., and D. D. Richman. 1996. Viral dynamics of HIV: implications for drug development and therapeutic strategies. *Ann Intern Med* 124:984-994.
335. Schooley, R. T. 1990. Cytomegalovirus in the setting of infection with human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 7:S811-819.
336. Turner, S., R. Tizard, J. DeMarinis, R. B. Pepinsky, J. Zullo, R. Schooley, and R. Fisher. 1992. Resistance of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 to neutralization by soluble CD4 is not due to lower affinity with the viral envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1335-1339.

337. Hecht, F. M., M. P. Busch, B. Rawal, M. Webb, E. Rosenberg, M. Swanson, M. Chesney, J. Anderson, J. Levy, and J. O. Kahn. 2002. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *Aids* 16:1119-1129.
338. Lin, P. F., W. Blair, T. Wang, T. Spicer, Q. Guo, N. Zhou, Y. F. Gong, H. G. Wang, R. Rose, G. Yamanaka, B. Robinson, C. B. Li, R. Fridell, C. Deminie, G. Demers, Z. Yang, L. Zadjura, N. Meanwell, and R. Colonna. 2003. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11013-11018.
339. Dorr, P., M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood, and M. Perros. 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4721-4732.
340. Fatkenheuer, G., A. L. Pozniak, M. A. Johnson, A. Plettenberg, S. Staszewski, A. I. Hoepelman, M. S. Saag, F. D. Goebel, J. K. Rockstroh, B. J. Dezube, T. M. Jenkins, C. Medhurst, J. F. Sullivan, C. Ridgway, S. Abel, I. T. James, M. Youle, and E. van der Ryst. 2005. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med* 11:1170-1172.
341. Lalezari, J., M. Thompson, P. Kumar, P. Piliero, R. Davey, K. Patterson, A. Shachoy-Clark, K. Adkison, J. Demarest, Y. Lou, M. Berrey, and S. Piscitelli. 2005. Antiviral activity and safety of 873140, a novel CCR5 antagonist, during short-term monotherapy in HIV-infected adults. *Aids* 19:1443-1448.
342. Strizki, J. M., S. Xu, N. E. Wagner, L. Wojcik, J. Liu, Y. Hou, M. Endres, A. Palani, S. Shapiro, J. W. Clader, W. J. Greenlee, J. R. Tagat, S. McCombie, K. Cox, A. B. Fawzi, C. C. Chou, C. Pugliese-Sivo, L. Davies, M. E. Moreno, D. D. Ho, A. Trkola, C. A. Stoddart, J. P. Moore, G. R. Reyes, and B. M. Baroudy. 2001. SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12718-12723.
343. Kuritzkes, D. R., J. Jacobson, W. G. Powderly, E. Godofsky, E. DeJesus, F. Haas, K. A. Reimann, J. L. Larson, P. O. Yarbough, V. Curt, and W. R. Shanahan, Jr. 2004. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis* 189:286-291.
344. Lalezari, J. P., K. Henry, M. O'Hearn, J. S. Montaner, P. J. Piliero, B. Trottier, S. Walmsley, C. Cohen, D. R. Kuritzkes, J. J. Eron, Jr., J. Chung, R. DeMasi, L. Donatucci, C. Drobnes, J. Delehanty, and M. Salgo. 2003. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med* 348:2175-2185.

345. Wild, C., T. Greenwell, D. Shugars, L. Rimsky-Clarke, and T. Matthews. 1995. The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11:323-325.
346. Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews. 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9770-9774.
347. Parker, W. B., E. L. White, S. C. Shaddix, L. J. Ross, R. W. Buckheit, Jr., J. M. Germany, J. A. Secrist, 3rd, R. Vince, and W. M. Shannon. 1991. Mechanism of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and human DNA polymerases alpha, beta, and gamma by the 5'-triphosphates of carbovir, 3'-azido-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxyguanosine and 3'-deoxythymidine. A novel RNA template for the evaluation of antiretroviral drugs. *J Biol Chem* 266:1754-1762.
348. Esnouf, R., J. Ren, C. Ross, Y. Jones, D. Stammers, and D. Stuart. 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* 2:303-308.
349. Spence, R. A., W. M. Kati, K. S. Anderson, and K. A. Johnson. 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* 267:988-993.
350. Flexner, C. 1998. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med* 338:1281-1292.
351. Johnson, M., B. Grinsztejn, C. Rodriguez, J. Coco, E. DeJesus, A. Lazzarin, K. Lichtenstein, V. Wirtz, A. Rightmire, L. Odeshoo, and C. McLaren. 2006. 96-week comparison of once-daily atazanavir/ritonavir and twice-daily lopinavir/ritonavir in patients with multiple virologic failures. *Aids* 20:711-718.
352. Patick, A. K., and K. E. Potts. 1998. Protease inhibitors as antiviral agents. *Clin Microbiol Rev* 11:614-627.
353. Sayana, S., and H. Khanlou. 2008. Raltegravir: the first in a new class of integrase inhibitors for the treatment of HIV. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6:419-426.
354. Pomerantz, R. J., and D. L. Horn. 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med* 9:867-873.
355. Richman, D. D., M. A. Fischl, M. H. Grieco, M. S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. E. Groopman, D. Mildvan, M. S. Hirsch, and et al. 1987. The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 317:192-197.

356. Blum, A. S., G. J. Dal Pan, J. Feinberg, C. Raines, K. Mayjo, D. R. Cornblath, and J. C. McArthur. 1996. Low-dose zalcitabine-related toxic neuropathy: frequency, natural history, and risk factors. *Neurology* 46:999-1003.
357. Fichtenbaum, C. J., D. B. Clifford, and W. G. Powderly. 1995. Risk factors for dideoxynucleoside-induced toxic neuropathy in patients with the human immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 10:169-174.
358. Moore, R. D., W. M. Wong, J. C. Keruly, and J. C. McArthur. 2000. Incidence of neuropathy in HIV-infected patients on monotherapy versus those on combination therapy with didanosine, stavudine and hydroxyurea. *Aids* 14:273-278.
359. Hetherington, S., S. McGuirk, G. Powell, A. Cutrell, O. Naderer, B. Spreen, S. Lafon, G. Pearce, and H. Steel. 2001. Hypersensitivity reactions during therapy with the nucleoside reverse transcriptase inhibitor abacavir. *Clin Ther* 23:1603-1614.
360. Mallal, S., D. Nolan, C. Witt, G. Masel, A. M. Martin, C. Moore, D. Sayer, A. Castley, C. Mamotte, D. Maxwell, I. James, and F. T. Christiansen. 2002. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 359:727-732.
361. Martin, A. M., D. Nolan, S. Gaudieri, C. A. Almeida, R. Nolan, I. James, F. Carvalho, E. Phillips, F. T. Christiansen, A. W. Purcell, J. McCluskey, and S. Mallal. 2004. Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4180-4185.
362. Phillips, E. J., G. A. Wong, R. Kaul, K. Shahabi, D. A. Nolan, S. R. Knowles, A. M. Martin, S. A. Mallal, and N. H. Shear. 2005. Clinical and immunogenetic correlates of abacavir hypersensitivity. *Aids* 19:979-981.
363. Carr, A., K. Samaras, S. Burton, M. Law, J. Freund, D. J. Chisholm, and D. A. Cooper. 1998. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *Aids* 12:F51-58.
364. Kakuda, T. N. 2000. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther* 22:685-708.
365. Sulkowski, M. S., D. L. Thomas, R. E. Chaisson, and R. D. Moore. 2000. Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C or B virus infection. *Jama* 283:74-80.
366. Richman, D. D., D. Havlir, J. Corbeil, D. Looney, C. Ignacio, S. A. Spector, J. Sullivan, S. Cheeseman, K. Barringer, D. Pauletti, and et al. 1994. Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. *J Virol* 68:1660-1666.

367. Boucher, C. A., E. O'Sullivan, J. W. Mulder, C. Ramautarsing, P. Kellam, G. Darby, J. M. Lange, J. Goudsmit, and B. A. Larder. 1992. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J Infect Dis* 165:105-110.
368. Molla, A., M. Korneyeva, Q. Gao, S. Vasavanonda, P. J. Schipper, H. M. Mo, M. Markowitz, T. Chernyavskiy, P. Niu, N. Lyons, A. Hsu, G. R. Granneman, D. D. Ho, C. A. Boucher, J. M. Leonard, D. W. Norbeck, and D. J. Kempf. 1996. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat Med* 2:760-766.
369. Richman, D. D., T. Wrin, S. J. Little, and C. J. Petropoulos. 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4144-4149.
370. Hertogs, K., M. P. de Bethune, V. Miller, T. Ivens, P. Schel, A. Van Cauwenberge, C. Van Den Eynde, V. Van Gerwen, H. Azijn, M. Van Houtte, F. Peeters, S. Staszewski, M. Conant, S. Bloor, S. Kemp, B. Larder, and R. Pauwels. 1998. A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 42:269-276.
371. Kuritzkes, D. R., R. M. Grant, P. Feorino, M. Griswold, M. Hoover, R. Young, S. Day, R. M. Lloyd Jr, Jr., C. Reid, G. F. Morgan, and D. L. Winslow. 2003. Performance characteristics of the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit and the Opengene DNA Sequencing System. *J Clin Microbiol* 41:1594-1599.
372. Petropoulos, C. J., N. T. Parkin, K. L. Limoli, Y. S. Lie, T. Wrin, W. Huang, H. Tian, D. Smith, G. A. Winslow, D. J. Capon, and J. M. Whitcomb. 2000. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 44:920-928.
373. Rossi, J. J., E. M. Cantin, J. A. Zaia, P. A. Ladne, J. Chen, D. A. Stephens, N. Sarver, and P. S. Chang. 1990. Ribozymes as therapies for AIDS. *Ann N Y Acad Sci* 616:184-200.
374. Wong-Staal, F., E. M. Poeschla, and D. J. Looney. 1998. A controlled, Phase 1 clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Hum Gene Ther* 9:2407-2425.
375. Arno, A., L. Ruiz, M. Juan, A. Jou, M. Balague, M. K. Zayat, S. Marfil, J. Martinez-Picado, M. A. Martinez, J. Romeu, R. Pujol-Borrell, C. Lane, and B. Clotet. 1999. Efficacy of low-dose subcutaneous interleukin-2 to treat advanced human immunodeficiency virus type 1 in persons with $\leq 250/\mu\text{L}$ CD4 T cells and undetectable plasma virus load. *J Infect Dis* 180:56-60.

376. Davey, R. T., Jr., D. G. Chaitt, J. M. Albert, S. C. Piscitelli, J. A. Kovacs, R. E. Walker, J. Falloon, M. A. Polis, J. A. Metcalf, H. Masur, R. Dewar, M. Baseler, G. Fyfe, M. A. Giedlin, and H. C. Lane. 1999. A randomized trial of high- versus low-dose subcutaneous interleukin-2 outpatient therapy for early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 179:849-858.
377. Kovacs, J. A., S. Vogel, J. M. Albert, J. Falloon, R. T. Davey, Jr., R. E. Walker, M. A. Polis, K. Spooner, J. A. Metcalf, M. Baseler, G. Fyfe, and H. C. Lane. 1996. Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 335:1350-1356.
378. Teppler, H., G. Kaplan, K. Smith, P. Cameron, A. Montana, P. Meyn, and Z. Cohn. 1993. Efficacy of low doses of the polyethylene glycol derivative of interleukin-2 in modulating the immune response of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 167:291-298.
379. Teppler, H., G. Kaplan, K. A. Smith, A. L. Montana, P. Meyn, and Z. A. Cohn. 1993. Prolonged immunostimulatory effect of low-dose polyethylene glycol interleukin 2 in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Exp Med* 177:483-492.
380. Vogler, M. A., H. Teppler, R. Gelman, F. Valentine, M. M. Lederman, R. J. Pomerantz, R. B. Pollard, D. W. Cherng, C. J. Gonzalez, K. E. Squires, I. Frank, D. Mildvan, L. F. Mahon, and B. Schock. 2004. Daily low-dose subcutaneous interleukin-2 added to single- or dual-nucleoside therapy in HIV infection does not protect against CD4+ T-cell decline or improve other indices of immune function: results of a randomized controlled clinical trial (ACTG 248). *J Acquir Immune Defic Syndr* 36:576-587.
381. Calabrese, L. H., M. M. Lederman, J. Spritzler, R. W. Coombs, L. Fox, B. Schock, B. Yen-Lieberman, R. Johnson, D. Mildvan, and N. Parekh. 2002. Placebo-controlled trial of cyclosporin-A in HIV-1 disease: implications for solid organ transplantation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29:356-362.
382. Chapuis, A. G., G. Paolo Rizzardì, C. D'Agostino, A. Attinger, C. Knabenhans, S. Fleury, H. Acha-Orbea, and G. Pantaleo. 2000. Effects of mycophenolic acid on human immunodeficiency virus infection in vitro and in vivo. *Nat Med* 6:762-768.
383. Havlir, D. V., P. B. Gilbert, K. Bennett, A. C. Collier, M. S. Hirsch, P. Tebas, E. M. Adams, L. J. Wheat, D. Goodwin, S. Schnittman, M. K. Holohan, and D. D. Richman. 2001. Effects of treatment intensification with hydroxyurea in HIV-infected patients with virologic suppression. *Aids* 15:1379-1388.
384. Montaner, J. S., C. Zala, B. Conway, J. Raboud, P. Patenaude, S. Rae, M. V. O'Shaughnessy, and M. T. Schechter. 1997. A pilot study of hydroxyurea among patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV) disease receiving chronic didanosine therapy: Canadian HIV trials network protocol 080. *J Infect Dis* 175:801-806.

385. Rizzardi, G. P., A. Harari, B. Capiluppi, G. Tambussi, K. Ellefsen, D. Ciuffreda, P. Champagne, P. A. Bart, J. P. Chave, A. Lazzarin, and G. Pantaleo. 2002. Treatment of primary HIV-1 infection with cyclosporin A coupled with highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 109:681-688.
386. Rizzardi, G. P., A. Lazzarin, and G. Pantaleo. 2002. Potential role of immune modulation in the effective long-term control of HIV-1 infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 16:83-90.
387. Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
388. Gay, N. J., and F. J. Keith. 1991. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351:355-356.
389. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
390. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
391. Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell, and S. Ghosh. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-1526.
392. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
393. Bowie, A., and L. A. O'Neill. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67:508-514.
394. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
395. Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168:4531-4537.
396. Zarembek, K. A., and P. J. Godowski. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168:554-561.

397. Caron, G., D. Duluc, I. Fremaux, P. Jeannin, C. David, H. Gascan, and Y. Delneste. 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4⁺ T cells. *J Immunol* 175:1551-1557.
398. Komai-Koma, M., L. Jones, G. S. Ogg, D. Xu, and F. Y. Liew. 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3029-3034.
399. Raffeiner, B., C. Dejaco, C. Duftner, W. Kullich, C. Goldberger, S. C. Vega, M. Keller, B. Grubeck-Loebenstern, and M. Schirmer. 2005. Between adaptive and innate immunity: TLR4-mediated perforin production by CD28null T-helper cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 7:R1412-1420.
400. Liu, H., M. Komai-Koma, D. Xu, and F. Y. Liew. 2006. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7048-7053.
401. Mansson, A., M. Adner, and L. O. Cardell. 2006. Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir Res* 7:36.
402. Wesch, D., S. Beetz, H. H. Oberg, M. Marget, K. Krenzel, and D. Kabelitz. 2006. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 176:1348-1354.
403. Kress, E., J. F. Hedges, and M. A. Jutila. 2006. Distinct gene expression in human Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells following non-TCR agonist stimulation. *Mol Immunol* 43:2002-2011.
404. Krug, A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg, and G. Hartmann. 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31:3026-3037.
405. Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, and S. Fukuhara. 2002. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195:1507-1512.
406. Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31:3388-3393.
407. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194:863-869.

408. Visintin, A., A. Mazzoni, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower, and D. M. Segal. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166:249-255.
409. Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164:5998-6004.
410. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171:3154-3162.
411. Bernasconi, N. L., N. Onai, and A. Lanzavecchia. 2003. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101:4500-4504.
412. Bourke, E., D. Bosisio, J. Golay, N. Polentarutti, and A. Mantovani. 2003. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 102:956-963.
413. Gunn, K. E., and J. W. Brewer. 2006. Evidence that marginal zone B cells possess an enhanced secretory apparatus and exhibit superior secretory activity. *J Immunol* 177:3791-3798.
414. Bendelac, A., M. Bonneville, and J. F. Kearney. 2001. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 1:177-186.
415. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102:2660-2669.
416. Neufert, C., R. K. Pai, E. H. Noss, M. Berger, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2001. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. *J Immunol* 167:1542-1549.
417. Kurt-Jones, E. A., L. Mandell, C. Whitney, A. Padgett, K. Gosselin, P. E. Newburger, and R. W. Finberg. 2002. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 100:1860-1868.
418. Sabroe, I., S. K. Dower, and M. K. Whyte. 2005. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7:S421-426.
419. Nagase, H., S. Okugawa, Y. Ota, M. Yamaguchi, H. Tomizawa, K. Matsushima, K. Ohta, K. Yamamoto, and K. Hirai. 2003. Expression and function of Toll-like

- receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 171:3977-3982.
420. Galli, S. J., M. Maurer, and C. S. Lantz. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11:53-59.
421. Malaviya, R., and S. N. Abraham. 2001. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol Rev* 179:16-24.
422. Echtenacher, B., D. N. Mannel, and L. Hultner. 1996. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381:75-77.
423. McCurdy, J. D., T. J. Olynych, L. H. Maher, and J. S. Marshall. 2003. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol* 170:1625-1629.
424. Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, S. Akira, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa. 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 109:1351-1359.
425. Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa. 2001. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 167:2250-2256.
426. Muir, A., G. Soong, S. Sokol, B. Reddy, M. I. Gomez, A. Van Heeckeren, and A. Prince. 2004. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:777-783.
427. Melmed, G., L. S. Thomas, N. Lee, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, Y. Zhou, B. Hu, M. Arditi, and M. T. Abreu. 2003. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 170:1406-1415.
428. Cario, E., and D. K. Podolsky. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68:7010-7017.
429. Fichorova, R. N., A. O. Cronin, E. Lien, D. J. Anderson, and R. R. Ingalls. 2002. Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. *J Immunol* 168:2424-2432.
430. Akira, S., M. Yamamoto, and K. Takeda. 2003. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 31:637-642.
431. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282:2085-2088.

432. Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777-1782.
433. Travassos, L. H., S. E. Girardin, D. J. Philpott, D. Blanot, M. A. Nahori, C. Werts, and I. G. Boneca. 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 5:1000-1006.
434. Echchannaoui, H., K. Frei, C. Schnell, S. L. Leib, W. Zimmerli, and R. Landmann. 2002. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 186:798-806.
435. Takeuchi, O., K. Hoshino, and S. Akira. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 165:5392-5396.
436. Cook, D. N., D. S. Pisetsky, and D. A. Schwartz. 2004. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 5:975-979.
437. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular biology of the cell*. Garland Science.
438. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
439. Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, and J. L. Madara. 2001. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167:1882-1885.
440. Hawn, T. R., A. Verbon, K. D. Lettinga, L. P. Zhao, S. S. Li, R. J. Laws, S. J. Skerrett, B. Beutler, L. Schroeder, A. Nachman, A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem. 2003. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 198:1563-1572.
441. Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, K. L. Strobe, S. L. Barrett, B. T. Cookson, S. M. Logan, and A. Aderem. 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9247-9252.
442. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
443. Krieg, A. M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20:709-760.

444. Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32:1958-1968.
445. Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik, and D. T. Golenbock. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5:190-198.
446. Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G. B. Lipford, and H. Wagner. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* 17:6230-6240.
447. Rutz, M., J. Metzger, T. Gellert, P. Lippa, G. B. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 34:2541-2550.
448. Barton, G. M., J. C. Kagan, and R. Medzhitov. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 7:49-56.
449. Gilleron, M., V. F. Quesniaux, and G. Puzo. 2003. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and *mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem* 278:29880-29889.
450. Quesniaux, V., C. Fremont, M. Jacobs, S. Parida, D. Nicolle, V. Yermeev, F. Bihl, F. Erard, T. Botha, M. Drennan, M. N. Soler, M. Le Bert, B. Schnyder, and B. Ryffel. 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* 6:946-959.
451. Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291:1544-1547.
452. Netea, M. G., C. Van der Graaf, J. W. Van der Meer, and B. J. Kullberg. 2004. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:672-676.
453. Brown, G. D., P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. Willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. Wong, and S. Gordon. 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 196:407-412.

454. Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 197:1107-1117.
455. Rogers, N. C., E. C. Slack, A. D. Edwards, M. A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D. L. Williams, S. Gordon, V. L. Tybulewicz, G. D. Brown, and C. Reis e Sousa. 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22:507-517.
456. Underhill, D. M., E. Rossnagle, C. A. Lowell, and R. M. Simmons. 2005. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 106:2543-2550.
457. Gazzinelli, R. T., C. Ropert, and M. A. Campos. 2004. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev* 201:9-25.
458. Pichyangkul, S., K. Yongvanitchit, U. Kum-arb, H. Hemmi, S. Akira, A. M. Krieg, D. G. Heppner, V. A. Stewart, H. Hasegawa, S. Looareesuwan, G. D. Shanks, and R. S. Miller. 2004. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol* 172:4926-4933.
459. Coban, C., K. J. Ishii, T. Kawai, H. Hemmi, S. Sato, S. Uematsu, M. Yamamoto, O. Takeuchi, S. Itagaki, N. Kumar, T. Horii, and S. Akira. 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 201:19-25.
460. Krug, A., A. R. French, W. Barchet, J. A. Fischer, A. Dzionek, J. T. Pingel, M. M. Orihuela, S. Akira, W. M. Yokoyama, and M. Colonna. 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21:107-119.
461. Krug, A., G. D. Luker, W. Barchet, D. A. Leib, S. Akira, and M. Colonna. 2004. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103:1433-1437.
462. Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki. 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198:513-520.
463. Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and B. Beutler. 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3516-3521.
464. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate

- immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3:196-200.
465. Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531.
466. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
467. Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1:398-401.
468. Bieback, K., E. Lien, I. M. Klagge, E. Avota, J. Schneider-Schaulies, W. P. Duprex, H. Wagner, C. J. Kirschning, V. Ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies. 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* 76:8729-8736.
469. Compton, T., E. A. Kurt-Jones, K. W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D. T. Golenbock, and R. W. Finberg. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 77:4588-4596.
470. Kollwe, C., A. C. Mackensen, D. Neumann, J. Knop, P. Cao, S. Li, H. Wesche, and M. U. Martin. 2004. Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 279:5227-5236.
471. Yamin, T. T., and D. K. Miller. 1997. The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation. *J Biol Chem* 272:21540-21547.
472. Muzio, M., J. Ni, P. Feng, and V. M. Dixit. 1997. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278:1612-1615.
473. Wesche, H., X. Gao, X. Li, C. J. Kirschning, G. R. Stark, and Z. Cao. 1999. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 274:19403-19410.
474. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen. 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361.

475. Chen, Z. J. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7:758-765.
476. Wang, C., L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, and Z. J. Chen. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351.
477. Brockman, J. A., D. C. Scherer, T. A. McKinsey, S. M. Hall, X. Qi, W. Y. Lee, and D. W. Ballard. 1995. Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 15:2809-2818.
478. Brown, K., S. Gerstberger, L. Carlson, G. Franzoso, and U. Siebenlist. 1995. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267:1485-1488.
479. DiDonato, J., F. Mercurio, C. Rosette, J. Wu-Li, H. Suyang, S. Ghosh, and M. Karin. 1996. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 16:1295-1304.
480. Karin, M., and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.
481. Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W. C. Yeh, and T. Taniguchi. 2004. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15416-15421.
482. Honda, K., Y. Ohba, H. Yanai, H. Negishi, T. Mizutani, A. Takaoka, C. Taya, and T. Taniguchi. 2005. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434:1035-1040.
483. Kawai, T., S. Sato, K. J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5:1061-1068.
484. Uematsu, S., S. Sato, M. Yamamoto, T. Hirotani, H. Kato, F. Takeshita, M. Matsuda, C. Coban, K. J. Ishii, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J Exp Med* 201:915-923.
485. Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249.
486. Negishi, H., Y. Fujita, H. Yanai, S. Sakaguchi, X. Ouyang, M. Shinohara, H. Takayanagi, Y. Ohba, T. Taniguchi, and K. Honda. 2006. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-

- like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15136-15141.
487. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
488. Horng, T., G. M. Barton, and R. Medzhitov. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2:835-841.
489. Fitzgerald, K. A., and Z. J. Chen. 2006. Sorting out Toll signals. *Cell* 125:834-836.
490. Kagan, J. C., and R. Medzhitov. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125:943-955.
491. Mansell, A., E. Brint, J. A. Gould, L. A. O'Neill, and P. J. Hertzog. 2004. Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem* 279:37227-37230.
492. Gray, P., A. Dunne, C. Brikos, C. A. Jefferies, S. L. Doyle, and L. A. O'Neill. 2006. MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J Biol Chem* 281:10489-10495.
493. Jefferies, C. A., S. Doyle, C. Brunner, A. Dunne, E. Brint, C. Wietek, E. Walch, T. Wirth, and L. A. O'Neill. 2003. Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 278:26258-26264.
494. Liljeroos, M., R. Vuolteenaho, S. Morath, T. Hartung, M. Hallman, and M. Ojaniemi. 2007. Bruton's tyrosine kinase together with PI 3-kinase are part of Toll-like receptor 2 multiprotein complex and mediate LTA induced Toll-like receptor 2 responses in macrophages. *Cell Signal* 19:625-633.
495. Doyle, S. L., C. A. Jefferies, and L. A. O'Neill. 2005. Bruton's tyrosine kinase is involved in p65-mediated transactivation and phosphorylation of p65 on serine 536 during NFkappaB activation by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 280:23496-23501.
496. Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169:6668-6672.
497. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167.

498. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
499. Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S. M. Liao, and T. Maniatis. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4:491-496.
500. Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171:4304-4310.
501. McGettrick, A. F., E. K. Brint, E. M. Palsson-McDermott, D. C. Rowe, D. T. Golenbock, N. J. Gay, K. A. Fitzgerald, and L. A. O'Neill. 2006. Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC{epsilon} during Toll-like receptor 4 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9196-9201.
502. Rowe, D. C., A. F. McGettrick, E. Latz, B. G. Monks, N. J. Gay, M. Yamamoto, S. Akira, L. A. O'Neill, K. A. Fitzgerald, and D. T. Golenbock. 2006. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6299-6304.
503. Sprent, J., and C. D. Surh. 2002. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 20:551-579.
504. Schlaepfer, E., A. Audige, H. Joller, and R. F. Speck. 2006. TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection. *J Immunol* 176:2888-2895.
505. Schlaepfer, E., and R. F. Speck. 2008. Anti-HIV activity mediated by natural killer and CD8+ cells after toll-like receptor 7/8 triggering. *PLoS ONE* 3:e1999.
506. Ulevitch, R. J. 2004. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 4:512-520.
507. Funderburg, N., A. A. Luciano, W. Jiang, B. Rodriguez, S. F. Sieg, and M. M. Lederman. 2008. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS ONE* 3:e1915.
508. Edfeldt, K., J. Swedenborg, G. K. Hansson, and Z. Q. Yan. 2002. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 105:1158-1161.
509. Kang, T. J., and G. T. Chae. 2001. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepomatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31:53-58.

510. Valdez, H. 2002. Immune restoration after treatment of HIV-1 infection with highly active antiretroviral therapy (HAART). *AIDS Rev* 4:157-164.
511. Equils, O., M. L. Schito, H. Karahashi, Z. Madak, A. Yarali, K. S. Michelsen, A. Sher, and M. Arditì. 2003. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication. *J Immunol* 170:5159-5164.
512. Bafica, A., C. A. Scanga, M. L. Schito, S. Hieny, and A. Sher. 2003. Cutting edge: in vivo induction of integrated HIV-1 expression by mycobacteria is critically dependent on Toll-like receptor 2. *J Immunol* 171:1123-1127.
513. Thibault, S., M. R. Tardif, C. Barat, and M. J. Tremblay. 2007. TLR2 signaling renders quiescent naive and memory CD4+ T cells more susceptible to productive infection with X4 and R5 HIV-type 1. *J Immunol* 179:4357-4366.
514. Heggelund, L., F. Muller, E. Lien, A. Yndestad, T. Ueland, K. I. Kristiansen, T. Espevik, P. Aukrust, and S. S. Froland. 2004. Increased expression of toll-like receptor 2 on monocytes in HIV infection: possible roles in inflammation and viral replication. *Clin Infect Dis* 39:264-269.
515. Aukrust, P., F. Muller, E. Lien, I. Nordoy, N. B. Liabakk, D. Kvale, T. Espevik, and S. S. Froland. 1999. Tumor necrosis factor (TNF) system levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy: persistent TNF activation is associated with virologic and immunologic treatment failure. *J Infect Dis* 179:74-82.
516. Haug, C. J., P. Aukrust, E. Haug, L. Morkrid, F. Muller, and S. S. Froland. 1998. Severe deficiency of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human immunodeficiency virus infection: association with immunological hyperactivity and only minor changes in calcium homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3832-3838.
517. Ledru, E., N. Christeff, O. Patey, P. de Truchis, J. C. Melchior, and M. L. Gougeon. 2000. Alteration of tumor necrosis factor-alpha T-cell homeostasis following potent antiretroviral therapy: contribution to the development of human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome. *Blood* 95:3191-3198.
518. Lawn, S. D., S. T. Butera, and T. M. Folks. 2001. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev* 14:753-777, table of contents.
519. LeBouder, E., J. E. Rey-Nores, N. K. Rushmere, M. Grigorov, S. D. Lawn, M. Affolter, G. E. Griffin, P. Ferrara, E. J. Schiffrin, B. P. Morgan, and M. O. Labeta. 2003. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 171:6680-6689.

520. Fantuzzi, L., F. Belardelli, and S. Gessani. 2003. Monocyte/macrophage-derived CC chemokines and their modulation by HIV-1 and cytokines: a complex network of interactions influencing viral replication and AIDS pathogenesis. *J Leukoc Biol* 74:719-725.
521. Heggelund, L., T. Flo, K. Berg, E. Lien, T. E. Mollnes, T. Ueland, P. Aukrust, T. Espevik, and S. S. Froland. 2004. Soluble toll-like receptor 2 in HIV infection: association with disease progression. *Aids* 18:2437-2439.
522. Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
523. Beutler, B., Z. Jiang, P. Georgel, K. Crozat, B. Croker, S. Rutschmann, X. Du, and K. Hoebe. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 24:353-389.
524. Gavin, A. L., K. Hoebe, B. Duong, T. Ota, C. Martin, B. Beutler, and D. Nemazee. 2006. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 314:1936-1938.
525. Janssen, E., K. Tabeta, M. J. Barnes, S. Rutschmann, S. McBride, K. S. Bahjat, S. P. Schoenberger, A. N. Theofilopoulos, B. Beutler, and K. Hoebe. 2006. Efficient T cell activation via a Toll-Interleukin 1 Receptor-independent pathway. *Immunity* 24:787-799.
526. Lopez, C. B., B. Moltedo, L. Alexopoulou, L. Bonifaz, R. A. Flavell, and T. M. Moran. 2004. TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses. *J Immunol* 173:6882-6889.
527. Kaisho, T., and S. Akira. 2002. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 1589:1-13.
528. van Duin, D., R. Medzhitov, and A. C. Shaw. 2006. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol* 27:49-55.
529. Spohn, R., U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, and K. H. Wiesmuller. 2004. Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2--structure-activity relationships. *Vaccine* 22:2494-2499.
530. Applequist, S. E., E. Rollman, M. D. Wareing, M. Liden, B. Rozell, J. Hinkula, and H. G. Ljunggren. 2005. Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin. *J Immunol* 175:3882-3891.
531. Honko, A. N., N. Sriranganathan, C. J. Lees, and S. B. Mizel. 2006. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 74:1113-1120.

532. Wille-Reece, U., B. J. Flynn, K. Lore, R. A. Koup, R. M. Kedl, J. J. Mattapallil, W. R. Weiss, M. Roederer, and R. A. Seder. 2005. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15190-15194.
533. Wille-Reece, U., B. J. Flynn, K. Lore, R. A. Koup, A. P. Miles, A. Saul, R. M. Kedl, J. J. Mattapallil, W. R. Weiss, M. Roederer, and R. A. Seder. 2006. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *J Exp Med* 203:1249-1258.
534. O'Hagan, D. T., and N. M. Valiante. 2003. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2:727-735.
535. Pashine, A., N. M. Valiante, and J. B. Ulmer. 2005. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med* 11:S63-68.
536. Patel, M., D. Xu, P. Kewin, B. Choo-Kang, C. McSharry, N. C. Thomson, and F. Y. Liew. 2005. TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J Immunol* 174:7558-7563.
537. Borsutzky, S., K. Kretschmer, P. D. Becker, P. F. Muhlradt, C. J. Kirschning, S. Weiss, and C. A. Guzman. 2005. The mucosal adjuvant macrophage-activating lipopeptide-2 directly stimulates B lymphocytes via the TLR2 without the need of accessory cells. *J Immunol* 174:6308-6313.
538. Letvin, N. L., D. H. Barouch, and D. C. Montefiori. 2002. Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS. *Annu Rev Immunol* 20:73-99.
539. Ensoli, B., and A. Cafaro. 2000. Novel strategies toward the development of an effective vaccine to prevent human immunodeficiency virus infection or acquired immunodeficiency virus. *AIDS Clin Rev*:23-61.
540. Buratti, E., S. G. Tisminetzky, P. D'Agaro, and F. E. Baralle. 1997. A neutralizing monoclonal antibody previously mapped exclusively on human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope in p17 sharing the core sequence IEEE. *J Virol* 71:2457-2462.
541. Naylor, P. H., C. W. Naylor, M. Badamchian, S. Wada, A. L. Goldstein, S. S. Wang, D. K. Sun, A. H. Thornton, and P. S. Sarin. 1987. Human immunodeficiency virus contains an epitope immunoreactive with thymosin alpha 1 and the 30-amino acid synthetic p17 group-specific antigen peptide HGP-30. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2951-2955.
542. Papsidero, L. D., M. Sheu, and F. W. Ruscetti. 1989. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibodies which react with p17 core protein: characterization and epitope mapping. *J Virol* 63:267-272.

543. Lange, J. M., F. de Wolf, W. J. Krone, S. A. Danner, R. A. Coutinho, and J. Goudsmit. 1987. Decline of antibody reactivity to outer viral core protein p17 is an earlier serological marker of disease progression in human immunodeficiency virus infection than anti-p24 decline. *Aids* 1:155-159.
544. Chargelegue, D., C. M. Stanley, C. M. O'Toole, B. T. Colvin, and M. W. Steward. 1995. The affinity of IgG antibodies to gag p24 and p17 in HIV-1-infected patients correlates with disease progression. *Clin Exp Immunol* 99:175-181.
545. Becker, P. D., S. Fiorentini, C. Link, G. Tosti, T. Ebsen, A. Caruso, and C. A. Guzman. 2006. The HIV-1 matrix protein p17 can be efficiently delivered by intranasal route in mice using the TLR 2/6 agonist MALP-2 as mucosal adjuvant. *Vaccine* 24:5269-5276.
546. Cavrois, M., C. De Noronha, and W. C. Greene. 2002. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol* 20:1151-1154.

Annexe 1. Article supplémentaire

En parallèle de mon projet de recherche principal, j'ai également investigué le rôle de la lectine CD62L, laquelle est incorporée dans les virions, dans le transfert des virus aux lymphocytes T CD4+ via les cellules endothéliales. Ces travaux ont mené à un article publié dans la revue *Journal of General Virology* (2007, Sep;88 (Pt 9) :2568-73).

Résumé

Plusieurs études antérieures ont identifié des protéines de surface dérivées de l'hôte et qui sont incorporées dans les nouvelles particules virales. Plusieurs de ces molécules jouent un rôle dans différentes étapes du cycle viral et avantagent souvent le virus. Cet article rapporte que la L-sélectine CD62L demeure fonctionnelle lorsqu'incorporée dans l'enveloppe du VIH-1. Nous démontrons que l'attachement des virus aux cellules endothéliales est augmenté en présence de CD62L. Cette liaison plus importante se traduit par une transmission aux lymphocytes T CD4+ également augmentée. La capture et l'éventuel transfert de ces virus qui expriment CD62L par l'endothélium pourrait jouer un rôle dans la dissémination du VIH-1 chez les individus infectés.

Article

Virus-associated host CD62L increases attachment of HIV-1 to endothelial cells and enhances *trans* infection of CD4⁺ T lymphocytes

Sandra Thibault, Mélanie R. Tardif,
Caroline Gilbert, and Michel J. Tremblay*

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

Running title: Role of CD62L in *trans* infection of CD4⁺ T cells

Main text: 2741 words

Summary: 112 words

Figures: 3

*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

Summary

Previous studies have identified several host-derived cell surface proteins incorporated within emerging HIV-1 particles. Many of these molecules play a role in different steps of the virus life cycle and are often advantageous for the virus. We report here that the leukocyte L-selectin (also called CD62L) remains functional when inserted within the envelope of HIV-1. Indeed, we demonstrate that adsorption of virions to endothelial cells is enhanced upon acquisition of host-derived CD62L. The more important binding of CD62L-bearing HIV-1 particles resulted in a more efficient transmission to CD4⁺ T lymphocytes. Capture and eventual transfer of such CD62L-bearing virions by the endothelium could play a role in dissemination of HIV-1 throughout the infected organism.

The classical way for HIV-1 to infect CD4⁺ T cells involves interactions between gp120 and a complex made of cell surface CD4 and an appropriate chemokine coreceptor (CXCR4 or CCR5), followed by fusion with the plasma membrane (Clapham & McKnight, 2001, Pierson & Doms, 2003, Piguet & Sattentau, 2004). However, it is now well established that initial interactions between the viral particle and the cell surface are far more complex than initially thought and they are notably modulated by a variety of interactions occurring between gp120 and different cell surface molecules. Such interactions include those between gp120 and Dendritic Cell (DC)-Specific Intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN); L-SIGN, another C-type lectin found in liver lymph nodes; heparan sulphate proteoglycans (HSPG); and langerin or mannose receptor (Bashirova et al., 2001, Bobardt et al., 2003, Cantin et al., 2005, Dakappagari et al., 2006, Geijtenbeek et al., 2000, Turville et al., 2003, Turville et al., 2002). Moreover, it is now accepted that the HIV-1 attachment step can also be influenced by interactions between virus-anchored host cell membrane components and their natural ligands once expressed on target cells (Kolegraft et al., 2006, Ott, 1997, Ott, 2002). Amongst the different incorporated host proteins, ICAM-1, Leucocyte Functional Antigen (LFA)-1, HLA-DR, CD28 and CD152 have been shown to play a key role in the initial events in HIV-1 life cycle (Cantin et al., 1997, Castilletti et al., 1995, Fortin et al., 1997, Giguere et al., 2005, Paquette et al., 1998). Thus, the enhancement of viral attachment through these additional interactions may modulate the *cis* and/or *trans* infection with HIV-1.

Trans infection is defined as an initial capture of virions by carrier cells, which are not or weakly susceptible to productive infection, followed by an efficient virus transfer to permissive target cells (Geijtenbeek et al., 2000, Piguet & Sattentau, 2004). Numerous studies have reported that DCs, macrophages, B lymphocytes, epithelial and endothelial cells can serve as HIV-1 carriers (Abbate et al., 1999, Arias et al., 2003, Bounou et al., 2004, De Milito, 2004, Turville et al., 2004). Following HIV-1 binding, some carrier cells can internalize virions, whereas others can retain them under an intact form on their plasma membrane. In both cases, a close contact between these “Trojan horse” cells and CD4⁺ T cells is needed to transmit HIV-1. Hence, HIV-1 exploits immune as well as non immune cell communication to achieve a more efficient viral spread.

Endothelial cells have a capacity to capture circulating T cells as part of the process of diapedesis. Indeed, it is known that T lymphocytes move rapidly in blood vessels until their interception by endothelial cells. CD62L and LFA-1 that are both expressed on T cells and their respective ligands on endothelial cells, i.e. E-selectin and ICAM-1, all participate in the slowing down and adhesion of leukocytes, the first steps in lymphocyte homing. Also called L-selectin, CD62L is a C-type lectin largely distributed on B and T cells, monocytes and neutrophils. CD62L supports leukocyte tethering and rolling along vascular endothelium by interacting with carbohydrates presented by various specific endothelial cell ligands, including CD34, podocalyxin-like protein (PCLP) and E-selectin (McEver & Cummings, 1997, Rosen, 2004, Sasseti et al., 1998). These are widely expressed on vascular endothelium but mainly remain under a non functional state. The majority of functional ligands are expressed on high endothelial venules (HEVs), which are located in lymphoid organs such as lymph nodes. To become functional, ligands require sialylation,

fucosylation and sulfation of their mucin-like domain (Pablos *et al.*, 2005). Ligands expressed on vascular endothelium other than HEVs become functional in response to pro-inflammatory cytokines (Pablos *et al.*, 2005). Nonetheless, it has been reported that CD62L can also interact with Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA) present on vascular endothelium other than HEVs in the absence of cytokines (Tu *et al.*, 1999).

Interestingly enough, it has been shown that CD62L is incorporated in HIV-1 particles produced by primary human CD4⁺ T lymphocytes (Bastiani *et al.*, 1997). However, whether this molecule plays a role when present on virions remain to be determined. Considering the natural role played by CD62L in the rolling step and given that this cell membrane constituent is incorporated within HIV-1, we hypothesized that endothelial cells could efficiently capture CD62L-carrying virions and then transfer such trapped virus to CD4⁺ T cells.

In an attempt to investigate these two interconnected possibilities, we first produced isogenic viruses either lacking (NL4-3) or bearing host-derived CD62L molecules (NL4-3/CD62L) by the calcium phosphate coprecipitation method in 293T cells as described previously (Fortin *et al.*, 1997). We used pNL4-3, a full-length infectious molecular clone of HIV-1 (obtained through the AIDS Repository Reagent Program), and pLam-1, a cDNA encoding for human CD62L (kindly provided by T. F. Tedder, Duke University Medical Center, Durham, NC) (Tedder *et al.*, 1989). We also produced viruses on primary CD4⁺ T cells and used them to compare CD62L incorporation level of 293T cells-produced virions. Virus preparations were normalized for virion content using an in-house enzymatic assay

specific for viral capsid protein p24^{gag} (Bounou *et al.*, 2002). It should be noted that 293T cells were transfected with a quantity of the CD62L expression vector leading to a surface expression level of CD62L similar to what is seen on primary human CD4⁺ T cells. The presence of CD62L on the exterior of HIV-1 particles was verified through the use of a virus capture assay using a previously described protocol (Martin & Tremblay, 2004).

As illustrated in Fig. 1A, CD62L-bearing viruses were captured by magnetic beads coated with an anti-CD62L (Lam1-116), thus confirming that host-derived CD62L is efficiently acquired by newly formed HIV-1. Viruses were also subjected to antibodies against class-I and CD45 proteins as positive and negative control of incorporation. Results depicted in Fig. 1A show that class-I molecule are weakly incorporated in both viruses (bearing or not CD62L) and that negative control, CD45, was absent. We also performed another viral capture assay with viruses produced on primary CD4⁺ T cells to verify if the expression level of CD62L was similar to viruses produced on cotransfected cells. As illustrated in Fig. 1B, CD62L is expressed at similar levels on both viruses produced on 293T cells and CD4⁺ T cells. Consequently, our model do not over express CD62L. Next, to assess whether host CD62L can promote binding of virions to endothelial cells, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used to capture the studied virus stocks. HUVECs were always used at a passage lower than 6. For the virus binding assay, HUVECs (5×10^5) were seeded into 24-well tissue culture plates with 1 ml of EGM-2 culture medium and grown for 1 or 2 days. Thereafter, HUVECs (1×10^5) were exposed to similar concentrations of each virus preparation (standardized in terms of p24 content / 10 ng of p24^{gag}) in 200 μ l of EGM-2 medium for the indicated times at 37°C. After several washes,

unbound viruses were removed and the cell-virus mixture was treated with 200 μ l of lysis buffer (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM and Triton 0.5%), and the p24^{gag} content was evaluated by ELISA. Fig. 2 shows that viruses bearing host-derived CD62L bind more efficiently to HUVECs than viruses lacking this molecule. Furthermore, there was a time-dependent increase in the level of CD62L-bearing viruses bound to the surface of HUVECs, whereas attachment of virions lacking host-derived CD62L remained almost constant over time. The enhanced adsorption of CD62L-positive virions to HUVECs indicates that virus-anchored CD62L can still interact with its natural ligands that are located onto the surface of endothelial cells.

Although numerous cell types have been suggested to act as “Trojan horses” for HIV-1, most studies concerning *trans* infection focus on DCs. The participation of endothelial cells in HIV-1 transfer has however already been recently reported by Bobardt and colleagues (Bobardt *et al.*, 2003). Given that virus-associated host CD62L leads to a more important attachment of HIV-1 onto HUVECs, we hypothesized that this might also affect the process of HUVEC-mediated virus infection of CD4⁺ T lymphocytes *in trans*. Virus transmission assays were next carried out to validate this postulate. To this end, HUVECs were exposed to the tested virus preparations as indicated above, washed extensively and co-cultured for 15, 30 or 60 min at 37°C with purified CD4⁺ T cells (1×10^5). Next, CD4⁺ T lymphocytes were removed from adherent HUVECs and washed with PBS 1X to eliminate uninternalized virions. Finally, cells were grown for 9 days in complete RPMI medium supplemented with recombinant human IL-2. Virus transfer between endothelial cells and CD4⁺ T cells was evaluated by measuring the p24^{gag} content in cell-free supernatants

harvested 3, 6 and 9 days after transfer. Data depicted in Fig. 3A demonstrate that HUVEC-mediated transfer to CD4⁺ T lymphocytes is more efficient with CD62L-bearing viruses after 15 and 30 min of co-culture. However, this effect was abrogated when CD4⁺ T cells were co-cultured with HUVEC for 60 min. In fact, viruses are transferred from HUVECs to T cells but it seems that the effect of CD62L disappears. Indeed, virus production in CD4⁺ T cells was significantly enhanced at 6 days following co-culture with HUVECs when using CD62L-bearing virions. We next tested whether part of the observed enhancement of HUVEC-mediated *trans* infection of CD4⁺ T cells could be due to an increased infectivity of CD62L-bearing viruses. We thus evaluated susceptibility of CD4⁺ T lymphocytes to infection with viruses either lacking or bearing host-derived CD62L. In brief, activated CD4⁺ T cells (1×10^5) were exposed to different concentrations of the studied virus stocks (1 to 10 ng of p24^{gag}), and then grown in 200 μ l of complete RPMI culture medium supplemented with rhIL-2 into 96-well flat-bottom tissue culture plates. At days 3, 6 and 9 post infection, 100 μ l of cell-free supernatants were harvested, replaced with fresh medium, and frozen at -20°C until assayed for the p24^{gag} content. Although T lymphocytes have been demonstrated to express P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) (McEver & Cummings, 1997), a ligand of CD62L, CD62L-bearing viruses were not more infectious for CD4⁺ T cells than isogenic virions lacking this host cell surface component (Fig. 3B).

In summary we provide evidence that CD62L once incorporated within HIV-1 particles enhances attachment of viruses to endothelial cells, a process leading to a more efficient

HUVEC-mediated transmission of HIV-1 to CD4⁺ T lymphocytes. We are now trying to identify which of the different ligands expressed on HUVECs can associate with virus-anchored host CD62L. For example, it is known that heparan sulfate chains of syndecans bind to CD62L (Norgard-Sumnicht & Varki, 1995). Another possible counter-receptor is CLA, an essential carbohydrate component of vascular endothelium L-selectin ligands (Tu *et al.*, 1999). However, we cannot exclude the possibility that some other yet to be defined CD62L ligands might be responsible for the observed phenomenon.

Trans infection is a phenomenon widely used by different viruses like Ebola and human cytomegalovirus (Alvarez *et al.*, 2002, Halary *et al.*, 2002, Herrmann & Lagrange, 2005), as well as by bacteria (*Mycobacterium tuberculosis*) (Herrmann & Lagrange, 2005) and parasites (*Leishmania*) (Zhao *et al.*, 2005) to increase their infection efficiency. HIV-1 also infects CD4⁺ T cells in a *trans* infection mode via for example DCs and this type of infection is much more efficient than the “classical” way by which free virions come into contact with receptors and coreceptors expressed on permissive target cells. The results displayed in this work indicate that transmission of viruses bearing CD62L is more efficient than transfer of viruses lacking host CD62L when using a co-culture system made of HUVECs and CD4⁺ T lymphocytes. Based on this information, it can thus be postulated that CD62L-bearing virions will more firmly attached to the endothelium surface than viruses lacking this host cell membrane component. This might translate under *in vivo* conditions to a superior transfer of HIV-1 particles to CD4⁺ T cells, which are naturally

rolling onto the surface of endothelial cells during the process of lymphoid homing to lymphoid organs.

Enveloped viruses such as HIV-1 acquire parts of the host cell membrane and host cell-derived molecules as integral parts of their mature envelopes while emerging from infected cells (reviewed in (Cantin *et al.*, 2005)). It has been demonstrated in various studies that these host-derived constituents display multiple effects on the virus life cycle (Cantin *et al.*, 2005). Of high relevance to the present study, it has been shown that some HIV-1-associated host proteins and more particularly cell adhesion molecules can participate to the attachment step and result in an increased adsorption onto and infection of target cells bearing the appropriate counter-receptor. The metalloproteinase-dependent L-selectin also called CD62L can be added to the list of virus-anchored host cell surface components that can modulate the complex interactions between HIV-1 and the cell surface. More precisely, we obtain evidence indicating that adsorption of HIV-1 particles to the surface of endothelial cells (i.e. HUVECs) is increased upon incorporation of host CD62L and this leads to a more potent *trans* infection of CD4⁺ T cells.

Interestingly, a wide array of functional ligands of CD62L are expressed on HEVs in lymphoid organs where T cells migrate and HIV-1 can thus be constantly in contact with these permissive cells. Moreover, proinflammatory cytokines are known to be secreted at

high levels during HIV-1 infection (Decrion *et al.*, 2005). Since some CD62L ligands become functional in the presence of proinflammatory cytokines, a greater amount of viruses might consequently bind to the vascular endothelium. So, the well-described inflammatory state seen in HIV-1-infected patients might possibly favour the spread of infection by allowing a better endothelium-mediated *trans* infection of CD4⁺ T cells.

In summary, these data together with some previously published findings allow us to propose that interactions between some virus-associated host cell membrane proteins and their ligands might be responsible, at least in part, for the gradual development of abnormalities seen in most immune competent cells and lymphoid compartments of infected individuals. It can also be proposed that the vascular endothelium, which is estimated to cover a surface of at least 600 square meters, might represent an immense viral reservoir due its possible abilities to capture, protect and transmit HIV-1 through the natural leukocyte-endothelial adhesion cascade.

Acknowledgements

We are grateful to Ms. Sylvie Méthot for editorial assistance. This study was performed by S.T. in partial fulfilment of her Ph.D. degree in the Microbiology-Immunology Program, Faculty of Medicine, Laval University. This study was supported by an operating grant to M.J.T. from the CIHR HIV/AIDS Program (grant #HOP-14438). S.T. and C.G. are respectively the recipients of a Doctoral Award and Fellowship Award from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Research Program. M.J.T. is the recipient of the Canadian Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (Senior level).

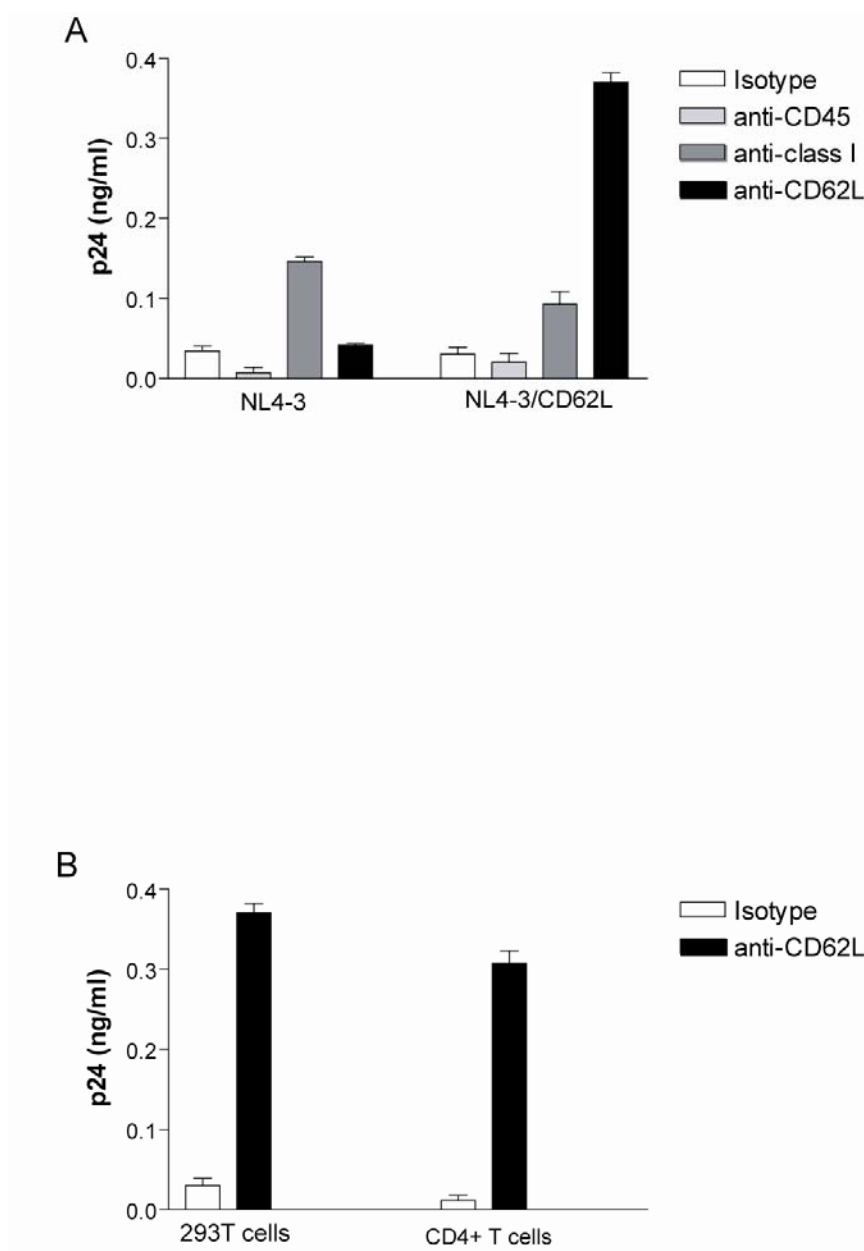


Figure 1. CD62L is incorporated in HIV-1. A) Viruses produced on 293T cells were captured with magnetic beads coated with an anti-class I, anti-CD45, anti-CD62L or a control antibody. B) Viruses produced on 293T cells or primary CD4+ T cells were captured with magnetic beads coated with an anti-CD62L or a control antibody. Results shown are the means \pm standard deviations of triplicate samples and are representative of five separate experiments.

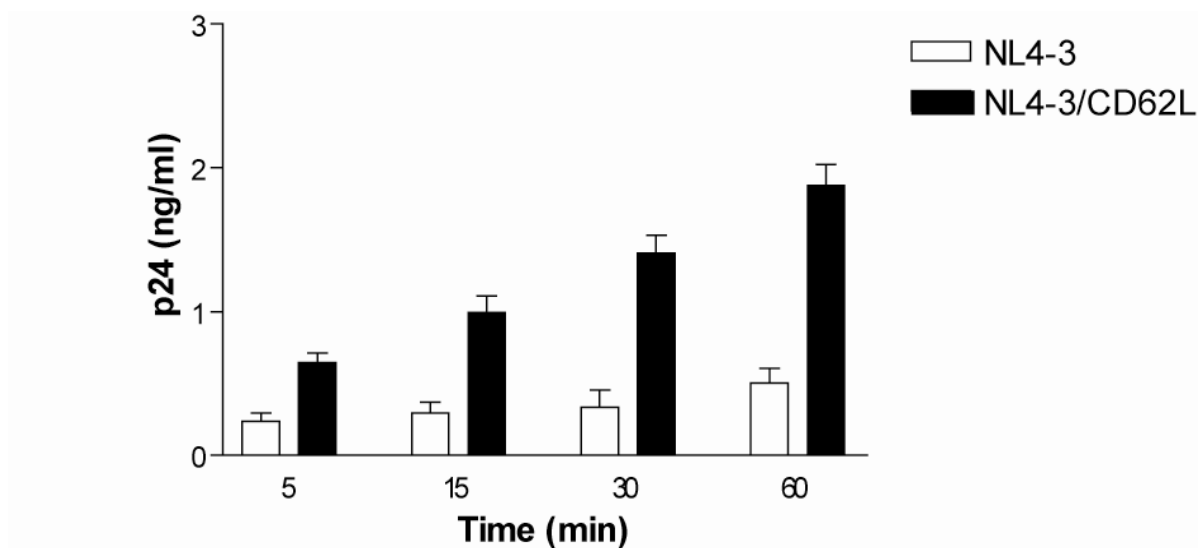


Figure 2. Attachment of HIV-1 to HUVECs is augmented following CD62L incorporation. HUVECs were first exposed to the studied virus preparations, washed extensively and subjected to a p24 test. The data shown represent the mean \pm standard deviations of triplicate samples and are representative of five independent experiments performed with samples from different donors.

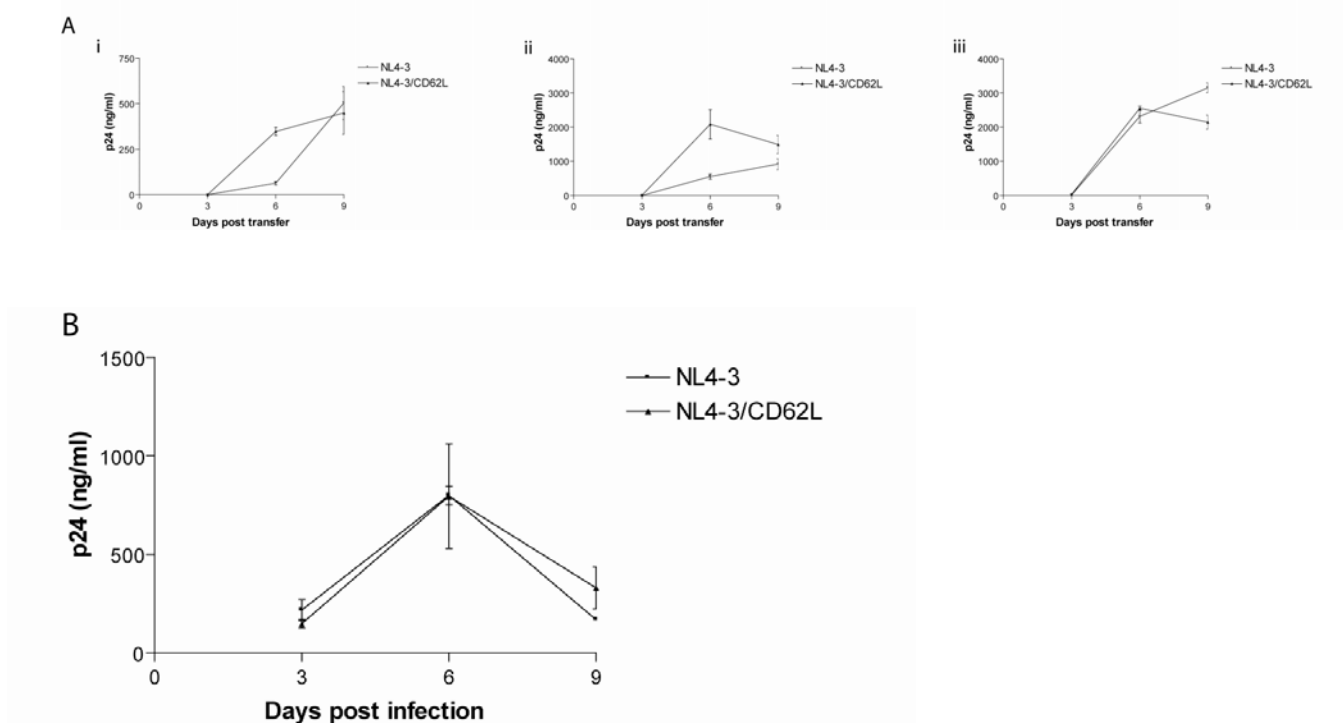


Figure 3. HUVEC-mediated transfer of HIV-1 to CD4⁺ T cells is increased for CD62L-bearing viruses. **A)** HUVECs were first exposed to the tested virus stocks, washed and co-cultured for 15, 30 and 60 min with CD4⁺ T cells. Next, CD4⁺ T cells were removed, put in culture and the p24 content was estimated at the indicated time periods. **B)** Purified CD4⁺ T cells were exposed to the tested virus stocks and virus production was assessed at the indicated time points. The data shown represent the mean \pm standard deviations of triplicate samples and are representative of three independent experiments.

References

- Abbate, I., Dianzani, F., Bianchi, F., Mosiello, G., Carletti, F., Fiumara, D. & Capobianchi, M. R. (1999). RANTES stimulates cell-mediated transmission of HIV-1 infection. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 345-50.
- Alvarez, C. P., Lasala, F., Carrillo, J., Muniz, O., Corbi, A. L. & Delgado, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* **76**, 6841-4.
- Arias, R. A., Munoz, L. D. & Munoz-Fernandez, M. A. (2003). Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* **307**, 266-77.
- Bashirova, A. A., Geijtenbeek, T. B., van Duijnhoven, G. C., van Vliet, S. J., Eilering, J. B., Martin, M. P., Wu, L., Martin, T. D., Viebig, N., Knolle, P. A., KewalRamani, V. N., van Kooyk, Y. & Carrington, M. (2001). A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* **193**, 671-8.
- Bastiani, L., Laal, S., Kim, M. & Zolla-Pazner, S. (1997). Host cell-dependent alterations in envelope components of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **71**, 3444-50.
- Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G. & Gallay, P. A. (2003). Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity* **18**, 27-39.
- Bounou, S., Giguere, J. F., Cantin, R., Gilbert, C., Imbeault, M., Martin, G. & Tremblay, M. J. (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.

- Bounou, S., Leclerc, J. E. & Tremblay, M. J. (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.
- Cantin, R., Fortin, J. F., Lamontagne, G. & Tremblay, M. (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**, 1091-100.
- Cantin, R., Methot, S. & Tremblay, M. J. (2005). Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J Virol* **79**, 6577-87.
- Castilletti, C., Capobianchi, M. R., Fais, S., Abbate, I., Ficociello, B., Ameglio, F., Cordiali Fei, P., Santini, S. M. & 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**, 547-53.
- Clapham, P. R. & McKnight, A. (2001). HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull* **58**, 43-59.
- Dakappagari, N., Maruyama, T., Renshaw, M., Tacken, P., Figdor, C., Torensma, R., Wild, M. A., Wu, D., Bowdish, K. & Kretz-Rommel, A. (2006). Internalizing antibodies to the C-type lectins, L-SIGN and DC-SIGN, inhibit viral glycoprotein binding and deliver antigen to human dendritic cells for the induction of T cell responses. *J Immunol* **176**, 426-40.
- De Milito, A. (2004). B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res* **2**, 11-21.
- Decrion, A. Z., Dichamp, I., Varin, A. & Herbein, G. (2005). HIV and inflammation. *Curr HIV Res* **3**, 243-59.

- Fortin, J. F., Cantin, R., Lamontagne, G. & 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**, 3588-96.
- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G. & van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587-97.
- Giguere, J. F., Diou, J., Madrenas, J. & Tremblay, M. J. (2005). Virus attachment and replication are promoted after acquisition of host CD28 and CD152 by HIV-1. *J Infect Dis* **192**, 1265-8.
- Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J. F. & Dechanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* **17**, 653-64.
- Herrmann, J. L. & Lagrange, P. H. (2005). Dendritic cells and Mycobacterium tuberculosis: which is the Trojan horse? *Pathol Biol (Paris)* **53**, 35-40.
- Kolegraff, K., Bostik, P. & Ansari, A. A. (2006). Characterization and role of lentivirus-associated host proteins. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 252-63.
- Martin, G. & 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**, 275-85.
- McEver, R. P. & Cummings, R. D. (1997). Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* **100**, S97-103.
- Norgard-Sumnicht, K. & Varki, A. (1995). Endothelial heparan sulfate proteoglycans that bind to L-selectin have glucosamine residues with unsubstituted amino groups. *J Biol Chem* **270**, 12012-24.

- Ott, D. E. (1997). Cellular proteins in HIV virions. *Rev Med Virol* **7**, 167-180.
- Ott, D. E. (2002). Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Rev Med Virol* **12**, 359-74.
- Pablos, J. L., Santiago, B., Tsay, D., Singer, M. S., Palao, G., Galindo, M. & Rosen, S. D. (2005). A HEV-restricted sulfotransferase is expressed in rheumatoid arthritis synovium and is induced by lymphotoxin-alpha/beta and TNF-alpha in cultured endothelial cells. *BMC Immunol* **6**, 6.
- Paquette, J. S., Fortin, J. F., Blanchard, L. & 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**, 9329-36.
- Pierson, T. C. & Doms, R. W. (2003). HIV-1 entry and its inhibition. *Curr Top Microbiol Immunol* **281**, 1-27.
- Piguet, V. & Sattentau, Q. (2004). Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* **114**, 605-10.
- Rosen, S. D. (2004). Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* **22**, 129-56.
- Sassetti, C., Tangemann, K., Singer, M. S., Kershaw, D. B. & Rosen, S. D. (1998). Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med* **187**, 1965-75.
- Tedder, T. F., Isaacs, C. M., Ernst, T. J., Demetri, G. D., Adler, D. A. & Disteché, C. M. (1989). Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Homology with the mouse lymphocyte homing receptor and other human adhesion proteins. *J Exp Med* **170**, 123-33.
- Tu, L., Delahunty, M. D., Ding, H., Luscinskas, F. W. & Tedder, T. F. (1999). The cutaneous lymphocyte antigen is an essential component of the L-selectin ligand induced on human vascular endothelial cells. *J Exp Med* **189**, 241-52.

- Turville, S., Wilkinson, J., Cameron, P., Dable, J. & Cunningham, A. L. (2003). The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *J Leukoc Biol* **74**, 710-8.
- Turville, S. G., Cameron, P. U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R. W. & Cunningham, A. L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* **3**, 975-83.
- Turville, S. G., Santos, J. J., Frank, I., Cameron, P. U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stossel, H., Romani, N., Piatak, M., Jr., Lifson, J. D., Pope, M. & Cunningham, A. L. (2004). Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* **103**, 2170-9.
- Zhao, C., Cantin, R., Breton, M., Papadopoulou, B. & Tremblay, M. J. (2005). DC-SIGN-mediated transfer of HIV-1 is compromised by the ability of *Leishmania infantum* to exploit DC-SIGN as a ligand. *J Infect Dis* **191**, 1665-9.